

*Chlamydomonas reinhardtii* 배양액에서 황성분 재첨가에 의한  
연속적인 수소생산

Continuous Hydrogen Production by Sulfate Readdition in  
*Chlamydomonas reinhardtii* Culture

김준표, 심상준, 박태현\*, 김미선\*\*

성균관대학교 화학공학과, \*서울대학교 화학공학과, \*\*한국에너지기술연구원

## 1. 서론

녹조류는 수소가스를 생산할 수 있는 미생물 중 하나로서, 식물과 같은 광합성 기구를 가지고 있다. 조류는 탄소원으로서 대기 중의 CO<sub>2</sub>를 고정화하고, 에너지원으로서 태양광을 이용하며, 전자 공여체로서 물을 이용하여 수소를 생산할 수 있다. 조류를 이용한 수소생산을 위해서는 세포내의 hydrogenase가 활성을 가져야하는데, hydrogenase는 광합성에 의해 발생하는 O<sub>2</sub>에 의해 그 활성이 떨어지거나 완전히 저해 받는다. 이러한 문제는 배지 내에 황결핍 성분을 결핍시켜 광합성단계에서 발생하는 산소와 혐기조건에서의 수소 생산단계를 분리시킴으로 해결이 가능하다. 녹조류 배양 시 황성분이 결핍되면, 빛에서도 PSⅡ가 저해되어 물분해에 의한 O<sub>2</sub>가 발생되지 않는다. 따라서 황결핍 후 약 24시간이 지나면 광합성에 의한 O<sub>2</sub> 생산속도보다 호흡에 의한 O<sub>2</sub> 소모속도가 더 빨라져 호기에서 혐기 상태로 전환되게 된다. 그러므로 빛 존재 하에서도 hydrogenase의 활성을 갖게 하여 수소생산을 가능하게 한다.

본 연구에서는 녹조류인 *Chlamydomonas reinhardtii* UTEX 90을 이용하여 황결핍 이후, 황성분 재첨가에 의한 연속적인 수소생산에 관해 실험하였다. 수소생산 시 재첨가된 황농도에 따른 수소 생산량을 관찰하였고, 황성분 재첨가에 따른 chlorophyll 농도, 세포수, 황성분 농도의 변화량을 관찰하였다.

## 2. 실험 방법

### (1) 균주 배양 방법 및 황결핍 환경

본 연구에 사용된 녹조류는 *Chlamydomonas reinhardtii* UTEX 90 이다. 배지는 TAP (Tris-Acetate-Phosphate) 배지(pH 7)를 사용하였다. 세포는 온도 23 °C, 150 rpm인 광배양기에서 배양됐으며, 빛은 형광등으로 약 70 μE/m<sup>2</sup>s 로 12시간을 주기로 하여 공급되었다<sup>(2)</sup>.

*C. reinhardtii* 균주는 지수 성장(약 4-10 x 10<sup>6</sup> cells/mL) 형태로 자란다. 이 밀도에 도달하면 TAP 배지 내에서 황성분을 모두 Cl로 치환시킨 TAP minus S 배지를 사용하여 원심분리기에서 2000 xg, 5 분 동안 세포를 7 차례 씻어낸 후, 100

ml serum bottle 에 세척된 세포를 40 ml 채우고,  $MgSO_4$  용액을 0, 15, 30, 60, 120  $\mu M$ 을 재첨가 하였다. 그리고 나서, 혐기조건을 만들기 위해 아르곤 가스로 bottle 내부를 치환한 후 배양하였다. 이 때 광세기를  $200 \mu E/m^2s$  로 하여 120h 동안 배양 하였다. 또한 140 시간 이후에 다시  $MgSO_4$  용액을 농도별로 재첨가하여, 다시 아르곤 가스로 내부를 치환하여 주었다. 이러한 방법으로 4회 반복하였다.

## (2) 분석 방법

*C. reinhardtii* 밀도는 Haemocytometer (Neubauer-ultraplane, Marienfeld, Germany)와 microscope (Y-IDP, Nikon, Japan)를 사용하여 세포 밀도를 측정하였다. 또 다른 방법으로는 80 °C에서 12 시간 건조된 종이 필터를 이용한 건조중량법이 이용되었다. 발생된 가스를 정량분석하기 위해 gas chromatograph (HP 5890, Hewlett-Packard, USA)를 사용하였다. 수소 가스를 분석하기 위해서 carrier gas는 아르곤(Ar)을 사용하였다. 또한 detector는 TCD (Thermal conductivity detector)를 사용하였다. 분석용 column은 carboxen-1000 (Supelco, USA)을 사용하였고, 분석 시료는 serum bottle의 head space에서 100  $\mu L$ 씩 취하였다. 세포 성장에 있어 배지 내에 황 성분이 얼마나 소모되는지를 관찰하기 위하여 Ion-chromatography (DIONEX, Model LC10-2, USA)를 사용하여 황 성분의 농도를 관찰하였다. 배양액은 0.2  $\mu m$  공극크기 필터에 여과한 후, 주사기에 0.1 ml 취해서 주입하였다. 세포내 chlorophyll 양을 분석하기 위해, Spreitzer 법을 이용하여 spectrophotometer (HITACHI, U-3210, Japan)를 사용하여 측정되었다<sup>(2)</sup>.

## 3. 결과 및 고찰

### (1) 황농도에 따른 수소생산

황결핍시 잔여 황농도에 따른 수소생산량을 알아보기 위하여, TAP-S 배지로 세포를 세척한 후 황성분을 농도별(0, 15, 30, 60, 120  $\mu M$ )로 재첨가 하여  $200 \mu E/m^2s$ 의 빛에서 140 시간 동안 배양하였다. 수소생산량은 0 - 30  $\mu M$ 의 황성분을 재첨가 해주었을 때까지는 순차적으로 증가하였고, 60  $\mu M$ 의 황농도를 재첨가 해주었을 때는 황성분을 첨가해 주지 않았을 때보다 감소하였다. 그리고 황성분 120  $\mu M$ 을 재첨가 하였을 때는 수소생산이 되지 않았다. 이러한 황성분의 재첨가는 황결핍시 PS II의 활성화에 영향을 주어, 수소 생산시 이용되는 전자의 발생을 증가시켜준다<sup>(3)</sup>. 따라서 30  $\mu M$ 의 황성분을 재첨가 해주었을 때, PS II의 활성이 가장 많이 증가한 것으로 사료된다. 또한 60  $\mu M$ 의 황성분을 재첨가 해주었을 때는 Fig. 1에서 보여준 것처럼 수소발생 시간이 약 24시간 정도 늦어졌다. 이는 다소 높은 황농도 때문에 배지내의 황결핍이 지연되어, hydrogenase 유도 되는 시간과 전체 수소발생 시간이 줄어들어 황성분을 재첨가 하지 않았을 때보다 수소생산량이 줄어드는 것을 알 수 있었다. 하지만 황성분 120  $\mu M$ 을 재첨가 해주었을 때는 배지내 황성분이 너무 많이 존재하게 되어 황결핍이 일어나지 않게된다 (Fig. 2). 따라서 혐기 상태에서만

활성을 갖는 hydrogenase 가 유도되지 않아 수소생산이 되지 않는 것으로 사료된다.

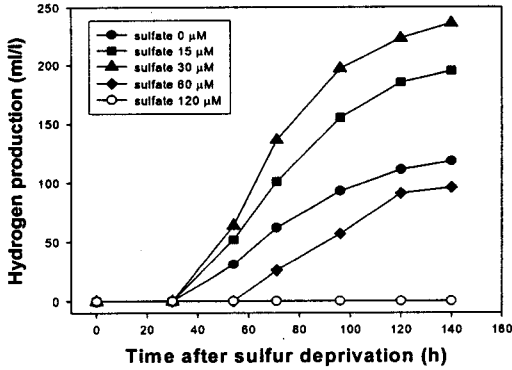


Figure 1. 황결핍 후 황성분 재첨가에 따른 수소생산

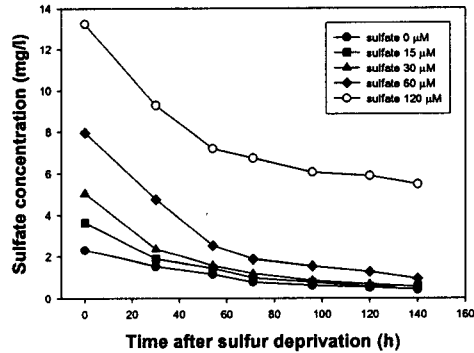


Figure 2. 황결핍 후 배지내 황성분 농도

(2) 황성분 재첨가에 따른 연속적인 수소생산

황결핍 후 황성분의 재첨가에 의해 연속적인 수소생산을 수행하였다. 예전 Melis의 연구에서 보여진 바와 같이, 황결핍 조건을 이용한 수소생산은 배지내의 미량의 황성분만 재첨가 해도 수소를 재생산 해낼 수 있었다<sup>(1)</sup>. 이것은 미량의 황성분이 PSII의 잔여활성을 다시 유도하여 PSII에서 수소를 합성할 수 있는 전자를 재생산하기 때문인 것으로 사료된다. 우리는 황성분 농도별(15, 30, 60, 120 μM)로 약 140시간 마다 재첨가 하여 이용하여 연속적인 수소생산을 시도했다. Fig 3에서 보여준 바와같이 총 4번 재첨가 해 주었는데 시간이 지날수록 수소생산량은 감소하는 것을 볼 수 있었다. Fig 1 과 마찬가지로 연속적인 수소생산에서도 황성분 30 μM을 재첨가 해주었을 때 가장 많은 수소가 생산되었다 (총 882 ml H<sub>2</sub>/g cell, 4회). 황성분 60 μM을 재첨가해준 경우에는 수소생산 속도가 점점 느려지다가 네 번째 재첨가 했을 때는 수소발생이 이루어지지 않았다. 이는 배지내의 잔여 황성분이 다량 존재하여 황결핍이 제대로 이루어지지 않은 것으로 사료된다. 또한 전체적으로 황결핍 시간이 지날수록 수소생산량이 감소하는 세포의 사멸과 pH의 증가(약 8.6 까지 증가) 때문인 것으로 사료된다. 황결핍 시간이 길어질수록 세포의 데미지가 증가하여, 수소를 생산해낼 수 있는 개체수가 감소한다. 또한 hydrogenase 가 pH 변화에 민감하여 pH가 높을 수록 수소생산에 저해를 받는다<sup>(4)</sup>. 따라서 황성분의 재첨가에 의한 수소생산은 세포개체수의 사멸과 pH 변화를 막고 유지 시켜주는 것이 중요하다.

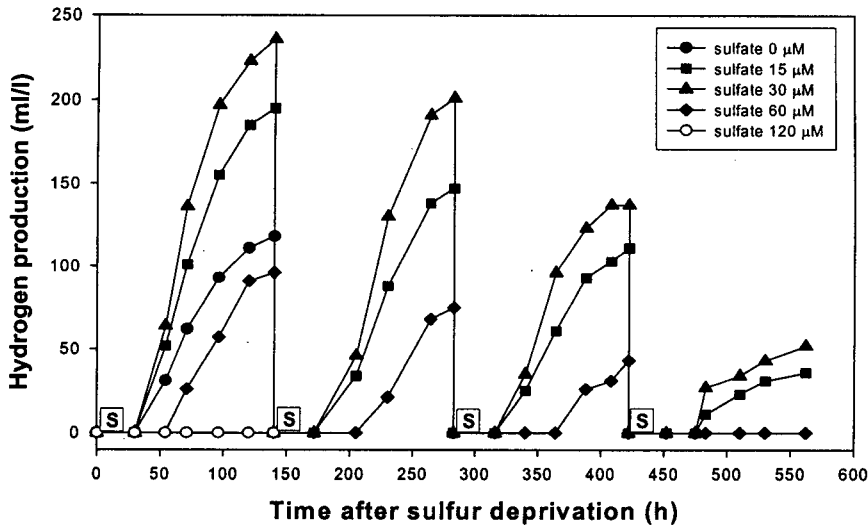


Figure 3. 황결핍 후 황성분 재첨가에 의한 연속적인 수소생산

#### 4. 결론

황결핍 후 황성분의 재첨가에 의한 수소생산은 세포배양시간을 줄이고 한번에 연속적인 수소생산이 가능하여 매우 획기적인 기술이다. 이 때 중요한 요소는 첫째, PSII의 잔여 활성을 위해 재첨가 된 황농도의 최적화와 둘째, 황결핍 시간이 길어짐에 따라 수소를 생산해 내는 세포개체수의 유지와 마지막으로 hydrogenase의 활성을 위해 pH의 보정이 중요한 것으로 사료된다.

#### 참고문헌

1. Ghirardi, M. L., L. Zhang, J. W. Lee, T. Flynn, M. Seibert, E. Greenbaum, and A. Melis : "Microalgae: a green source of renewable H<sub>2</sub>", Trends Biotechnol., vol. 18, 2000, pp. 506-511.
2. Harris, E. H. : "The *Chlamydomonas* sourcebook", Academic Press, Inc., San Diego, California, U.S.A., 1989, pp. 607-608.
3. Kosourov, S., A. Tsygankov, M. Seibert, and M. L. Ghirardi : "Sustained hydrogen photoproduction by *Chlamydomonas reinhardtii* : Effects of Culture Parameters", Biotechnol. and Bioeng., vol. 78, 2002, pp. 731-740.
4. Kosourov, S., M. Seibert, and M. L. Ghirardi : "Effect of extracellular pH on the metabolic pathway in sulfur-deprived, H<sub>2</sub>-producing *Chlamydomonas reinhardtii* culture", Plant Cell Physiol. vol 44, 2003, pp. 146-155