

The Combined Effects of Carbon Dioxide Concentration and Irradiation on Growth of the Green Alga *Haematococcus pluvialis*

최윤이, 윤영상, 박종문

포항공과대학교 환경공학부/화학공학과

전화 (0562) 279-5952, 팩스 (0562) 279-5528

Abstract

The biological fixation of carbon dioxide using microalgae have many advantages over the other methods. Microalgal culture can produce various value-added chemicals and remove carbon dioxide simultaneously. A ketocarotenoid astaxanthin is hyper-accumulated in the green freshwater microalga, *Haematococcus pluvialis*. In the present study, the combined effects of carbon dioxide concentration and light intensity on the growth of *H. pluvialis* were investigated. The carbon dioxide concentration above 10% caused a severe inhibition and around 5% is optimal for growth. Adaptation to high concentration of carbon dioxide enhanced the CO₂ tolerance. Specific growth rate calculated differently based upon cell number or dry weight because of the distinctive life cycle patterns of *H. pluvialis* : small-sized motile green cell and thick cell walled red cyst cell. Based on the light dependence of *H. pluvialis*, internally illuminated air-lift photobioreactor was designed and operated. Gradual increase of light supply gave more active growth and more effective productivity of astaxanthin than constant light supply.

Key words: carbon dioxide fixation, *Haematococcus pluvialis*, photobioreactor.

서 론

녹색조류인 *Haematococcus pluvialis*는 Ketocarotenoid의 일종인 Astaxanthin을 다량 축적하는데 이 물질은 연어나 송어 등의 육질이 붉은 색을 띠게 되는 물질로 알려져 있으며 갑각류등의 양식에도 사용되고 있다. 이 때문에 *Haematococcus pluvialis*는 미세조류의 유용생산물 이용가능성의 한 분야로써 많은 관심을 받고 있다. 미세조류의 유용생산물 생산의 장점은 이산화탄소도 동시에 고정화 할 수 있다는 것인데 아직까지 *Haematococcus pluvialis*의 이산화탄소 고정화까지 고려한 연구는 진행되지 않았고 더욱이 *Haematococcus pluvialis*는 비우호적인 환경일 때 astaxanthin을 축적하는데 더 많은 유용생산물을 얻기 위해서는 효과적인 growth가 보장되어 있어야 하며 때문에 이를 이산화탄소와 연관시켜 보는 것은 의미가 있다

고 하겠다. 또한 *Haematococcus pluvialis*의 경우 growth stage와 production stage를 분리한 two-stage photobioreactor가 적절한 생산공정이라 할 수 있으며 모든 photobioreactor와 마찬가지로 이러한 조류를 photobioreactor안에서 culture할 경우 성장의 제한인자는 빛으로 귀결되고 무엇보다도 production을 유도하는 조건이 빛이라고 보고되어져 있음에 따라 photobioreactor내부의 빛의 조건이 변함에 따른 성장과 production에 미치는 영향을 살펴봄으로써 효과적인 reactor 운전조건을 도출하여 보고자 하였다.

재료 및 방법

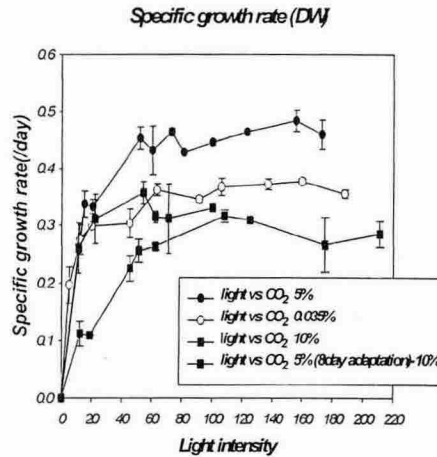
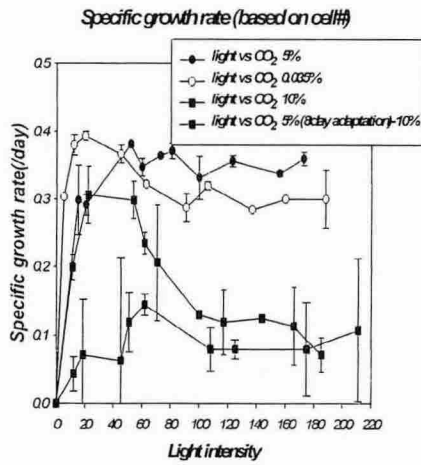
본 연구에 사용된 미세조류인 *Haematococcus pluvialis* LB16은 UTEX (University of Texas, Austin)에서 분양받았다. 이 미세조류는 OHM배지(Fabregas et al. 2000)를 사용하여 22°C의 Shaking Incubator에서 배양하였다. 배양한 cell중 일정상태에 이른 cell (OD₅₅₀ = 0.2, Cell number = 20×10^4 /ml, DW = 0.2 g/L)을 이산화탄소 영향을 살펴보기 위하여 여러 개의 25 ml tube를 항온조(22°C)에 설치된 rack에 옮겨서 수행하였으며, 이산화탄소 농도를 0.035%, 5%, 10%로 달리하고 aeration은 tube당 100 mL/min으로 하면서 광원으로 부터의 거리 조절을 통하여 광도(단위는 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$)를 다르게 하여서 8일 동안 Culture하였다. 8일 동안 culture한 cell을 X₂ initial cell을 X₁ 이라 두고 specific growth rate의 경우 $\mu = (\ln X_2 - \ln X_1) / \Delta t$ 로 계산하여서 Cell#, Dry weight당 μ 를 구하였다. 이산화탄소 adaptation을 보기 위한 실험의 경우는 이산화탄소 5%를 8일간 culture 한 것을 10%로 옮기었다. 이 결과가 가장 growth에 좋다고 판정된 이산화탄소 5%를 2L/min으로 aeration시키면서 working volume 5L의 internally illuminated air-lift photobioreactor를 제작하여 내부광원을 1개, 2개, 그리고 순차적으로 광원을 증가시킨 reactor에서 살펴보았다. Reactor에는 Shaking Incubator에서 배양한 cell중 일정상태에 이른 cell (OD₅₅₀ = 0.2, Cell number = 20×10^4 /ml, DW = 0.2 g/L)을 200ml을 추출하여 5L배지에 접종한 후 photobioreactor에 넣고 가동하였다. (initial Cell#= 0.736 ± 0.048 , DW= 0.0104 ± 0.00218) Total carotenoid는 Davies(1976)방법에 의하여 분석하였으며, Cell number는 haemocytometer로 측정하였다. Dry cell weight은 0.45 μm membrane filter를 사용하여 10 시간 동안 85°C에서 건조시킨 후에 desiccator를 이용 완전히 말린 후에 측정하였다.

결과 및 고찰

이산화탄소의 농도에 따른 specific growth rate를 본 결과 fig 1,2와 같았으며 각각 Cell#당, Dry weight당 specific growth rate를 나타내고 각 이산화탄소 농도에 대한 다른 광도하에서의 growth rate를 보여주고 있다. CO₂ 5%가 Cell number나 Dry weight을 기준으로 한 모든 Specific growth rate에 좋았고 CO₂ 10%만 되면

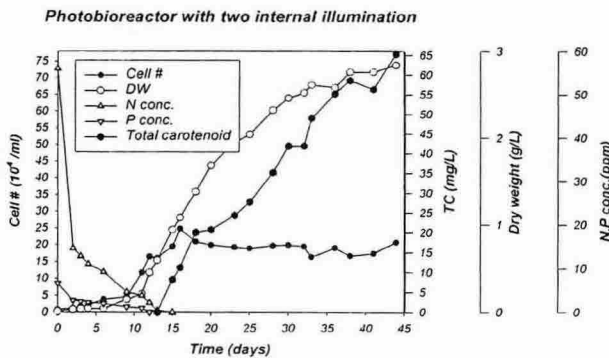
이산화탄소에 의하여 성장이 inhibition 받는 것을 확인 할 수 있었다. 이산화탄소를 5%에서 8일간 adaptation시킨 후 다시 10%에서 배양한 경우에는 그냥 10%에서와는 달리 adaptation 효과가 보였고 이는 이 미세조류가 고농도의 이산화탄소에서도 생육하면서 생물학적으로 고정화할 수 있음을 보여준다고 하겠다.

Cell#의 경우 최적의 광도는 낮은 range내에서 존재하였고 이 정도 광도에서 Cell



<Fig1> Specific growth rate based on cell number

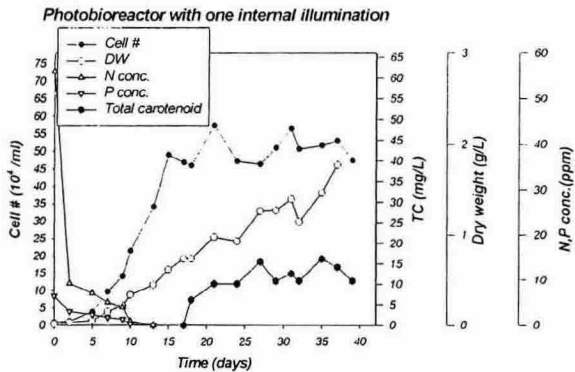
<Fig2> Specific growth rate based on Dry weight



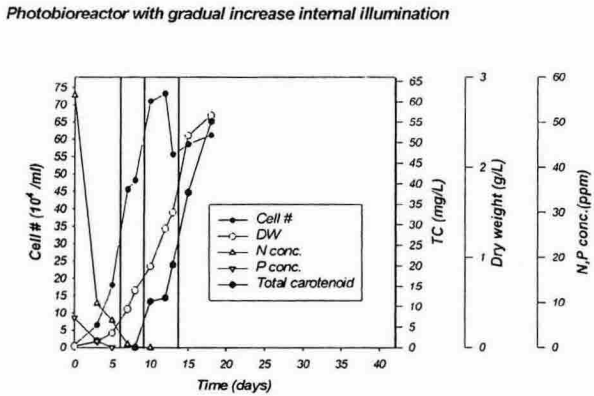
size는 작으면서 두 개의 편모를 구비하고 활발히 분열하면서 motility를 갖추고 있었으며 이에 비하여 Dry weight의 경우는 Cell#와는 달리 광도에 어느 정도 비례한다고 할 수 있는데 이는 Cell이 휴지기에 들어가면서 size가 커지고 분열이 멈추는

<Fig3> The photobioreactor with two internal illumination

데 기인한다고 하겠다. 이러한 미세조류인 *Haematococcus pluvialis*의 Cell cycle 교대로 인한 다른 pattern은 CO₂ 5%에서 내부광원을 달리한 reactor 배양에서도 나타났는데 fig3,4에서 보여지듯이 내부광원이 1개인 것이 2개인 것 보다 Cell



<Fig4> The photobioreactor with one internal illumination



<Fig5> The gradual increased(1-2-4-7ea) internal illumination

을 통한 효율적인 운전이 가능하다고 할 수 있으며 이 결과는 fig5에 나타내었다.

참고문헌

1. Lorenz, R., Cysewski, G.R. (2000), Commerical potential for *Haematococcus pluvialis* as a natural source of astaxanthin, *TIBTECH* 18:160-167
2. J.Fabregas, A.Dominguez, M.Regueiro, A.Mzseda, A.Otero (2000), Optimization of culture medium for the continuous cultivation of the microalga *Haematococcus pluvialis*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53: 530-535.
3. Choi, Y. E, Yun, Y.-S., Park, J.M. (2001) Evaluation of methods promoting the astaxanthin production by the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* submitted.

number에서는 오히려 높았고 Dry weight은 반대이었다. 내부광원이 1개이라도 미세조류가 성장함에 따라 배양액을 투과하는 빛은 급감하였고 때문에 reactor 내부의 광도는 시간이 갈수록 떨어져서 낮은 광도조건이 되었기 때문이며 Carotenoid축적량은 production에 가장 effective 한 인자가 빛임에 따라 내부광원이 2

개인 것이 높았다. 이러한 특징때문에 *Haematococcus* 경우 빛조건이 growth 와 production이 다른 two stage가 타당한 것으로 받아들여지고 있으며 나아가 미세조류 성장에 따른 빛 감쇄까지 고려한다면 순차적인 광원증가가 오히려 타당한 접근 방식이라고 할 수 있고 반응기 운전시간 단축