

## 광반응기와 *Euglena gracilis* Z를 이용한 이산화탄소 고정화 공정의 거동 특성

신 항 식 · †채 소 용 · <sup>1</sup>황 응 주 · 임 재 림 · 남 세 용  
한국과학기술원 토목공학과, <sup>1</sup>NTU, Singapore  
(접수 : 2000. 10. 27., 게재승인 : 2000. 12. 14.)

## The Behavior of a CO<sub>2</sub> Fixation Process by *Euglena Gracilis* Z with a Photobioreactor

Hang-Sik Shin, So-Ryong Chae†, Eung-Ju Hwang<sup>1</sup>, Jae-Lim Lim, and Se-Yong Nam  
Department of Civil Engineering, KAIST, Taejon 305-701, Korea  
<sup>1</sup>Nanyang Technological University, Singapore  
(Received : 2000. 10. 27., Accepted : 2000. 12. 14.)

Biological fixation of carbon dioxide using microalgae is known as an effective CO<sub>2</sub> reduction technology. However, many environmental factors influence microalgal productivity. Optimal cultivation factors were determined for the green alga, *Euglena gracilis* Z, which offers high protein and vitamin E content for animal fodder. In batch culture in a photobioreactor, it was found that the initial pH, temperature, CO<sub>2</sub> concentration in air, and light intensity during the optimal cultivating conditions were 3.5, 27°C, 5-10% and 520 μmol/m<sup>2</sup>/s, respectively. When tap water and freshwater were used as cultivating media unsterilized tap water was found to be effective. A kinetic model was considered to determine the relationship between the specific growth rate and the light intensity. The half-velocity coefficient (K<sub>i</sub>) in the Monod model under photoautotrophic conditions was 978.9 μmol/m<sup>2</sup>/s.

**Key Words** : biological carbon dioxide fixation, *Euglena gracilis* Z, photobioreactor, kinetic model

### 서 론

우리가 살아가는 지구 생태계의 자정 능력은 제한되어 있는데, 인구 증가와 더불어 사람들의 소비 욕구도 끊임없이 증가하여 에너지 및 자원의 고갈은 물론, 오염물의 무분별한 대량 방출로 자연 생태계에 많은 부담을 주고 있다. 과학의 빠른 발전으로 인하여 발생한 자연 환경 훼손 등의 부작용에 대하여 지구촌의 관심이 증대하고 있다. 특히, 지구의 평균 기온을 상승시켜 해수면 상승을 초래하고, 엘니노(El-Nino) 현상과 같은 이상 기후의 발생을 증가시키고 있는 지구 온난화 현상에 많은 관심이 모아지고 있다(1). 지구 온난화는 대기 중에 존재하는 온실 효과 가스(Greenhouse effect gas)가 주범인 것으로 알려져 있는데, 대표적인 온실 효과 가스에는 CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O, CH<sub>4</sub> 등이 있고, 이들 중 화석 연료의 연소에서 대량 발생하는 이산화탄소가 가장 큰 영향(전체의 55% 이상)

을 주고 있는 것으로 알려져 있다(2). 한편, 1994년 3월 “기후변화협약(FRAME WORK CONVENTION on CLIMATE CHANGE)”이 발효된 이후로 이산화탄소 배출량 감축을 위한 국제적 논의가 진행되고 있으며, 배출되는 이산화탄소를 효율적으로 제어 및 제거할 수 있는 기술 개발에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 우리 나라의 경우는 전체 연료 사용량 중 화석 연료 의존도가 90%에 가까우며 온실가스 배출이 세계 배출량의 1.8%(1997년 세계 11위)로서 꾸준히 증가하고 있는데, OECD 가입국으로서 이산화탄소 배출량을 감축하는 조치의 시행이 불가피한 상황이다(3).

산업 활동에 저해를 일으키지 않고 이산화탄소를 제어하는 방법으로는 물리·화학적 제어 방법, 생물학적 고정화 방법, 해양 투기법 등이 사용되고 있는데, 생물학적 방법은 자연계의 탄소 순환을 이용하는 것으로 가장 환경 친화적인 방법으로 알려져 있으며 1980년대 중반 이후로 일본 및 국내에서 활발한 연구가 이루어지고 있다(4-7). 특히 이 방법은 광합성 효율이 고등 식물에 비해 우수하고 상온·상압에서 반응이 진행되는 장점을 가지고 있다. 그러나, 고농도·대량 배양의 어려움, 반응기의 scale-up으로 인한 고정화 효율 저하, 생산된 biomass의 처분 등이 문제점으로 지적되고 있다. 이러한

†Corresponding Author : Dept. of Civil Engineering, KAIST, 373-1, Kusong-dong, Yusong-gu, Taejon 305-701, Korea  
Tel. : +82-42-869-5653, Fax: +82-42-869-3610  
E-mail : issac75@kaist.ac.kr

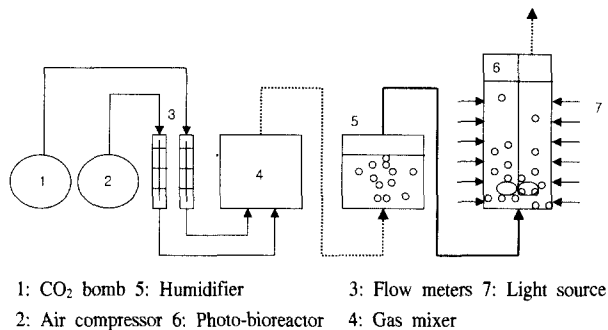


Figure 1. Schematic diagram of a photobioreactor.

문제점을 해결하기 위해서는 고농도·대량 배양이 가능한 반 연속식 또는 연속식 배양 시스템의 개발이 필요하며, 광활용 효율의 저하를 방지하며 장기간 지속적으로 이산화탄소를 고정화 할 수 있는 운전 인자의 도출이 필수적이고, 생산된 biomass를 적절히 재활용하여 또 다른 폐기물이 생성되는 것을 예방할 수 있어야 한다. 미세조류의 대량 배양을 위한 광반응기의 중요한 환경인자로는 광도, 온도, pH, CO<sub>2</sub> 농도, 질소, 인 등의 영양 물질이 있는데, 이 중에서 다른 환경 인자보다도 광도에 대한 중요성을 인식하여 미세조류가 필요로 하는 빛을 적절히 공급 위한 다양한 연구가 진행되었다(4-7).

따라서, 본 연구에서는 높은 이산화탄소 고정화율을 가지면서 장기간 운전할 수 있는 연속 배양 장치의 배양 방법을 확립하기 위하여, 산성 조건에서도 잘 성장하며 오염의 가능성이 적고, 고농도 이산화탄소에 대한 내성이 강하며, 단백질 함량이 풍부하고 세포벽이 얇아 배양 후 사료로의 이용성도 큰 *Euglena gracilis* Z를 이용한 이산화탄소 고정화 공정의 거동과 광도에 대한 미세조류의 성장 특성을 조사하였다(8-9).

재료 및 방법

균주 및 배지

본 실험에서 사용된 균주는 고농도 이산화탄소에서도 성장이 활발하고 단백질 함량이 풍부하며 세포벽이 얇아 동물의 사료로서의 이용성이 높은 *Euglena gracilis* Z를 이용하였으며, Osaka Prefecture Univ.로부터 기증 받아 사용하였다. 배양을 위해서 자체에 탄소원이 포함되어 있지 않은 modified Cramer-Myers 배지를 수돗물에 제조하여 특별한 경우를 제외하고는 멸균하지 않고 pH를 3.5로 조정하여 사용하였다(10).

광반응기

본 실험에서는 높이가 69 cm, 두께가 10 mm, 표면적이 625 cm<sup>2</sup>인 아크릴로 제작된 Jar-fermenter (유효부피=25L) 사용하였다. 광도는 반응기 측면에 형광등 (FL20SD/18)을 설치하여 형광등의 수로 빛의 세기를 조절하였고, 10%의 이산화탄소 농도가 되도록 공기와 이산화탄소를 혼합한 후 총 2 vvm의 유량으로 조절하였으며, 가스 공급에 의한 배지의 증발을 막기 위해 water mixer를 거쳐 100% 습도로 포화시킨 후 반응기에 공급하였다. *E. gracilis* Z는 실험을 진행하기 전 예비 배양에서 같은 조건을 유지하며 2주 이상 순용시킨 후 3-5%(v/v)

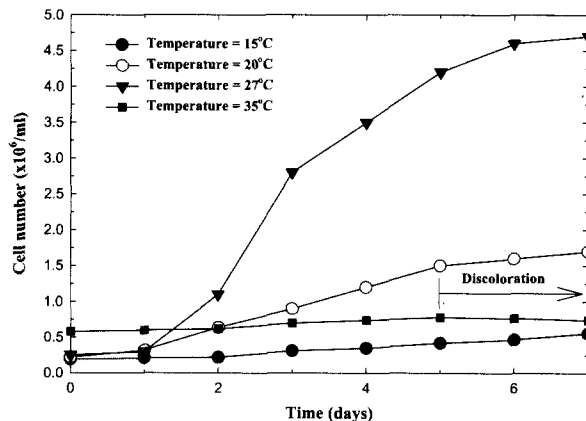


Figure 2. Growth of *E. gracilis* Z with temperature (CO<sub>2</sub> 10%, 110 μmol/m<sup>2</sup>/s, pH 3.5).

로 접근 하였다. 반응기내에 원활한 가스 공급과 교반을 위해서 상단에 교반기를 설치하여 운전하였다. 각 조건에서 회분식 실험을 진행하기 전에 미세조류가 순용할 수 있도록 동일한 조건에서 2-3주 동안 예비 배양을 실시하였다.

분석방법

미세조류의 성장 상태를 파악하기 위해 건조 무게를 시료 10 ml 취하여 0.45 μm membrane filter로 여과한 후 80°C oven에서 24시간 건조한 후 무게 차이로 결정하였다. 그리고 세포 수는 위상차 광학 현미경(ZEISS, Germany)과 hemocytometer를 이용하여 직접 계수 하였다(11). 반응기에 공급되는 광도는 LI-250 light meter(quantum sensor, LI-COR, Inc. USA)를 이용하여 반응기 표면적을 같은 면적으로 등분하여 측정 한 후 평균값으로 구하였다. 한편, 미세조류의 단위 무게당 이산화탄소 고정화 능력을 평가하기 위하여 원소 분석을 실시하였는데, *E. gracilis* Z를 배양한 후 3000 rpm에서 5분 동안 원심분리 하고, 80°C oven에서 하루 동안 건조시킨 후, 50 mg을 준비하여 TCD detector를 장착한 EA1110-FISONS 원소 분석기를 사용하여 분석하였다. C, H, N, S, O의 구성 비는 각 실험 조건에서 채취하여 전처리한 미세조류를 5번 측정하여 평균값을 구했다.

실험 결과 및 고찰

온도, 초기 pH 및 이산화탄소 농도 변화에 따른 미세조류의 성장 특성

배양 온도가 미세조류의 성장에 미치는 영향을 알아보기 위하여 water bath를 이용하여 수온을 15, 20, 27, 35°C로 변화시켜 가며 실험하였다. 그 결과 Figure 2에서 볼 수 있듯이 27°C에서 가장 좋은 성장을 나타내었으며, 15°C와 35°C에서 배양할 때는 정상적인 성장이 이루어지지 않았다. 특히, 35°C에서 배양했을 경우에는 배양시작 후 7일째에 미세조류의 색이 변하고 세포 수 및 세포량이 감소하는 것으로 조사되었다. 한편, 초기 pH를 3.5, 7, 9로 변화시켜 가며 미세조류의 성장을 관찰한 결과 Figure 3에서와 같이 초기 pH 3.5에서 가장 좋은 성장을 나타내었다.

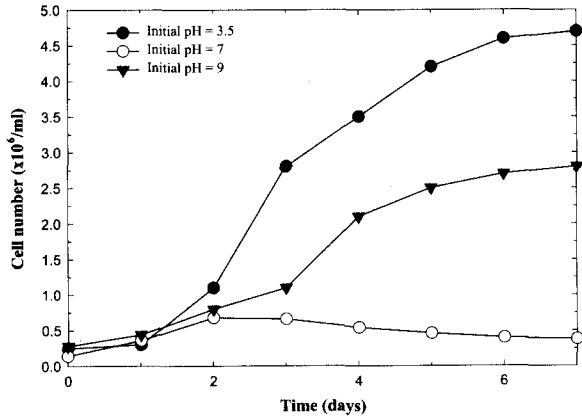


Figure 3. Growth of *E. gracilis* Z with initial pH ( $\text{CO}_2$  10%,  $110 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ ,  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ ).

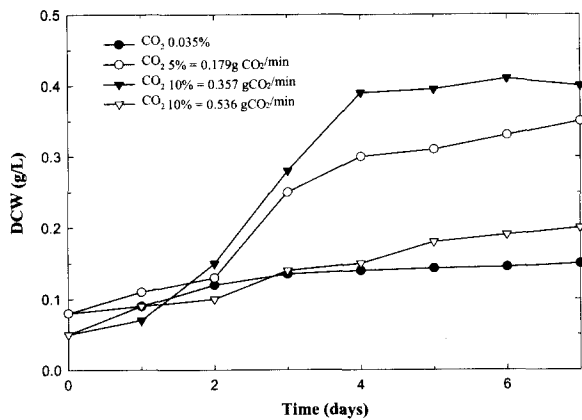


Figure 4. Growth of *E. gracilis* Z with  $\text{CO}_2$  concentration ( $520 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ ,  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , pH 3.5).

한편, 이산화탄소 농도가 미세조류의 성장에 미치는 영향을 알아보기 위해서  $\text{CO}_2$  농도를 0.035, 5, 10, 15% (vol/vol)로 변화시켜 가며 *E. gracilis* Z의 성장을 관찰하였다. 실제로, 발전소에서는 연료의 종류에 따라 15%(중유), 13%(석탄), 10%(LNG)의 이산화탄소가 배출되고 있으므로 이산화탄소의 저감화를 위해 미세조류를 대량 배양할 경우는 이러한 연구가 반드시 선행되어야 한다고 사료된다. 그 결과 Figure 4에서와 같이  $\text{CO}_2$  농도 5%와 10%에서 비슷한 성장을 나타내었으며,  $\text{CO}_2$  농도 15%에서는 성장 속도가 감소하였다.

**배지 상태가 미세조류의 성장에 미치는 영향**

현재 실험실 규모로 수행되는 대부분의 미세조류 배양에 관한 연구는 배지의 오염을 최소화하기 위해서 autoclave를 이용하여 멸균한 후에 사용하고 있다. 그러나, 이산화탄소의 효과적인 고정화를 위해 미세조류를 대량으로 배양할 경우 현장에서 많은 양의 배지를 화학적으로 멸균하는 것은 운영비용의 증가를 초래한다. 따라서, 본 연구에서는 *E. gracilis* Z가 잘 성장하는 약 산성(pH 3.5) 조건에서는 곰팡이나 다른 미생물에 의한 오염이 적을 것이라는 점에 착안하여 멸균 또는 멸균하지 않은 수돗물을 사용하여 제조한 배지에서의 미세조류의 성장 특성을 조사하였다. 그 결과 Figure 5에서와

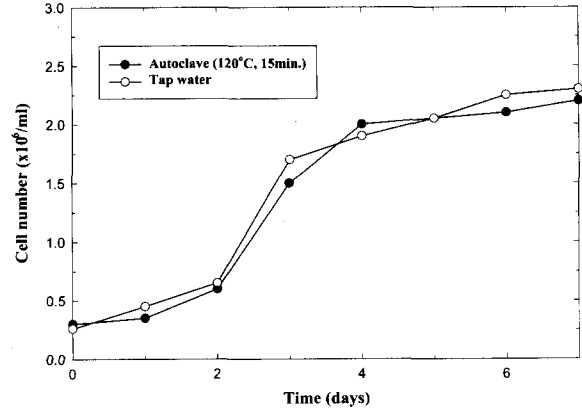


Figure 5. Growth of *E. gracilis* Z with sterilization conditions ( $520 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ ,  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $\text{CO}_2$  10%).

같이 멸균하지 않은 수돗물을 사용하여 배양한 경우에도 비슷한 성장이 이루어지는 것을 관찰하였다. 따라서, 이러한 연구 결과는 *E. gracilis* Z의 성장 특성상 대량 배양할 경우에 큰 장점으로 작용할 것으로 사료된다.

**Euglena gracilis Z에 의한 이산화탄소 고정화**

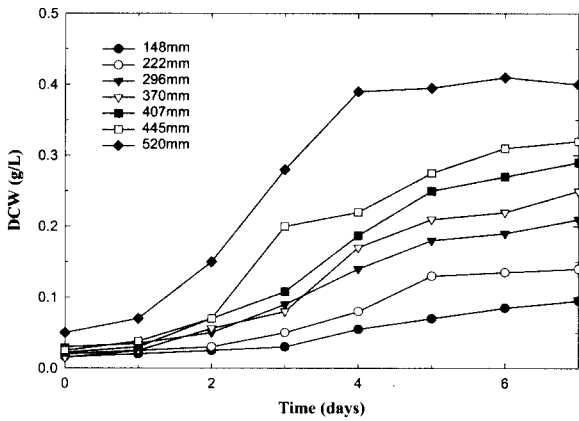
*Euglena gracilis* Z에 의해 고정화된 이산화탄소의 양은 외부에서 이산화탄소 가스 외에 다른 탄소원을 공급하지 않았기 때문에 배양후 미세조류의 C, H, O, N, S 원소 성분을 분석하면 간접적으로 계산할 수 있다. 원소 분석 결과에 의하면 배양된 *E. gracilis* Z의 C, H, O, N의 구성비는 각각 64.8, 7.7, 13.7, 13.8%이었다. 그 결과 *E. gracilis* Z의 분자식을  $\text{C}_{6.28}\text{H}_{8.88}\text{ON}_{1.15}$ 로 나타내었으며, 이로부터 계산한 분자량은 116.3 g이었다. 그리고, 수율계수(yield coefficient)  $Y_{\text{cell}/\text{CO}_2}$ 는 0.42 g cell/g  $\text{CO}_2$ 로 나타났는데, 이러한 결과는 *E. gracilis* Z가 1 g 배양될 때 2.38 g의 이산화탄소를 고정화 할 수 있음을 의미한다. 한편, 국내의 다른 연구자는 *Chlorella* sp. HA-1의 경우 1 g 미세조류가 성장할 때 1.6 g의 이산화탄소가 고정화된다고 보고하였다(12). 그러나, 이러한 이산화탄소 고정화 능력은 배양기 내에서 유지할 수 있는 미세조류의 한계 농도와도 밀접한 관련이 있으므로, 효율적인 이산화탄소 고정화를 위해서는 배양기 내에서 미세조류를 고농도로 유지하는 기술의 개발이 필수적이라고 판단된다. 따라서, 현재 본 실험에서 사용한 배양기를 이용할 경우에는 미세조류의 농도가 1 g/L(건조무게)까지 증가하였으나, 향후 반응기의 개선 및 환경인자의 개선 (광도 증가 등의 방법)을 통해서 보다 고농도의 배양이 필요하다고 판단된다.

**광도가 미세조류 성장에 미치는 영향**

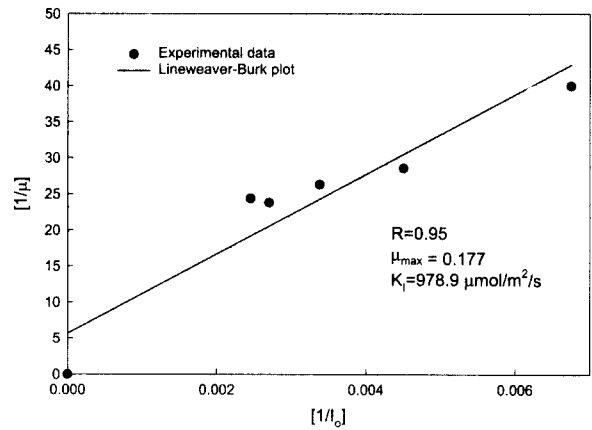
광합성을 하는 미세조류에게 빛은 유일한 에너지원이다. 본 연구에서는 광도를 형광등 수를 변화시켜 가며  $148\text{-}520 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ 로 유지하여 실험하였다. 그 결과 Figure 6에서와 같이 광도  $520 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ 에서 최종 건조 무게는 0.4 g/L로 가장 좋은 성장을 나타내었다. 이 범위에서 최종 세포수와 광도는 Figure 7와 같이 직선적인 상관관계를 나타내었고, 본 실험에서 사용한 빛의 범위 ( $148\text{-}520 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ )에서는 빛에 의한 저해 현상(photoinhibition)은 관찰되지 않았다.

**Table 1.** Specific growth rates of *E. gracilis* Z with external light intensity

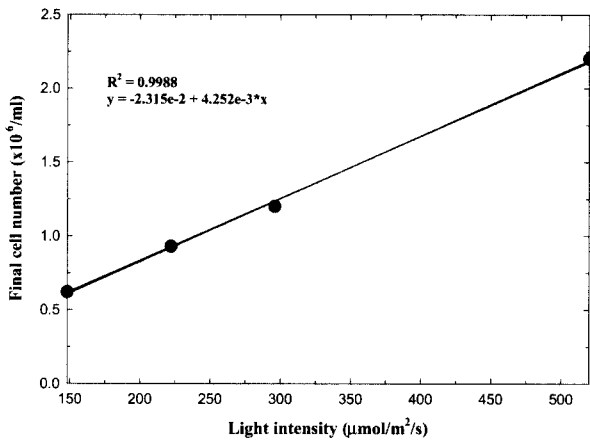
External light intensity, I <sub>o</sub> (μmol/m <sup>2</sup> /s)	0	148	222	296	370	407	445	520
Specific growth rate, μ (hr <sup>-1</sup> )	0	0.025	0.035	0.038	0.042	0.035	0.041	0.033



**Figure 6.** Growth of *E. gracilis* Z with light intensity (CO<sub>2</sub> 10%, 27±1°C, pH 3.5).



**Figure 8.** Estimation of kinetic parameters with Lineweaver-Burk plot (27±1°C, pH 3.5, CO<sub>2</sub> 10%).



**Figure 7.** Linear relationship between final cell number and light intensity.

**광도 변화에 의한 Euglena gracilis Z의 거동 특성**

광에너지는 광합성 미생물의 성장에 있어서 이산화탄소의 농도와 더불어 성장을 결정 짓는 중요한 요소가 된다. 미생물의 성장을 나타내는 일반적인 Monod식과 유사하게 광합성 미생물의 성장을 광도에 대한 비성장속도로 표현한 식들은 다음과 같다. Lee(13) 등의 연구자는 평균 광도(I<sub>av</sub>)를 사용하여 다음과 같이 표현하였다.

$$\mu_{av} = \frac{\mu_{max} * I_{av}}{K_L + I_{av}}$$

여기서, K<sub>L</sub>은 광 포화상수(μmol/m<sup>2</sup>/s)이고, I<sub>av</sub>는 평균 광도(μmol/m<sup>2</sup>/s)이다.

한편, 광 저해(photoinhibition) 영향에 대해서는 Aiba(15) 등의 연구자는 광 포화점을 초과하여 광에너지가 공급될 경우 성장 저해를 일으켜 다음과 같은 식을 따른다고 하였다.

$$\mu_{av} = \frac{\mu_{max} * I_{av}}{K_L + I_{av} + K_i I_{av}^2}$$

본 연구에서 사용한 광도 범위에서는 광 저해(photoinhibition) 현상이 발견되지 않았으므로(Figure 5 참조), Lee(13) 등의 연구자들이 표현한 식을 사용해서 동력학 계수들을 구했다. 이때 비성장속도(specific growth rates) 값은 대수성장기인 2-4 일 동안의 값을 이용하여 구했다.

$$\mu = \frac{\mu_{max} * I_o}{K_I + I_o}$$

여기서, μ = 비성장속도(hr<sup>-1</sup>), μ<sub>max</sub> = 최대비성장속도(hr<sup>-1</sup>), I<sub>o</sub> = 외부평균광도(μmol/m<sup>2</sup>/s), 그리고 K<sub>I</sub> = 반속도상수(μmol/m<sup>2</sup>/s)이다.

일정한 이산화탄소 농도에서 실험한 결과를 광도에 대한 비성장속도의 변화로 다음 Table 1에 정리하였다. 그리고, Figure 8에서 Monod식으로부터 구한 반속도상수는 978.9 μmol/m<sup>2</sup>/s 이었고, 최대비성장속도는 0.177 hr<sup>-1</sup>이었다. 일반적으로 Monod model은 생물이 성장하는데 필요한 주요 기질이 제한인자(substrate limited)로 작용할 때의 성장 형태를 표시하기 위해 사용된다. 따라서, Monod model로부터 구해진 반속도상수의 값이 작을수록 기질에 대한 친화도가 좋은 것으로 해석할 수 있는데, 이러한 값은 미세조류의 종류에 따라 크게 변화하고 적용하는 model식에 따라서 많은 차이를 보이고 있다(14). 따라서, 미세조류의 광합성 작용을 통해 CO<sub>2</sub>를 고정화 하고자 하는 경우에는 이러한 반속도상수 등의 광도에 대한 친화도 및 이용 효율 등을 고려하여 미세조류와 반응기 종류를 선정하는 것이 중요하다고 판단된다.

**요 약**

광반응기를 이용하여 *E. gracilis* Z를 회분식으로 배양하였

을 때 최적 온도는 27°C, 초기 pH는 3.5, CO<sub>2</sub> 농도는 10%, 광도는 520 μmol/m<sup>2</sup>/s인 것으로 확인하였다. 본 실험에서 적용한 광도 범위에서는 광도가 증가할수록 미세조류의 성장이 증가하는 것으로 나타났으며, 광도에 의한 미세조류의 성장 영향을 정확하게 파악하기 위해서는 보상점 및 광포화점을 도출하는 것이 필요하다고 판단된다. 한편, 배양된 미세조류의 원소 분석결과 평균적으로 *E. gracilis* Z cell 1 g 당 2.38 g의 CO<sub>2</sub>를 고정화하는 것으로 나타났다. 비멸균 수돗물 배지를 사용하여 미세조류를 배양한 경우에도 정상적인 성장이 관찰되었는데, 이 결과를 바탕으로 scale-up을 통한 현장 적용시 배지를 화학적으로 멸균하는 단계를 생략하는 것이 가능할 것으로 판단된다. 마지막으로 일정한 조건에서 외부에서 조사되는 광도를 변화시켜 가며 *E. gracilis* Z의 성장 동력학 상수를 구했다. 이 때 광 저해 현상이 관찰되지 않아 Lineweaver-Burk plot를 적용했으며, 이로부터 구한 반속도상수(K)는 978.9 μmol/m<sup>2</sup>/s이었고, 최대비성장속도 (μ<sub>max</sub>)는 0.177 hr<sup>-1</sup>이었다. 결론적으로 *Euglena gracilis* Z의 배양을 통한 이산화탄소 고정화 공정에서 이산화탄소 농도 변화에 따라 미세조류의 성장이 민감하게 반응했으나, 본 실험에서 사용한 광도 범위에서는 빛의 강도가 증가함에 따라 미세조류의 성장도 증가하는 것으로 조사되었다. 따라서, 향후 광도 증가에 대한 미세조류의 성장 한계에 대해서 보다 집중적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

이러한 연구 결과가 향후 발전소 등에서 대량 배출되는 이산화탄소의 저감을 위해 사용된다면, 지구 온난화 방지에 대한 적극적인 대응책으로 제시될 수 있을 것으로 사료된다.

## 감 사

이 논문은 농림부에서 시행한 농림기술개발사업(과제번호 298038-3)의 연구결과입니다. 또한, 이 논문은 2000년도 두뇌한국21사업에 의하여 지원되었으며 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

1. W. A. Apel, M. R. Walton, and P. R. Dugan (1994), An evaluation of autotrophic microbes for the removal of carbon dioxide from combustion gas streams, *fuel processing technology*, **40**, 139-149.
2. S. H. Schneider (1989), The greenhouse effect: science and policy, *Science*, **243**, 771-781.
3. Ministry of Environment (1998), Summary of "FRAME WORK CONVENTION on CLIMATE CHANGE"
4. S. B. Lee, C. B. Park, and Y. S. Se (1995), Development of Biological Carbon Dioxide Fixation Process, *Chem. Ind. Technol.*, **1**(1), 11-14.
5. J. Y. Lee, H. A. Kang, and J. W. Yang (1999), The Characteristics of Carbon Dioxide Fixation by *Chorella* sp. HA-1 in Semi-continuous Operation, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **14**(16), 742-746.
6. Ministry of Environment (1996), Study on Greenhouse Gases Control and Utilization, Research Report (9-7-2), 321-400.
7. Ministry of Environment (1997), Chemical & Biological Fixation of Carbon Dioxide, Research Report (9-7-2).
8. B. S. Park (1994), *Euglena*: Research trend and application as a new material. *J. KOWREC*, **2**(1), 135-144.
9. N. Nakano et al. (1998), Biomass Production by Microalgae, *CELSS J.*, **10**, 13-23.
10. M. Cramer and J. Myers (1952), Growth and photosynthetic characteristics of *Euglena gracilis*, *Arch. Mikrobiol.*, **17**, 384-402.
11. D. L. Spector, R. D. Goldman, L. A. Leinwand (1998), Cells a laboratory manual (Culture and Biochemical analysis of cells), p. 2.8-2.9, CSHL press.
12. J. Y. Lee (2000), A Study on Biological Carbon Dioxide Fixation using Microalgae, M. S. Thesis, KAIST.
13. H. Y. Lee, L. E. Erickson, and S. S. Yang (1987), Kinetics and Bioenergetics of light limited photoautotrophic growth of *Spirulina platensis*. *Biotech. Bioeng.*, **29**, 832-843.
14. S. Abis (1982), Growth kinetics of photosynthesis microorganisms. *Adv. Biochem. Eng.*, **23**, 85-156.
15. J. K. Kim, N. K. Kim (1998), The Behaviour of *Synechocystis* PCC 6803 with Light Intensity, *KSEE*, **20**(10), 1467-1476.