

## 광합성을 이용한 바이오수소 생산

심 상준, 김 준표

### Biohydrogen production using photosynthesis

Sang Jun Sim, Jun Pyo Kim

**Key words** : biohydrogen production(바이오수소 생산), sulfur deprived condition(황결핍 조건), photosynthesis(광합성), *Chlamydomonas reinhardtii*, cell age(세포나이), light intensity(빛 세기), continuous hydrogen production(연속수소 생산공정)

**Abstract** : Energy is vital to global prosperity, yet dependence on fossil fuels as our primary energy source contributes to global climate change, environmental degradation, and health problems. Hydrogen ( $H_2$ ) offers tremendous potential as a clean, renewable energy currency. Hydrogen has the highest gravimetric energy density of any known fuel and is compatible with electrochemical and combustion processes for energy conversion without producing carbon-based emission that contribute to environmental pollution and climate change. Numerous methodologies have been developed for effective hydrogen production. Among them, the biological hydrogen production has gained attention, because hydrogen can be produced by cellular metabolism under the presence of water and sunlight. The green alga *Chlamydomonas reinhardtii* is capable of sustained  $H_2$  photoproduction when grown under sulfur deprived condition. Under sulfur deprived conditions, PSII and photosynthetic  $O_2$  evolution are inactivated, resulting in shift from aerobic to anaerobic condition in the culture. After anaerobiosis, sulfur deprived algal cells induce a reversible hydrogenase and start to evolve  $H_2$  gas in the light. According to above principle, we investigated the effect of induction parameters such as cell age, cell density, light intensity, and sulfate concentration under sulfur deprived condition. We also developed continuous hydrogen production system by sulfate re-addition under sulfur deprived condition.

## 1. 서론

조류를 이용한 수소생산을 위해서는 세포내의 hydrogenase가 활성을 가져야하는데, hydrogenase는 광합성에 의해 발생하는  $O_2$ 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 PS II가 저해되어 물분해에 의한  $O_2$ 가 발생되지 않는다. 따라서 황결핍 후 약 24시간이 지나면 광합성에 의한  $O_2$  생산속도보다 호흡에 의한  $O_2$  소모속도가 더 빨라져 호기에서 혐기 상태로 전환되게 된다. 그러므로 빛 존재 하에서도 hydrogenase의 활성을 갖게 하여 수소생산을 가능하게 한다<sup>(1)</sup>.

본 연구에서는 녹조류의 일종인 *Chlamydomonas reinhardtii* UTEX 90을 이용하여 황결핍 이후, 세포나이, 초기세포질량, 빛 세기, 황농도에 따른

수소생산성을 실험하였고, 황성분 재첨가에 의한 연속수소생산 공정을 개발하였다.

## 2. 실험 방법

### 2.1 균주 배양 방법 및 황결핍 방법

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  $\mu E/m^2s$  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

1) 성균관대학교 화학공학과  
E-mail : simsj@skku.edu  
Tel : (031)290-7274 Fax : (031)290-7272

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, 그 후, 혐기조건을 만들기 위해 아르곤 가스로 bottle 내부를 치환한 후 배양하였다. 이때 광세기를 200  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$  로 하여 배양하였다.

## 2.2 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  $^{\circ}\text{C}$  에서 12 시간 건조된 종이 필터를 이용한 건조중량법이 이용되었다. 발생한 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  $\mu\text{L}$ 씩 취하였다<sup>(3)</sup>. 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  $\mu\text{m}$  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

### 3.1 세포 나이에 따른 수소생산

녹조류인 *C. reinhardtii* 세포는 성장단계와 세포 밀도에 따라 수소 생산성이 달라졌다. 세포밀도에 따른 수소생산량은 건조세포 질량 0.435g/l, 0.71g/l, 0.96 g/l 의 순서대로 증가하였고, 1.4 g/l 에서는 오히려 감소하였다. 또한, 성장단계에 따른 수소생산량은 늦은지수성장기, 중간지수성장기, 이른지수성장기 순서대로 감소했으며, 정지기 때는 이른지수성장기 때와 수소생산량이 비슷하였다 (Fig.1)<sup>(4)</sup>.

이 성장단계와 세포질량에 따라 수소생산량에 차이가 나는 것은 황결핍 시 잔여 황성분의 양을 살펴보면 알 수 있다. 잔여 황성분의 역할은 완전히 황결핍이 되기 전까지 PSII 활성을 조절하고, hydrogenase 효소를 생합성한다. 표 3에서도 볼 수 있듯이 세포 밀도가 높을수록, 잔여 황성분이 황결핍 배지 내에 더 많이 존재했다. 따라서 잔여 황성분이 증가함에 따라 광합성이 활발히 일어나기 때문에 세포밀도가 높아질수록 Chlorophyll 변화량도 증가했다.

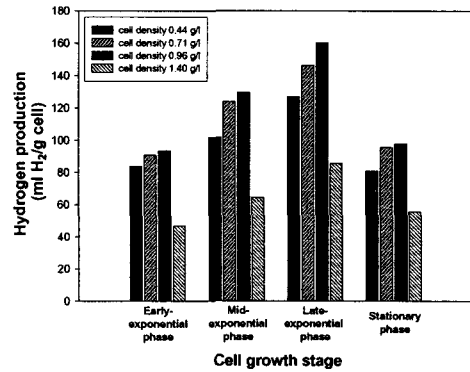


Fig. 1 성장 단계와 세포 초기 밀도에 따른 수소 생산.

Table 1. 황결핍 후 배지내 잔여 황성분의 농도

DCW (g/l)	1.4	0.96	0.71	0.44
잔여 Sulfate 양(mg/l)	2	1.8	1.5	1.2

### 3.2 빛 세기에 따른 수소생산

빛 세기에 따른 수소생산량을 살펴보면, 60 ~ 200  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ 까지는 빛 세기가 증가할수록 수소생산량도 차례로 증가하였고, 200  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ 에서 수소생산량이 220 ml H<sub>2</sub>/l 로 가장 높았다[Fig. 2]. 조류 시스템을 이용한 수소생산은 PSII의 잔여 활성이 가장 중요한 요소가 된다. 빛이 강할수록 세포의 광합성량(산소 발생량)이 더 높아지게 되는데, 이는 PSII에서 물분해를 통한 수소 생산 시 이용되는 가용전자가 많이 발생함을 알 수 있다<sup>(5)</sup>. 이렇게 많이 생산된 전자는 황결핍(혐기 조건) 시에 hydrogenase에 의해 2H<sup>+</sup>에 전자 두 개를 전달하여 수소로 합성된다. 따라서 더 강한 빛을 조사할 때 PSII 잔여 활성이 높아져 수소 생산이 높아지게 된다. 하지만 빛 세기가 300  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$  일 때, 70시간까지는 200  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$  때와 같이 비슷하게 수소생산이 되었으나 그 이후부터는 급격하게 수소생산량이 줄어들었다.

이는 그림 9에서, 300  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ 의 빛을 조사했을 때 세포 개수를 살펴보면 70시간 이후에 세포 개체수가 급격히 감소하는 것을 볼 수 있다. 황결핍 상태에서 빛 세기가 너무 강하면 Photosystem II의 D1 단백질이 데미지를 받게 되어 물 분해를 통한 전자 생산이 저해 받게 된다. 따라서 전자전달이 잘 이루어지지 않는 세포는 황결핍 환경, 즉, 혐기상태에서 ATP 생산을 할 수 없게 되어 급격하게 사멸되게 되는 것 같다. 따라서 이렇게 소실된 세포 때문에 300  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ 에서 수소생산량이 줄어들게 되는 것 같다. 또한, 다른 이유로는 세포 내부의 chlorophyll 양도 시간이 지남에 따라 약한 빛 보다 더 급격히 감소했기 때문이라고 보

여 진다[Fig. 3]. Chlorophyll 양은 빛이 강하면 강할수록 더 잘 분해되기 때문이다.

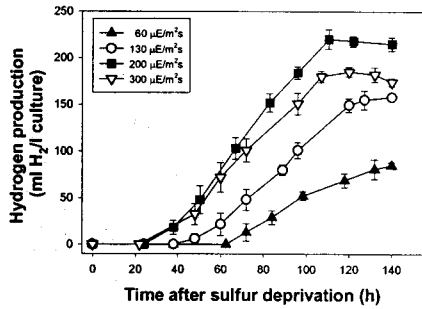


Fig. 2 황결핍 후 빛에 따른 수소생산.

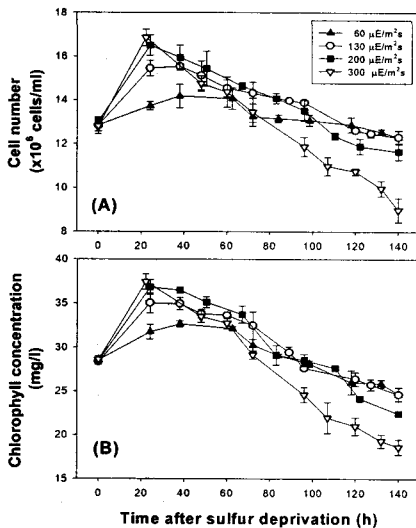


Fig. 3 황결핍 후 빛에 따른 세포수와 chlorophyll의 변화.

### 3.3 황 농도에 따른 수소생산

황결핍 시 잔여 황농도에 따른 수소생산량을 알아보기 위하여, TAP-S 배지로 세포를 세척한 후 황성분을 농도별(0, 15, 30, 60, 120 μM)로 재첨가하여 200 μE/m<sup>2</sup>s의 빛에서 140 시간 동안 배양하였다(Fig. 4). 수소생산량은 0-30 μM의 황성분을 재첨가 해주었을 때까지는 순차적으로 증가하였고, 60 μM의 황농도를 재첨가 해주었을 때는 황성분을 첨가해 주지 않았을 때보다 감소하였다. 그리고 황성분 120 μM을 재첨가 하였을 때는 수소생산이 되지 않았다. 이러한 황성분의 재첨가는 황결핍시 PSII의 활성에 영향을 주어, 수소 생산 시 이용되는 전자의 발생을 증가시켜준다. 따라서 30 μM의 황성분을 재첨가 해주었을 때, PSII의 활성이 가장 많이 증가한 것으로 사료된다. 또한 60 μM의 황성분을 재첨가 해주었을 때는 Fig. 4

에서 보여준 것처럼 수소발생 시간이 약 24시간 정도 늦어졌다. 이는 다소 높은 황농도 때문에 배지내의 황결핍이 지연되어, hydrogenase 유도가 되는 시간과 전체 수소발생 시간이 줄어들어 황성분을 재첨가 하지 않았을 때보다 수소생산량이 줄어드는 것을 알 수 있었다. 하지만 황성분 120 μM을 재첨가 해주었을 때는 배지내 황성분이 너무 많이 존재하게 되어 황결핍이 일어나지 않게 된다(Fig. 5). 따라서 혐기 상태에서만 활성을 갖는 hydrogenase가 유도되지 않아 수소생산이 되지 않는 것으로 사료된다.

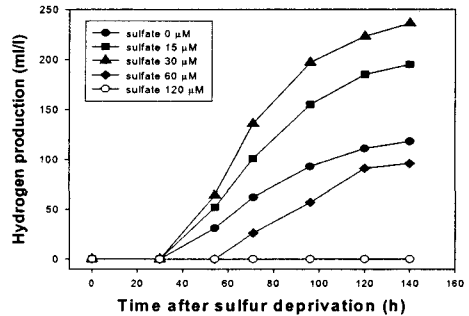


Fig. 4 황결핍 후 황성분 재첨가에 따른 수소생산

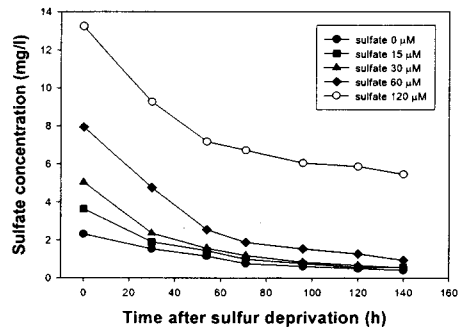


Fig. 5 황결핍 후 배지내 황성분 농도

### 3.4 황재첨가에 의한 연속수소생산

황결핍 후 황성분의 재첨가에 의해 연속적인 수소생산을 수행하였다. 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.

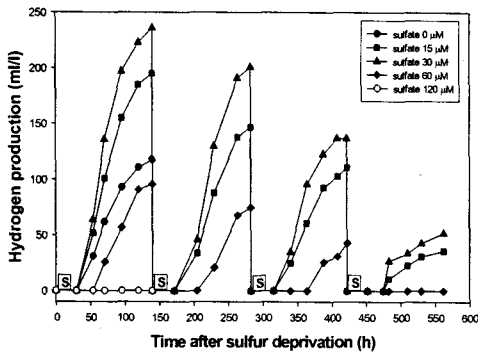


Fig. 6 황결핍 후 황성분 재첨가에 의한 연속적인 수소생산

또한 전체적으로 황결핍 시간이 지날수록 수소생산량이 감소하는 세포의 사멸과 pH의 증가(약 8.6 까지 증가) 때문인 것으로 사료된다 (Fig. 4). 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>(6)</sup>. 따라서 황성분의 재첨가에 의한 수소생산은 세포개체수의 사멸과 pH 변화를 막고 유지 시켜주는 것이 중요하다.

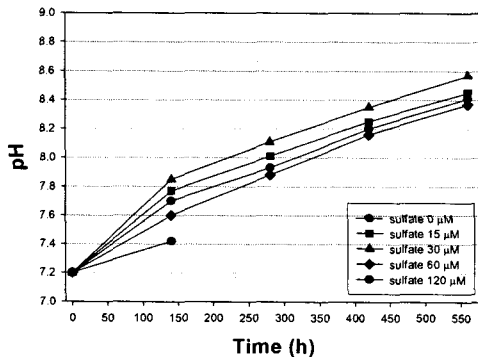


Fig. 4 황결핍 후 시간에 따른 pH의 변화

#### 4. 결론

우리는 황결핍 후 수소생산 영향을 미치는 중요한 인자들을 실험을 통해 밝혀내었다. 황결핍 조건에서 수소생산 시 고려해야할 점은 낮은 지수성장기의 세포가 다른 성장 단계의 세포보다 활성을 갖기 때문에 이 때의 세포를 수확하여 배양해야하고, 또한 광합성을 하기에 적합한 빛 세기를 고려하여 그림자 효과가 없이 골고루 세포에게 빛이 전달되게 하는 것이 중요하고 황성분의 적당한 재첨가로 인해 PSII의 활성을 유지하는 것도 황결핍

에 의한 수소생산에서는 고려해야만 한다.

황성분의 재첨가에 의한 수소생산은 세포배양시간을 줄여 시간당 수소생산량을 극대화하는 기술로써 성장속도가 다른 혐기박테리아 보다 느리기 때문에 이 기술은 조류배양을 통한 수소생산에 있어 꼭 개발되어야할 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.

#### References

- [1] Ghirardi, M. L., L. Zhang, J. W. Lee, T. Flynn, M. Seibert, E. Greenbaum, and A. Melis, 2000, "Microalgae: a green source of renewable H<sub>2</sub>". Trends Biotechnol. vol. 18, pp. 506-511.
- [2] Harris, E. H., 1998, "The *Chlamydomonas* sourcebook", pp. 607-608, Academic Press, Inc., San Diego, California, U.S.A.
- [3] Kosourov, S., A. Tsygankov, M. Seibert, and M. L. Ghirardi, 2002, "Sustained hydrogen photoproduction by *Chlamydomonas reinhardtii*: Effects of Culture Parameters". Biotechnol. and Bioeng., vol. 78, pp. 731-740.
- [4] Kim, J. P., C. D. Kang, S. J. Sim, M. S. Kim, T. H. Park, D. H. Lee, D. J. Kim, J. H. Kim, Y. K. Lee, D. Pak (2005) Cell age optimization for hydrogen production induced by sulfur deprivation using a green alga *Chlamydomonas reinhardtii* UTEX 90, *J. Microbiol. Biotechnol.* 15, 131-135.
- [5] Laurinavichene, T., I. Tolstygina, A. Tsygankov (2004) The effect of light intensity on hydrogen production by sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii*, *J. Biotech.* 114, 143-151.
- [6] Kosourov, S., M. Seibert, and M. L. Ghirardi, 2003, "Effect of extracellular pH on the metabolic pathway in sulfur-deprived, H<sub>2</sub>-producing *Chlamydomonas reinhardtii* culture", *Plant Cell Physiol.* vol 44, pp. 146-155.