

*Chlamydomonas reinhardtii*를 이용한 암반응에서의 수소 및 유기물 생산 최적화

¹공경택 · [†]심상준 · ³박대원 · ⁴김미선 · ¹박태현
서울대학교 응용화학부¹, 성균관대학교 화학공학과², 한국과학기술연구원 수질환경 및 복원연구센터³
한국에너지기술연구원 바이오매스팀⁴
(접수 : 2002. 12. 3., 게재승인 : 2003. 2. 24.)

Optimization of Organic Compounds and Hydrogen Production in Dark Fermentation using *Chlamydomonas reinhardtii*

Gyeong Taek Gong¹, Sang Jun Sim^{2†}, Daewon Pak³, Mi Sun Kim⁴, and Tai Hyun Park¹

¹School of Chemical Engineering, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

²Department of Chemical Engineering, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea

³Water Environment & Remediation Research Center, Korea Institute of Science and Technology, Seoul 136-791, Korea

⁴Biomass Research Team, Korea Institute of Energy Research, Daejeon 305-343, Korea

(Received : 2002. 12. 3., Accepted : 2003. 2. 24.)

The objective of this study was to optimize culture conditions and to produce hydrogen and organic compounds using microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. First of all, *C. reinhardtii* UTEX 90 was chosen from the three kinds of strains in terms of their hydrogen and organic compound productivity. The optimum CO₂ concentration range of *C. reinhardtii* UTEX 90 was 1 to 3%. We tested two medium, which are popular in this microalga culture; Bristol's medium and TAP medium (8). The cell growth in TAP medium was found to be higher than a Bristol's medium. Optimum culture with 3% of CO₂ in TAP medium produced the most hydrogen (0.5 μ mol/ mg DCW), though Bristol's medium produced twice as much total organics.

Key Words : *Chlamydomonas reinhardtii*, biological hydrogen production, organic compounds, growth optimization

서 론

화석 연료를 기반으로 하는 에너지는 자원의 양이 한정되어 있다는 결정적인 단점이 있다. 그 뿐 아니라 화석에너지는 연소할 때 이산화탄소를 발생시킨다. 이런 이산화탄소로부터 비롯되는 온실 효과는 지구의 온도를 높임으로써 지구 생태계에 큰 악영향을 미치고 있다. 화석에너지의 이러한 자원의 한정성과 지구에 미치는 악영향 때문에 새로운 대체 에너지로서 태양 에너지가 각광받고 있다. 또한 태양에너지는 재생산이 가능한 에너지 자원 중에서 가장 풍부하며 지속적인 공급을 받을 수 있는 장점도 있다. 우리가 태양으로부터 얻을 수 있는 에너지 중에서도 수소는 가장 강력한 에너지 자원이다.

현재 수소가 차세대 에너지원으로 각광받고 있는 것은 수소가 가지는 에너지로서의 강력한 이점 때문이다. 대체 연료로서 수소가 갖고 있는 장점은 깨끗하며, 효율적이고, 재생이

가능하며, 부산물로 이산화탄소나 NO_x, SO_x와 같은 유해기체를 생산하지 않는다는 것이다. 이로 인해 수소는 석탄, 석유와 같은 화석연료를 대체할 환경친화적 에너지 자원으로써 국제적인 연구가 활발하게 진행되고 있다(1).

녹조류는 생물학적으로 수소를 생산할 수 있는 미생물중 하나이다(2-6). 녹조류는 공기 중에 이산화탄소를 탄소원으로, 태양 에너지를 에너지원으로, 물을 electron donor로 사용하여 수소를 생산한다. 이러한 특징은 청정에너지인 수소를 생산하고 동시에 지구온난화를 일으키는 이산화탄소를 제거하는 공정의 개발을 가능하게 한다. 생물학적 수소 생산은 혐기적 조건하에서만 활성을 가지는 효소인 hydrogenase에 의해 이루어진다. 이러한 특성 때문에 수소를 얻기 위해서는 광합성을 하며 세포가 성장하는 공정과 수소를 생산하는 공정을 시간적 혹은 공간적으로 분리시키는 이단 배양 공정 시스템으로 이루어져야만 한다. Miura 등은 세포 배양을 통해 *Chlamydomonas* MGA 161의 광합성에 의한 균주의 대량 배양과 혐기 암반응을 통한 수소의 생산을 시도함과 동시에 에탄올, 글리세롤, 아세트산 및 휴믹산 등의 유기물을 생산하고 이를 탄소원으로 이용해 광합성 박테리아인 *Rhodospseudo monas* W-1S를 이용한 추가적인 수소 생산을 실시한 바 있다(6).

본 연구에서는 녹조류의 일종인 *C. reinhardtii*를 이용하여

† Corresponding Author : Department of Chemical Engineering,
300 Chunchun-dong, Changan-gu, Suwon 440-746, Korea
Tel : +82-31-290-7341, Fax : +82-31-290-7272
E-mail : simsj@skku.ac.kr

수소 및 유기산 동시 생산을 시도하였다. *C. reinhardtii*는 명반응으로 세포가 성장하며 암반응을 통해서 수소를 생산할 수 있다(2). 실험을 통하여 먼저 *C. reinhardtii* 중에서 수소 생산에 적합한 균주를 선택한 후, 성장 조건을 최적화하고 여러 조건하에서의 수소와 유기물의 생산량을 조사하였다. 또한, 수소를 생산하면서 발생하는 발효산물인 유기물은 수소 생산성이 비교적 높은 광합성 박테리아의 기질로 공급이 가능하기 때문에(7), 실험을 통하여 명반응에서는 균주의 성장을, 암반응에서는 혐기 발효를 통한 수소와 유기물의 생산 성과 생성 패턴을 조사하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양방법

본 연구에 사용된 녹조류는 *Chlamydomonas reinhardtii* UTEX 89, *Chlamydomonas reinhardtii* UTEX 90, *Chlamydomonas reinhardtii* UTEX 2246이었다. 균주는 UTEX(The Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin)에서 구입하였고, 배지는 Bristol's solution과 TAP medium을 사용하였다(8). 계대배양은 250 mL Erlenmeyer flask에서 2주일에 한 번씩 실시하였고, 접종량은 10% (v/v)로 하였다. 본 실험에서는 400 mL 용량의 bubble column을 사용하였다. 이때 사용한 bubble column의 지름은 3.5 cm이었고, 빛은 양쪽 측면에서 공급하였다. 빛은 형광등으로 100 $\mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ 로 공급하였고, 온도는 25 $^{\circ}\text{C}$ 로 고정하였다. 혼합가스는 CO_2 와 공기를 혼합하여 100 ml/min으로 공급하였다. CO_2 의 혼합비율은 유량을 통해 조절되었다. 빛의 세기는 light meter(LI-COR, Model LI-250, Lambda Instrument Corp., USA)에 연결한 quantum sensor(LI-COR, Model LI-190SA, Lambda Instrument Corp., USA)로 측정하였다.

세포 농도 측정

*C. reinhardtii*의 농도는 660 nm에서의 흡광도를 spectrophotometer (HITACH, U-2000, JAPAN)로 측정했다. 이 흡광도와 세포 건조 중량의 관계를 분석하여 최종 세포의 농도는 dry cell weight로 나타내었다(Dry Cell Weight (g/L) = $0.305 \times \text{OD}_{660}$).

암반응

명반응을 통하여 성장한 세포는 140ml 용량의 serum bottle에 80ml을 넣어 암반응을 수행하였다. 암반응을 하기 직전에 수소를 생산하는 조건인 혐기조건을 만들어주기 위해 질소로 20분간 purging하여 기상 및 액상에 존재하는 산소를 제거한 후 밀봉하였다. 암조건은 알루미늄 호일로 serum bottle을 감싸 빛을 차단하여 반응을 진행하였다.

수소 및 유기물 측정

수소는 주사기(syringe)를 이용하여 serum bottle의 head space에 있는 기체(수소 및 질소)를 기체 크로마토그래피(Hewlett-Packard 5890 II, TCD detector)를 통하여 측정하였다. 유기물의 측정은 혐기발효 시킨 후의 균체를 원심분리한 후 여과를 거쳐 상등액을 기체 크로마토그래피(Hewlett-Packard 5890 II, FID detector)에 주입하였다. 이 때, 정확한 피크를 보기 위하여 50% H_2SO_4 를 이용한 acidification의 과정을 이용하였다(9).

결과 및 고찰

수소와 유기물 생산에 적합한 균주 선별

C. reinhardtii UTEX 89, *C. reinhardtii* UTEX 90, *C. reinhardtii* UTEX 2246 중 실험에 적합한 균주를 선별하기 위하여 명반응에서의 성장 및 암반응에서의 발효산물인 수소와 유기물의 생산량을 비교하였다. 먼저 Bristol's solution에서 3% CO_2 를 공급하며 성장을 관찰한 결과, 세 균주의 성장은 매우 유사하였다. 비성장 속도를 비교해보면, *C. reinhardtii* UTEX 89는 0.037h^{-1} , *C. reinhardtii* UTEX 90, *C. reinhardtii* UTEX 2246는 0.036h^{-1} 이었다. 또한 3일 동안 키운 균주의 건조중량(dry cell weight)은 1g/L였다. 균주의 doubling time은 11시간으로서 비교적 빠른 분열시간을 나타내었다(Fig. 1). 세 균주를 암반응 한 결과는 Table 1에 나타내었다. *C. reinhardtii* 세 균주에서 12시간 동안 암반응한 결과를 살펴보면 *C. reinhardtii* UTEX 90만이 수소를 생산하였다. 유기물 생성에서는 *C. reinhardtii* UTEX 90과 나머지 두 균주의 유기물 생성 패턴이 달랐다. 에탄올이나 아세트산은 *C. reinhardtii* UTEX 90이 다른 균주에 비해서 생성량이 많았고, 글리세롤은 반대로 *C. reinhardtii* UTEX 90이 나머지 두 균주에 비해 2배정도 낮았다. 하지만 유기물의 총량은 *C. reinhardtii* UTEX 90이 역시 가장 높았다. 실험 결과, 수소나 유기물의 생성량으로 볼 때 *C. reinhardtii* UTEX 90이 가장 적절하다고 판단하였고 이후에는 이 균주로 실험을 수행하였다.

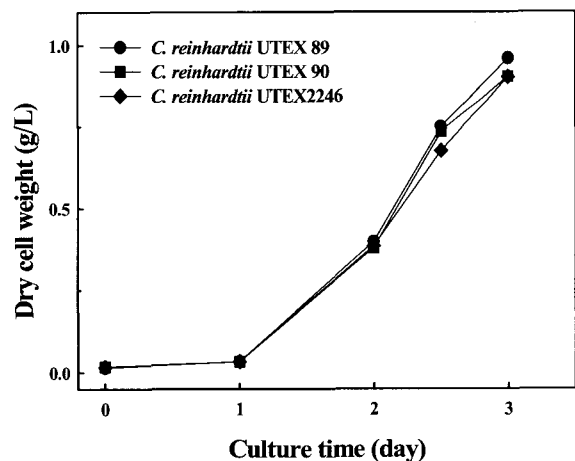


Figure 1. Growth curve of *C. reinhardtii* strains.

Table 1. Formation of hydrogen and fermentation product in *C. reinhardtii*

Strains	Hydrogen (ml $\text{H}_2/\text{L} \cdot 12\text{h}$)	Organic compounds (mg/L)		
		Acetic acid	Ethanol	Glycerol
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> UTEX 89	N.D.	11	4	152
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> UTEX 90	1.9	24	90	80
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> UTEX 2246	N.D.	1	N.D.	134

N.D. = Not Detected

CO₂ 농도에 따른 세포 성장

*C. reinhardtii*는 광합성을 통하여 성장하기 때문에 공급되는 CO₂가 탄소원으로 이용된다. *Chlamydomonas reinhardtii* UTEX 90에서 CO₂에 따른 세포의 성장을 관찰하기 위하여 농도를 달리하여 실험을 수행하였다(Fig. 2). 공급된 혼합 공기는 공기와 CO₂를 gas mixer를 이용하여 균일하게 혼합한 후 sparger를 통하여 bubbling 하였다. 배지 내에 phosphate buffer가 들어있고 CO₂의 농도가 낮은 편이어서 유입된 CO₂에 따른 pH는 거의 변화가 없었다. 1% CO₂와 3% CO₂에서는 CO₂ 농도에 관계없이 성장이 유사하였고, 균주의 성장도 정상적으로 관찰되었다. 하지만 5% CO₂에서 키운 세포는 성장이 다른 조건에 비해 50% 정도 감소하였다. 이로써 *C. reinhardtii* UTEX 90은 비교적 낮은 5% CO₂에서 기질로 인한 저해를 받는 것을 알 수 있었다.

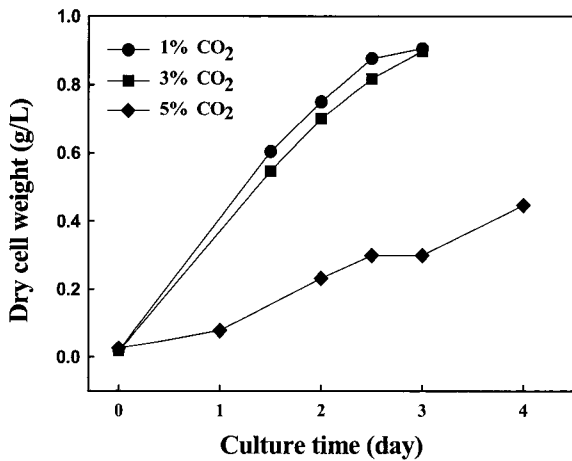


Figure 2. The CO₂ effects on the growth of *C. reinhardtii* UTEX 90.

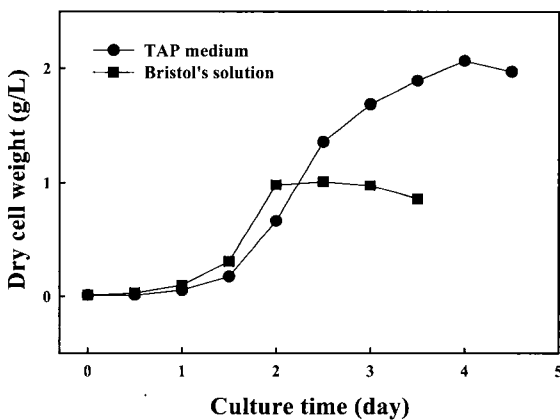


Figure 3. Growth curve of *C. reinhardtii* in 400ml photo-bubble bioreactor.

배지에 따른 세포 성장

실험에 사용한 배지는 Bristol's solution과 TAP medium이었다. 두 배지에서의 성장곡선을 비교한 결과, TAP medium에서 성장한 세포의 경우 Bristol's solution에서 성장한 세포에 비하여 10% 정도 낮은 비성장 속도는 나타내었다. 하지만 Bristol's solution일 경우에 비하여 2배 이상의 고농도를

유지하였다(Fig. 3). 이러한 결과로 미루어 고농도 세포 성장의 경우 TAP medium이 적절한 배지임을 알 수 있었다. 또한 이러한 결과는 Fig. 1에서 나타난 dry cell weight가 빛투과제한(light transmission limitation)의 결과가 아니라는 것을 나타내었다.

또한 질소원의 농도에 따른 효과를 알아보기 위하여 TAP medium에서 질소원의 농도를 달리하여 세포의 성장을 살펴 보았다. 세포의 농도는 질소의 농도에 비례하여 증가하는 추세를 나타내었다. 0.8 g/L NH₄Cl의 농도에서 성장한 세포는 3g/L의 높은 건조중량을 나타내었다. 하지만 초기의 성장속도는 네 경우 모두 비슷한 양상을 보였다(Fig. 4).

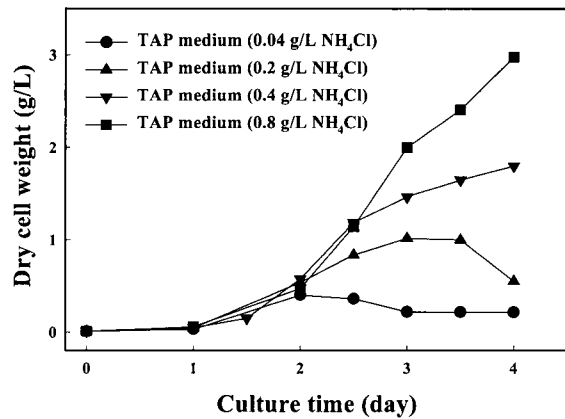


Figure 4. Growth curve in TAP medium containing different nitrogen concentrations.

암반응(Dark fermentation)

성장한 균주를 이용한 암반응은 먼저 성장시의 CO₂ 농도, 성장단계에 따른 건조중량의 변화를 주어 실험하였다. 건조중량의 변화는 두 가지 조건을 비교하였는데, 0.75g/L의 건조중량의 세포(mid-exponential phase)와 0.90g/L의 건조중량의 세포(late-exponential phase)였다. 일단 암반응이 수행되면 세포는 성장을 멈추고 광합성으로 얻어진 산물을 이용하여 수소와 유기물을 생성한다. 그리하여, 충분한 시간의 암반응을 수행한 후의 균주는 flagella를 통한 운동성이 전혀 나타나지 않았고, cell은 lysis가 일어난 상태였다. 그로 인해 균체의 색도 정상적인 녹색을 띄지 않았다. Bristol's solution에서 키운 세포의 건조중량에 따른 유기물의 생산량을 비교하면, 아세트산의 경우 건조중량이 0.75 g/L일 경우보다 0.90 g/L일 경우가 4 - 5 배정도 많은 양이 검출되었다. 하지만 글리세롤이나 에탄올의 경우는 거의 비슷하거나 약간 감소한 경향을 보였다(Table 2). CO₂ 농도에 따른 생산물의 경우, 1% CO₂에서 키운 균주는 3% CO₂에서 키운 균주에 비하여 글리세롤의 생산량이 50% 정도 더 높았다. 그러나 아세트산이나 에탄올의 경우는 10 - 40 %의 낮은 수치를 나타내었다. 이러한 결과를 통하여 성장시의 CO₂ 농도에 따라 암반응 시의 유기물 생산 패턴 변화를 관찰할 수 있었다. 수소의 생산량은 1% CO₂에서 배양한 실험보다 3% CO₂에서 배양한 세포의 경우가 2배 정도 많았다(Table 3). Bristol's solution에서의 암반응의 결과를 통하여 3% CO₂에서 성장한 세포는 비교적 분자량이 작은 아세트산이나 에탄올의 생산량이 많았고, 수

소 역시 1% CO₂에서 성장한 세포에 비하여 높은 생산량을 보였다. 이를 통하여 3% CO₂에서 성장한 세포가 1% CO₂에서 성장한 세포 보다 광합성 산물의 분해가 활발하게 일어났다는 것을 알 수 있었다. 성장단계에 따른 비교는 수소나 유기물의 양 모두 late- exponential phase의 세포의 경우가 높은 수치를 나타내었다. 세포의 성장이 좋았던 TAP medium에서 키운 세포의 암반응은 Table 4에 정리하였다. 암반응을 통한 생성물 모두 0.4g/L NH₄Cl의 경우가 다른 질소 농도에 비하여 높은 생산량을 나타내었다. 이 경우를 Bristol's solution의 실험과 비교해 보면 유기물의 생성량은 TAP medium일 때가 낮았지만, 수소의 생산량에 있어서는 TAP medium으로 키운 세포가 0.5 μ mol/ mg DCW로 40% 정도 더 높았다. 또한 TAP medium을 배지로 사용한 실험에서는 글리세롤이 검출되지 않았다. 이를 통하여 암반응이 활성화되면서 광합성 산물이 아세트산과 에탄올과 같은 분자량이 작은 물질로 분해되며 이는 수소의 생산량과 직접적인 관계가 있음을 알 수 있었다.

Table 2. Organic compounds production at different growth stage and in different CO₂ concentrations

CO ₂ %	Dry cell weight (g/L)	Organic compounds (mg/L)		
		Acetic acid	Ethanol	Glycerol
1	0.75	68	149	414
	0.90	225	135	409
3	0.75	77	209	279
	0.90	366	153	261

Table 3. Hydrogen production rate* at different growth stage and in different CO₂ concentrations

CO ₂ %	Dry cell weight (g/L)	
	0.75	0.90
1	0.10	0.17
3	0.19	0.36

* : μ mol/mg DCW

Table 4. Formation of hydrogen and fermentation product at different nitrogen concentrations

Nitrogen concentrations (g/L NH ₄ Cl)	Hydrogen (μ mol/mg DCW)	Organic compounds (mg/L)	
		Acetic acid	Ethanol
0.04	0.02	110	12
0.2	0.12	125	217
0.4	0.51	156	254
0.8	0.02	15	18

요 약

이 연구의 목적은 미세조류인 *Chlamydomonas reinhardtii*을 이용하여 수소 및 유기물의 생산을 위한 배양 조건을 최적화하는 것이다. 세 가지 종의 균주를 조사하여 *C. reinhardtii* UTEX 90이 수소 생산성과 유기물 생산성 면에서 가장 우수함을 확인하였다. 최적 이산화탄소 농도 범위는 1 - 3% 였으며 두 종류의 미세조류 배양에 있어 대표적인 배지 (Bristol's media and TAP media)를 조사한 결과 TAP 배지에서의 세포 성장이 Bristol 배지보다 더 우수함을 확인하였다. 3%의 이산

화탄소 농도와 TAP 배지에서 균주를 배양하여 최대 수소 생산(0.5 μ mol/ mg DCW)을 얻었다. 그러나 전체 유기물 생산은 Bristol 배지에서 두 배 이상 생산되었다.

감 사

본 연구는 과학기술부의 국책기술연구사업으로 고효율 수소제조기술개발사업의 일환으로 수행되었으며 연구비 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

- Hansel A. and P. Lindbald (1998), Towards optimization of cyanobacteria as biotechnologically relevant producers of molecular hydrogen, a clean and renewable energy source, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**, 153-160.
- Miura Y., S. Ohta, M. Mano, and K. Miyamoto (1986), Isolation and characterization of a unicellular marine green alga exhibiting high activity in dark hydrogen production, *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 2837-2844.
- Miura Y., S. Ohta, and K. Miyamoto (1987), Hydrogen evolution as a consumption mode of reducing equivalent in green algal fermentation, *Plant Physiol.* **83**, 1022-1026.
- Miura Y., W. Yamada, K. Hirata, K. Miyamoto, and M. Kiyohara (1993), Simulation of hydrogen production in algal cells grown under high CO₂ concentration and low temperature, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **39/40**, 753-761.
- Maeda I., H. Hikawa, M. Miyashiro, K. Yagi, Y. Miura, H. Miyasaka, T. Akano, M. Kiyohara, H. Matsumoto, and Y. Ikuta (1994), Enhancement of starch degradation by CO₂ in a marine green alga, *Chlamydomonas* sp. MGA 161, *J. Ferment. Bioeng.* **78(5)**, 383-385.
- Miura Y. (1995), Hydrogen production by biophotolysis based on microalgal photosynthesis *Proc. Biochem.* **30(1)**, 1-7.
- Kim M. S., K. W. Moon, I. G. Lee, T. J. Lee, and C. K. Sung (1999), Hydrogen Gas Production by Fermentation From Various Sugars Using *Clostridium butyricum* BCIB 9576., *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27(1)**, 62-69.
- Harris, E. H. (1989), *The Chlamydomonas Sourcebook : A comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use*, pp25-31, Academic Press, Inc.
- Bricknell, K. S. and S. M. Finegold (1973), A simple, rapid methods to process and assay fatty acids and alcohols by gas chromatography, *Anal. Biochem.* **51**, 23-31.