

황결핍 된 *Chlamydomonas Reinhardtii* 배양액에서 수소생산을 위한 제한 인자들의 영향

김준표*, 심상준*[†]

*성균관대학교 화학공학과

Effect of Limiting Factors for Hydrogen Production in Sulfur Deprived *Chlamydomonas Reinhardtii*

Jun Pyo Kim*, Sang Jun Sim*[†]

*Department of Chemical Engineering, Sungkyunkwan University,
300 Chunchundong, Jangangu, Suwonsi, Gyeonggido, 440-746, Korea

ABSTRACT

Chlamydomonas reinhardtii is a green algae that can use light energy and water to produce hydrogen under anaerobic condition. This work reports the effect of limiting factors on hydrogen production in sulfur deprived anaerobic *C. reinhardtii* culture. In order to confirm the relationship between hydrogen production and limiting factors such as residual PSII activity and endogenic substrate degradation, the increase in chlorophyll concentration and the decrease in starch concentration was investigated during sulfur deprivation. The overall hydrogen production increased depending on cell density in range of 0.4~0.96 g DCW/l. At this time, the increase in chlorophyll concentration during 24 h after sulfur deprivation increased in proportion to hydrogen production, however, the decrease in starch concentration was not proportional to that. Therefore, hydrogen production under sulfur deprivation using green alga was closely associated with the residual PSII activity than the endogenic substrate degradation.

KEY WORDS : biological hydrogen production(생물학적 수소생산), *chlamydomonas reinhardtii* (녹조류), sulfur deprivation(황결핍), residual PSII activity(잔여 PSII 활성), endogenic substrate degradation(내인성기질 분해)

1. 서 론

21세기를 맞아서 우리는 심각한 에너지 문제에 직면하고 있다. 전 세계의 에너지 수요량은 우선적

인 에너지원으로서 공급되는 화석연료에 의해 채워지고 있다. 화석연료는 재생이 불가능하고 매장량이 한정되어 있으며 환경오염의 원인물질이라는 단점을 갖고 있다. 특히 공장과 자동차에서 배출되는 배기가스에 의한 대도시의 대기 오염은 물론, 연소 시 이산화탄소의 발생으로 지구온난화가 가

[†]Corresponding author : simsj@skku.edu

속화 되고 있는 실정이다. 또한 지구상에서 매장 지역, 즉 자원의 편중이 심하기 때문에 가격과 공급 면에서 항상 불안정한 요소를 지닌다. 이 때문에 인류는 환경문제와 자원의 고갈 문제를 해결할 수 있는 재생가능한 수소에너지의 제조 및 이용 개발을 서두르고 있다. 현재 수소는 화석연료를 이용한 증기재생공정(steam-reforming process), 석탄가스화 및 물을 이용한 전기분해, 광분해, 직접 열분해 등의 방법으로 생산되고 있다. 이러한 여러 방법 중에 최근에는 물과 빛만 존재하면 세포대사를 통해 수소를 생산할 수 있는 녹조류를 통한 생물학적 수소생산에 관한 연구가 주목 받고 있다^{1,2)}.

녹조류는 생물학적으로 수소를 생산할 수 있는 미생물 중 하나로써, 태양에너지를 효율적으로 이용하여 생체 내 캘빈회로를 통한 이산화탄소의 고정화를 가능하게 하여 지구 온난화 물질인 이산화탄소를 제거하는 동시 공정 개발을 가능하게 한다³⁾. 녹조류를 이용한 생물학적 공정은 기본적으로 조류 세포내에 보유하고 있는 hydrogenase 효소에 의해 이루어진다. 수소생산 효소인 Hydrogenase 효소는 $2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons 2H_2$ 의 반응을 촉진시킨다. 그러나 hydrogenase 효소는 혐기 조건에서만 활성을 갖기 때문에, 수소를 얻기 위해서는 광합성을 하면서 세포가 성장하는 공정과 수소를 생산하는 공정을 시간적 혹은 공간적으로 분리시키는 이단 배양 공정 시스템으로 이루어져야만 한다. 이러한 녹조류를 이용한 이단 배양 공정은 Melis 등에 의해 황결핍 조건을 이용한 수소생산이 연구되어져 왔다⁴⁾. Melis는 빛 조건에서 Chlamydomonas 세포를 배양한 후, 배지 내 황결핍에 의한 방법으로 빛 조건하에서도 수소를 생산할 수 있는 이단 배양 공정을 개발하였다. 녹조류는 배지 내에 황성분이 결핍 되면 PSII가 빠른 시간 내에 분해되어 광합성을 할 수 없게 된다.

따라서 PSII에 위치한 oxygen evolving complex에서 물분해에 의한 산소 발생이 억제되어, 광합성에 의한 산소 발생속도 보다 호흡에 의한 산소소모 속도가 증가하게 된다. 이와 같은 현상에 의해 세포는 빛 조건에서도 스스로 혐기상태가 되어

hydrogenase에 의해 수소가 발생하게 된다. 배지 내 황성분 결핍을 이용한 수소생산 공정에서는 잔여 PSII 활성에 의한 전자의 전달, starch나 protein 같은 내부기질의 이용 정도, redox 반응에 의한 전자 전달 속도, hydrogenase와 다른 생리학적 pathway와의 경쟁 반응 등 여러 가지 수소생산 제한 인자가 존재 한다⁵⁾. 최근에는 이러한 제한 요소들을 해결하여 수소생산성을 증대시키기 위해 많은 연구가 이루어지고 있다.

본 연구에서는 녹조류의 일종인 C. reinhardtii UTEX90 균주로 황결핍 조건에서 수소생산을 시도하였다. 먼저 빛 조건에서 광합성을 통한 세포의 성장 특성을 조사하였고, 황결핍 후 starch와 chlorophyll의 변화량을 측정하여 위에서 언급한 제한 인자들 중 잔여 PSII 활성 및 내부기질의 이용도와 수소생산성과의 관계성을 연구하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 사용균주 및 배양 조건

본 실험에서 사용한 균주는 Chlamydomonas reinhardtii UTEX90으로 녹조류에 속한다. 이 균주는 UTEX (The Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin)에서 구입하였고, 배지는 TAP (Tris-Acetate-Phosphate) 배지 (pH 7.2)를 사용하였다⁶⁾. 본 실험에서 균주 배양은 250 mL Erlenmeyer flask에 배지 120 mL를 working volume으로 하여 수행되었고, 배양 온도는 23°C, 160 rpm인 광배양기에서 배양되었다. 이때, 빛은 형광등으로 위쪽에서 약 70 $\mu E/m^2/s$ 의 세기로 12시간을 주기로 하여 공급되었다⁷⁾.

2.2 황결핍 조건

수집된 세포는 황성분이 모두 Cl로 치환된 TAP minus S 배지를 사용하여 원심분리기에서 2000 xg, 5분 동안 세포를 5차례 씻어내고, 100 ml serum bottle에 세척된 세포를 40 ml 채우고 배양하였다⁸⁾. 이 때 세포 질량은 모두 7.0 g DCW/1로

맞추었다. 그리고 나서, 혐기조건을 만들기 위해 serum bottle을 밀폐하고, 아르곤 가스로 bottle 내부를 치환한 후 23°C, 160 rpm 으로 120시간 동안 빛을 200 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 의 세기로 공급하며 배양하였다⁹⁾.

2.3 분석 방법

*C. reinhardtii*의 세포질량을 측정하기 위해 80°C에서 12시간 건조된 종이 필터를 이용한 건조중량법이 이용되었다. 세포내 chlorophyll 양을 분석하기 위해, 세포를 수확한 후, 90% 에탄올을 넣고 원심분리기에서 5분간 3000 xg로 회전시켜 chlorophyll 을 추출하였다. 전체 chlorophyll 양은 spectrophotometer (HITACHI, U-3210, Japan)를 사용하여 Spreitzer 법으로 측정되었다⁶⁾. Starch를 측정하기 위해 원심분리기를 이용하여 세포를 수확한 후, 40% perchloric acid 용액 4 ml를 넣고, 25°C에서 6시간 동안 보관하였다. 6시간 후 ice-water bath에서 NaOH 용액을 이용하여 혼합물을 중성화시켰다. 그리고 나서, starch를 용해시키기 위해 끓는 물에 30분 동안 가열하였고, 원심분리기를 이용해 세포 찌꺼기를 걸러낸 후 상등액을 취하였다. 이렇게 전처리 된 세포를 이용하여 iodo-starch 반응법에 의해 starch 양을 분석하였다. 배양 중 발생하는 가스는 serum bottle에 포집되었으며, 수소 함량은 serum bottle의 head space에서 gas tight syringe로 0.1 mL 취한 후, gas chromatography (HP 5890, Hewlett-Packard, USA)를 이용하여 분석하였다. 이 때 column은 carboxen-1000 (Supelco, USA)을 사용하였고, thermal conductivity detector (TCD)로 분석하였다. 수소 가스의 분석조건은 column 온도 80°C, injector 온도 100°C, detector 온도 120°C이었으며, carrier gas는 Argon으로 flow rate는 35 ml/min으로 유지하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 광합성을 이용한 세포 성장 특성

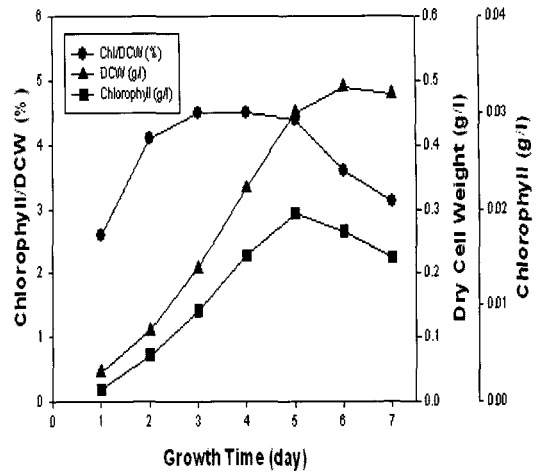


Fig. 1 Profiles of cell density and chlorophyll concentration depending on growth of *C. reinhardtii*

황결핍에 의한 수소 생산 전, 세포의 명반응에서의 성장 특성을 알아보려고 시간에 따른 세포 질량(Dry Cell Weight, DCW) 및 세포내 축적된 chlorophyll과 starch의 양을 관찰하였다. Fig. 1에서 보여준 것처럼 *C. reinhardtii* 세포는 배양시간이 지남에 따라 세포 질량이 증가했고, chlorophyll 양도 증가했다. 그러나 5일째부터 세포 질량의 증가폭도 감소하였고, chlorophyll 양도 감소하였다. DCW당 chlorophyll 함유량의 변화를 살펴보면 이른 지수성장기(2일)에서 세포의 chlorophyll 함유량이 급격히 증가했다가 늦은 지수성장기(5일)까지 chlorophyll 함유량 4.5%를 유지하였고, 그 이후 정지기 및 사멸기(7일)부터는 감소하였다. 세포의 chlorophyll 함유량은 세포의 성장이 급속히 진행되는 이른 지수성장기에 들어서면 광합성량을 증가시키기 위해 급속히 증가해서 늦은 지수 성장기까지 유지되다가 정지기 및 사멸기에 들어서게 되면 그 양이 감소하는 것으로 사료된다.

세포의 starch 함유량을 살펴보면 Fig. 2와 같이 배양시간이 지남에 따라 점점 증가한 후, 5일 배양 이후에는 증가하지 않고 그 양이 유지되었다. 세포의 DCW당 starch 함유량은 chlorophyll과는 다르게 지수성장기 동안 점차적으로 증가했고, 정지기

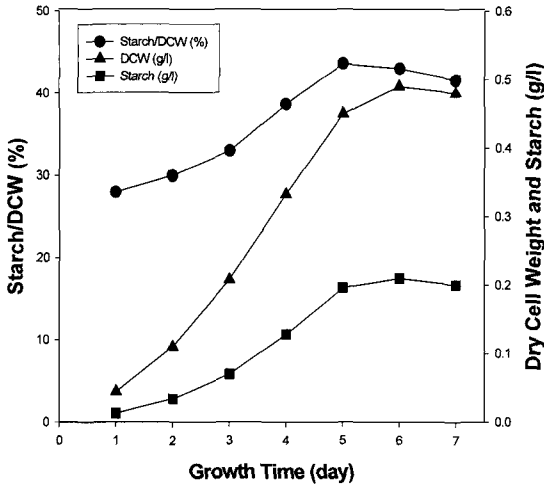


Fig. 2 Profiles of cell density and starch concentration depending on growth of *C. reinhardtii*

및 사멸기 때는 그 함유량이 점점 감소하였다. 이는 세포가 정지기 및 사멸기에 들어서면서 광합성에 의해 내부기질을 축적하기 보다는 내부기질들을 이용하여 생존을 유지하려하기 때문에 세포의 starch 함유량이 감소하는 것으로 사료된다. 우리는 DCW가 최대는 아니지만 starch와 chlorophyll 함유량이 최대인 늦은 지수성장기 때의 세포를 수확하여 황결핍 조건에서 배양하여 수소생산을 시도하였다.

3.2 황결핍 조건을 이용한 수소생산

광합성을 이용해 성장한 세포를 수집하여 황결핍 조건에서 초기 세포 질량(0.40, 0.58, 0.71, 0.96 g DCW/l)에 따른 수소생산을 시도하였다. Fig. 3에서 보여준 것처럼 황결핍 조건에서 초기 질량이 다른 세포 모두 24시간이 지나서 수소가 발생하기 시작하였다. 이는 배지 내 잔여 황성분이 모두 소진되어 호기상태가 혐기상태로 바뀌는데 약 24시간 정도 시간이 걸리기 때문이다⁴⁾.

초기 세포 질량에 따른 수소생산 정도를 살펴보면 초기세포질량이 0.40 g DCW/l 일 때는 108 ml H₂/l 의 수소가 생산되었고, 0.58 g DCW/l 일 때는 121 ml H₂/l, 0.71 g DCW/l 일 때는 140 ml

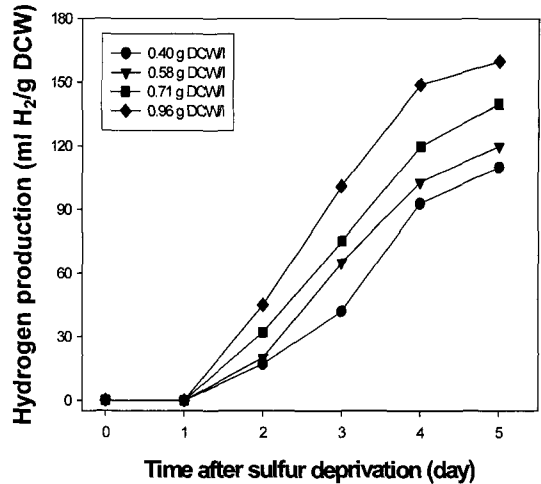


Fig. 3 Production volume of hydrogen after 5 days of sulfur deprivation depends on initial cell density

H₂/l, 0.96 g DCW/l 일 때는 163 ml H₂/l의 수소가 생산되어, 세포질량이 증가할수록 수소생산도 점점 증가함을 알 수 있었다. 일반적으로 수소생산의 제한 요소는 잔여 PSII 활성화에 의한 전자의 전달 정도나 starch나 protein 같은 내부기질의 이용 정도에 의해 영향을 받는다고 알려져 있다^{10,11)}.

따라서 우리는 세포내 chlorophyll 양과 starch 양을 황결핍 이후에 관찰하여 어떠한 제한 요소가 수소생산에 더 많은 영향을 미치는지 조사하였다.

3.3 수소생산 제한인자

녹조류를 이용하여 황결핍 조건에서 수소를 생산할 때 다양한 제한 인자들이 존재한다. 이러한 제한 요소들 가운데 PSII 잔여활성에 의한 전자 전달과 starch와 같은 내부기질의 이용정도를 조사하여 수소생산에 밀접하게 영향을 미치는 제한 인자가 무엇인지 연구하였다.

첫 번째로 황결핍 후 PSII의 잔여 활성화에 의한 전자 전달 정도를 알아보기 위해 chlorophyll의 변화량을 관찰하였다. 조류 세포에서 chlorophyll은 빛에너지를 모아 PSII에 전달하여, PSII가 물분해에 의해 두 개의 전자를 발생시키는데 필요한 에너지를 전달해 주는 역할을 한다¹²⁾. 황결핍 후

Table 1 Change of chlorophyll concentration depending on cell density after sulfur deprivation

Initial cell density (g/l)	Initial chlorophyll concentration (mg/l)	Increase in chlorophyll concentration during 1 day (mg/l)
0.40	15.2	9.75
0.58	21.4	12.21
0.71	27.12	18.45
0.96	36.29	22.67

chlorophyll 양의 변화는 24시간 동안 점차 증가하다가 황결핍 배양이 끝난 5일째까지 점차 감소하였다. 이러한 경향은 각 세포 질량마다 동일하게 나타났다. 이는 잔여 황성분이 PSII의 활성을 증가시켜 황결핍 후 24시간 동안 chlorophyll의 양이 증가되었다가, 그 이후로 PSII 활성이 점차 감소하여 chlorophyll의 양도 시간이 지남에 따라 감소된 것으로 판단된다⁹⁾.

따라서 PSII의 잔여 활성이 수소생산에 영향을 주는지 판단하기 위해서는 황결핍 후 24시간 동안 chlorophyll의 증가량을 관찰함으로써 가능하게 한다. Table 1에서 보여준 것처럼 세포 질량이 증가함에 따라 초기 chlorophyll 양도 증가하였고, 황결핍 후 24시간 동안 chlorophyll의 증가량도 점점 높아짐을 관찰하였다. 따라서 세포질량이 증가함에 따라 세포내 chlorophyll의 증가량이 높아지기 때문에 PSII에 의해 발생하는 전자가 증가하게 되어 결과적으로는 수소 생산량이 증가된 것으로

Table 2 Change of starch concentration depending on cell density after sulfur deprivation

Initial cell density (g/l)	Initial starch concentration (mg/l)	Decrease in starch concentration during 5 days (mg/l)
0.40	186	76
0.58	241	61
0.71	328	108
0.96	424	110

판단된다. 또한 Fig. 4(A)에서 보여준 것처럼 수소 생산량과 황결핍 후 24시간 동안 chlorophyll 증가량의 regression curve를 작성했을 때 일차적 비례 관계가 성립하기 때문에 PSII의 잔여 활성과 수소생산과는 아주 밀접한 상관관계가 있다고 사료된다.

두 번째로는 세포의 내부기질의 이용정도에 따른 수소 생산성과의 상관관계를 알아보기 위해 황결핍 후 세포의 starch 변화량을 관찰하였다. 일반적으로 황결핍 조건에서 세포 질량에 따른 starch 변화량은 chlorophyll의 경우와 비슷한 경향을 나타내었다. 황결핍 후 24시간 동안은 계속 증가하다가 그 이후부터 점차 감소하였다. Zhang 등은 조류 세포가 황결핍 초기인 혐기 조건에서 starch를 축적한 후, 발효과정에 의해 축적된 starch를 분해

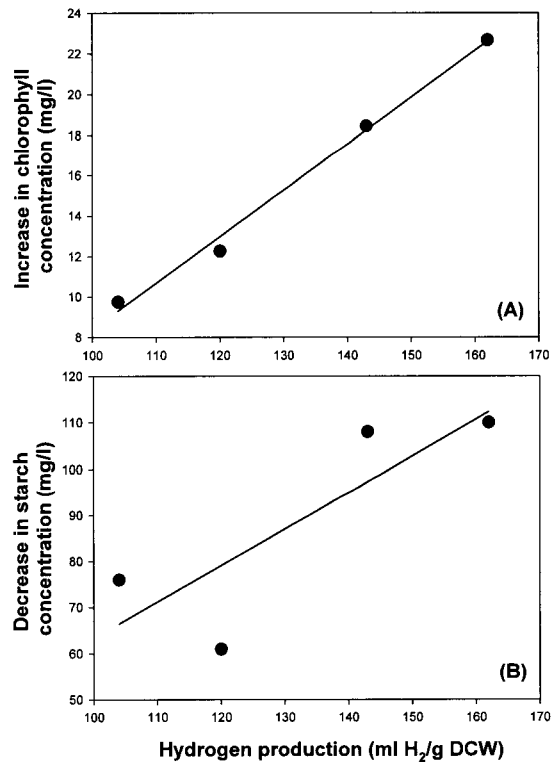


Fig. 4 Regression curves between (A) the hydrogen production and the increase in chlorophyll concentration during 1 day; (B) the hydrogen production and the decrease in starch concentration during 5 days after sulfur deprivation

하여 수소생산에 이용될 것이라는 보고를 하였다⁸⁾. 따라서 우리는 세포 질량에 따른 황결핍 후 5일 동안 starch 감소량과 수소생산량을 비교하였다. Table 2에서 보여준 것처럼 초기 세포 질량이 증가할수록 starch양 또한 증가하였다. 그러나 수소생산량은 세포질량에 따라 점점 증가하는데, 황결핍 후 5일 동안 starch의 감소량은 세포질량에 비례하지 않았다.

또한 Fig. 4(B)에서 알 수 있는 것처럼 수소생산량과 황결핍 후 starch 감소량의 regression curve를 작성했을 때 일정한 비례관계가 성립하지 않음을 알 수 있었다.

이러한 결과에 의해 황결핍 조건에서의 수소생산 제한 인자는 starch와 같은 내부기질 이용정보보다는 PSII의 잔여 활성에 의한 전자전달 정도가 더 중요한 핵심 요소라고 판단된다.

4. 결 론

본 연구의 목적은 녹조류의 일종인 *C. reinhardtii* 세포를 이용하여 그 성장 특성을 파악하고, 황결핍 조건에서 수소생산 시 제한 인자를 조사하여 궁극적으로 수소생산성을 증대시키는 것이다. 세포의 chlorophyll 함유량은 이른 지수성장기에 급격히 증가하여 늦은 지수성장기까지 유지된 후 정지기 및 사멸기 때 감소하였고, starch 함유량은 늦은 지수성장기까지 지속적으로 증가한 후 정지기 및 사멸기 때 감소하였다. 또한 수소생산에 있어 여러 가지 제한 인자 중 잔여 PSII 활성에 의한 전자의 전달 정도를 알아보기 위해 황결핍 후 24시간 동안 chlorophyll 증가량을 조사하였고, 내부기질의 이용 정도를 관찰하기 위해 황결핍 후 5일 동안 starch 감소량을 조사하였다. 수소생산은 질량이 증가함에 따라 점차 증가하였고, 이 때 황결핍 후 24시간 동안 chlorophyll 증가량은 수소생산량에 비례하였다.

그러나 황결핍 후 5일 동안 세포내 starch 감소량은 수소생산량이 증가함에 따라 일정하게 비례하지 않았다. 그러므로 수소생산은 세포내 내부기

질 분해에 의한 것보다 PSII의 잔여 활성에 의한 전자전달과 더 밀접한 관계가 있음을 알 수 있었다. 따라서 수소생산량을 증대시키기 위해 PSII의 잔여 활성을 최적화 하고, 극대화 할 수 있는 연구가 더욱 더 진행되어야 한다.

참 고 문 헌

- 1) S. Dunn, "Hydrogen futures: toward a sustainable energy system", *Int. J. Hydrogen Energy*, Vol. 27, 2002, pp. 235-264.
- 2) I. Dincer, "Technical and exergetic aspects of hydrogen energy systems", *Int. J. Hydrogen Energy*, Vol. 27, 2002, pp. 265-285.
- 3) D. Das and V. Nejat, "Hydrogen production by biological processes: a survey of literature", *Int. J. Hydrogen Energy* Vol. 26, 2001, pp. 13-28.
- 4) M. L. Ghirardi, L. Zhang, J. W. Lee, T. Flynn, M. Seibert, E. Greenbaum, and A. Melis, "Microalgae: a green source of renewable H₂.", *Trends Biotechnol.* Vol. 18, 2000, pp. 506-511.
- 5) A. Melis, L. Zhang, M. Forestier, M. L. Ghirardi, and M. Seibert, "Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*", *Plant Physiol*, Vol. 122, 2000, pp. 127-135.
- 6) E. H. Harris, "The *Chlamydomonas* sourcebook", Academic Press, Inc., San Diego, California, U.S.A., 1989, pp. 607-608.
- 7) A. Tsygankov, S. Kosourov, M. Seibert, M. L. Ghirardi, "Hydrogen photoproduction under continuous illumination by sulfur-deprived, synchronous *Chlamydomonas reinhardtii* cultures", *Int. J. Hydrogen Energy*, Vol. 27, 2002, pp. 1239-1244.
- 8) J. P. Kim, 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, "Cell age optimization for

- hydrogen production induced by sulfur deprivation using a green alga *Chlamydomonas reinhardtii* UTEX 90", *J. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 15, 2005, pp. 131-135.
- 9) S. Kosourov, 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.
- 10) T. K. Antal, T. E. Krendeleva, T. V. Laurinavichene, V. V. Makarova, M. L. Ghirardi, A. B. Rubin, A. A. Tsygankov, and M. Seibert, "The dependence of algal H₂ production on Photosystem II and O₂ consumption activities in sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cells", *Biochimica et Biophysica* Vol. 1607, 2003, pp. 153-160.
- 11) L. T. Zhang, Happe, and A. Melis, "Biochemical and morphological characterization of sulfur-deprived and H₂-producing *Chlamydomonas reinhardtii* (green alga)", *Planta*, Vol. 214, 2002, pp. 552-561.
- 12) W. G. Hopkins and N. P. A. Huner, "Introduction to plant physiology", 3rd ed., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, U.S.A. 2004, pp. 63-166.