

*Chlorella vulgaris*의 이산화탄소 고정 및 수소생성 특성

김철경*, 박기용, 박준성, 김남기
 성균관대학교 공과대학 화학공학과, 신홍대학 환경관리과*
 전화 (031) 290-7253, FAX (031) 290-7272

Abstract

After 300hours cultivation *Chlorella vulgaris* in standard medium in which the initial cell seeding concentration of 0.7×10^4 cells/mL, 1.21×10^5 cells/mL was gained but in the case of 0.30g/L of initial cell seeding concentration the maximum growth rate of 0.162g/L · day was shown. In the case of the initial glucose concentration of 2.00g/L, the cell concentration was changed from initial 0.025g cells/L to 0.874g cells/L after 140hours cultivation, the specific growth rate was $0.243h^{-1}$, but 268mL of gases were formed in 72hours, and after that, hydrogen evolution was completed. Formed gases were not all hydrogen, and 19.87 mol% of hydrogen is detected by GC. Analyzing the composition of *Chlorella vulgaris* by elementary analysis, it is found to be $C_{1.000} H_{1.774} N_{0.125} O_{0.557}$, and CO_2 conversion rate by *Chlorella vulgaris* was 0.616 cells/g · CO_2

서론

이산화탄소 고정화 기술에는 생물학적 고정화와 접촉수소화반응, 광화학반응 및 전기화학반응 등으로 메탄이나 메탄올을 합성하거나 각종 화합물의 합성을 통한 화학적 고정화가 있다. 뿐만 아니라 생물학적 방법에 의한 수소, 메탄, 에탄올 등의 대체 에너지 생산에 대한 연구가 계속 되어 왔다. 수소생산에는 혐기성, 광합성 박테리아와 조류가 주 연구 대상이었으나 광합성 미생물에 의한 수소 생산에 대한 연구도^{1), 2)} 진행되어 왔으나 효율성에 대한 문제 등으로 그렇게 각광을 받지 못했다. *Chlorella vulgaris*를 비롯한 모든 광합성 미생물은 이산화탄소를 고정화 할 수 있고, Calvin cycle을 통해 이산화탄소를 유기물로 합성하는 것으로³⁾ 알려져 있다. 따라서 폐수처리장에서 발생되며 녹조류의 일종이고 이산화탄소를 탄소원으로 필요로 하며 수소생성능을 지닌 *Chlorella vulgaris*를 배양하여 이산화탄소를 고정화하고 광생물반응기에서 수소를 생산하는 시스템을 제당제조공장 등의 폐수처리장에 응용 적용하기 위해 *Chlorella vulgaris* 대상으로 이산화탄소 고정화와 제당 제조공장의 폐수에 함유되어있는 glucose의 제거를 위한 수소생성 특성을 알아 보았다.

재료 및 방법

배지 및 시약

*C. vulgaris*는 생명공학연구소 유전자센터 유전자은행에서 분양받아 배양하여 사용

하였다. 최적 성장 배지는 기본 영양분을 제조하기 위해 증류수 0.5L중에 NaNO_3 75g, K_2HPO_3 1.95g, Na_2CO_3 1.06g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3.75g, CaCl_2 1.35g, $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 2.90g, ferric citrate 0.30g, citric acid 0.3g, EDTA 0.05g을 각각 주입하였으며, 미량원소의 혼합을 위해 증류수 1L 중에 H_3BO_3 2.86g, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.81g, ZnSO_4 0.22g, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.39g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.08g, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.05g을 주입하여 기본 solution을 조제한 후, 1L의 희석 용액을 조제하기 위해 기본 영양분을 각각 10mL씩 주입하였고, 미량원소는 1mL를 주입하여 배양액을 조제하였다. 탄소원으로 이산화탄소를 사용하는 경우에는 상기 기본 영양분에서 탄소원을 포함하는 Na_2CO_3 , ferric citrate, citric acid, EDTA를 제외 시키고 배지를 조제하였다. 이산화탄소 고정화 후에는 glucose를 탄소원으로 공급하여 수소생성 정도를 실험하였다.

***Chlorella vulgaris*의 배양**

최적 배지에서 2회 암반응 상태에서 12시간씩 배양하여 활성화 시킨 후, 배양온도 25°C, 200rpm, 표면 조도 3,000Lux가 되도록 위치를 조절하여 광 조사하여 배양하였다. 이산화탄소 고정화를 위해서는 한국발효기에서 제작한 안지름 13cm의 pyrex 회분식 반응기를 사용하였으며 반응기 부피는 3L이었으며 배양액은 1.8L로 하였으며, pH는 초기값만 7.4로 조절하였으며 반응 중에는 pH를 조절하지 아니 하였다. 이산화탄소를 공급하는 경우에는 100% 이산화탄소를 가스 유량계와 필터를 사용하여 유입시켰다. 진탕배양하면서 배양시간에 따른 cell 농도의 증식, pH 변화, 비성장 속도 등을 조사하였다. cell 농도의 증식은 배양액을 취하여 UV spectrophotometer (Duksan Co. Korea)를 사용하여 660nm에서 배양액의 흡광도로 나타내었다. Elemental analyzer(기초과학지원연구소에서 분석)를 사용하여 *chlorella vulgaris*의 원소 성분을 조사하였으며, GC(Hwelett Packard, U.S.A)를 사용하여 가스상 물질을 분석하였다.

결과 및 고찰

***Chlorella vulgaris*의 성장 특성**

초기 접종 농도 0.7×10^4 cells/mL 상태에서 300시간 배양후 UV spectrophotometer로 측정된 Optical Density value는 0.958이었으며, Thoma haemocytometer를 사용하여 slide glass 내의 생체를 광학현미경으로 400배율로 측정된 cell 수는 1.21×10^5 cells/mL 이었다. 이를 원심분리하여 냉동건조하여 얻은 건조체를 최종 배양부피에 대한 농도로 환산하여 얻어진 최종 농도는 0.470g/L이었다. 이산화탄소 주입량을 0:05L/L · min(vvm), 0.50 vvm, 1.00 vvm으로 실험한 결과, 0.05vvm 경우는 cell 성장이 이루어졌으나, Fig. 1에서 보는 바와 같이 이산화탄소 농도가 상대적으로 높은 1.00vvm 경우는 초기 pH 7.8에서 4.6까지 하락하면서 성장저하로 배양이 정상적으

로 진행되지 못했으며, air 주입 경우는 배양 후 12시간부터 cell 사멸 현상으로 갈변이 일어났다. 배양온도 20~24°C에서 우수한 성장을 보였다. 초기 pH는 7.9 (7.5~8.0) 경우가 가장 우수한 성장 조건이었으며, *C. vulgaris*는 광원에 관계 없이 성장하는 것을 확인하였다. 최적배지에 영양소로서 B₁₂를 1.00g/L를 첨가한 경우와 기본배지에 미량원소를 제외한 경우를 200시간 배양하여 비교하였다. 미량원소를 제외시킨 배지에서도 성장속도가 약간 느리지만 기본배지에서 배양된 경우와 거의 유사하게 성장하였으며 B₁₂ 주입 경우도 성장이 상대적으로 우수하지 못하였다. 광원의 조도 영향보다는 배지의 영양분 구성에 따라 성장 속도가 다르게 나타나지만, 적정 배지 영양요소가 아닌 B₁₂ 경우, 배양시간 200시간 이내에서는 광합성에 대한 성장 보조인자로 작용하지 못하는 것으로 확인되었다.

초기 cell 접종농도에 따른 성장비교

초기 cell 접종농도를 0.10g/L, 0.30g/L, 0.45g/L로 하여 이산화탄소 주입 0.05vvm 경우에 성장 속도를 비교한 결과, Fig. 2에서 보는 바와 같이 0.30g/L 경우가 성장이 0.162g cells/L · day로 가장 우수하였다.

Glucose 농도에 따른 성장 특성

기본배지의 영양요소 중에서 탄소원이 될 수 있는 요소를 제외시키고 glucose를 주입하여 cell의 저농도 상태에서의 성장을 보기 위해서 낮은 초기농도를 0.015~0.025g cells/L에서 실험하였다. Glucose 초기 농도가 2.00g/L인 경우 초기 cell 농도 0.025g cells/L에서 140시간 후 0.874g cells/L이 되었으며 비성장속도(μ : h⁻¹)는 0.243이었다. Glucose 10g/L 주입된 경우는 초기 cell 농도 0.015g cells/L에서 140시간 후에는 0.586g cells/L이 되었으며 비성장속도는 0.272이었다. Glucose 초기 농도 20g/L인 경우는 초기 cell 농도 0.015g cells/L에서 48시간 까지는 성장이 우수하였으나 140시간까지의 비성장속도는 0.195이었다. 상기 실험 결과를 Fig. 3과 같이 Monod, Teissier, Moser, Andrew의 비성장 속도식으로 비교한 결과 Andrew model $\mu = \mu_{\max}S/(K_1+S+S^2/K_p)$ 에 잘 일치하였으며 $\mu = 0.642S/(2.853+S+S^2/9.307)$ 식을 유도하였다.

수소 생성을 및 이산화탄소 전환율

Glucose 초기 농도가 2.00g/L인 경우 초기 cell 농도 0.025g/L 상태에서 72시간내에 가스를 268mL 생성시켰으며, GC로 분석한 결과, 전체 100mol% 중에서 질소가스량을 제외하고 순수 수소는 19.87mol% 함유하고 있었다. *C. vulgaris*를 원소분석한 결과 C_{1.000} H_{1.774} N_{0.125} O_{0.557}이 되며 분자량은 24.43g/mol이 되었으며, 이산화탄소 전환율은 0.616 cell/g CO₂가 되었다.

요약

*Chlorella vulgaris*를 이용하여 기본배지에서 초기 주입농도 0.7×10^4 cells/mL 상태에서 300시간 배양 후 1.21×10^5 cells/mL의 생체수를 얻었으며, 초기 cell 농도가 0.30g/L인 경우가 성장률이 0.162g/L·day로 우수하였다. Glucose 초기농도가 2.00g/L인 경우 초기 cell 농도 0.025g/L에서 140시간 후 0.874g/L이 되었으며 비성장속도는 $0.243h^{-1}$ 을 나타내었고, 72시간내에 가스를 268mL를 생성하였으며 이후로는 수소 생성이 종료으나 순수 수소는 19.87mol% 함유하고 있었다. *Chlorella vulgaris*의 조성을 원소분석기로 분석한 결과 C_{1.000} H_{1.774} N_{0.125} O_{0.557}가 되었으며 이산화탄소 전환율은 0.616cells/ g CO₂가 됨을 알 수 있었다.

참고문헌

1. Greenbaum E., "Photo synthetic Hydrogen/ Oxygen Production by Green Algae"(1997), International Conference on Biological Hydrogen Production/ Bio-Hydrogen, pp. 2-3
2. Markov, S.A., "Hydrogen photoproduction and dioxide uptake by immobilized *Anabaena variabilis* in a hollow-fiber photobioreactor"(1995), Enzyme and Microbial Techlogy, vol. 17, pp. 306-310
3. Wilhelm, S. W. and C. G. Trick, "Effects of vitamin B12 concentration on chemostat cultured *Synechococcus* sp. strain PCC 6002"(1995), Can. J. Microbiology, vol. 41, pp. 145-151

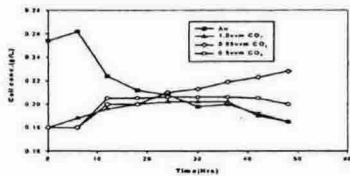


Fig 1. Effect of various feed ratio of carbon dioxide on the growth of *Chlorella vulgaris*

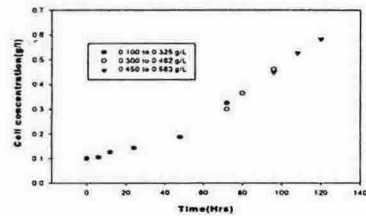


Fig 2 Time course of *Chlorella vulgaris* growing with initial cell concentration

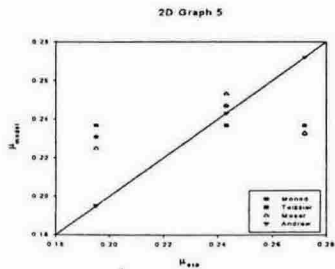


Fig 3. Correlation on μ value between model equation and experimental data

Table 1 Elemental analysis results of *Chlorella vulgaris*

Sample	C(%)	H(%)	N(%)	O(%)	S(%)
Result	44.30	6.55	6.48	32.88	0.00