

## 광합성 미세조류인 *Chlorococcum littorale*을 이용한 이산화탄소의 생물학적 고정화

김태호 · 성기돈<sup>1</sup> · 이진석<sup>1</sup> · 이준엽<sup>2</sup> · 오상집<sup>2</sup> · 이현용\*

강원대학교 식품생명공학부, <sup>1</sup>한국 에너지 기술연구소,  
<sup>2</sup>강원대학교 사료생산공학과

**Biological Fixation of Carbon Dioxide Using Photosynthetic Microalga, *Chlorococcum littorale*. Tae-Ho Kim, Ki-Dong Sung<sup>1</sup>, Jin-Suck Lee<sup>1</sup>, Joon-Yeop Lee<sup>2</sup>, Sang-Jip Ohh<sup>2</sup> and Hyeon-Yong Lee\***. Division of Food and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea, <sup>1</sup>Korea Institute of Energy Research, Taejeon 305-343, Korea, <sup>2</sup>Department of Feed Science and Technology, Kangwon National University Chuncheon 200-701, Korea - *Chlorococcum littorale* has been grown in high CO<sub>2</sub> concentrations to utilize CO<sub>2</sub> gas in the polluted air. The effect of incident light intensity on the specific growth rate is expressed by a photoinhibition model, showing half-saturation constant, K<sub>0</sub> as 8 (W/m<sup>2</sup>) and inhibition constant, K<sub>i</sub> as 35 (W/m<sup>2</sup>). The maximum specific growth rate was also estimated as 0.095 (1/day) under this condition. This strain maintained the optimum growth rate in 20% of CO<sub>2</sub> gas but 50% of input CO<sub>2</sub> gas is the maximum concentration considering the economical efficiency. The maximum specific CO<sub>2</sub> consumption rate, qCO<sub>2</sub> was measured as 17.48 (mg CO<sub>2</sub>/g dry wt./day) in batch cultivation, 11.2 (mg CO<sub>2</sub>/g dry wt./day) in fed-batch cultivation and 10.87 (mg CO<sub>2</sub>/g dry wt./day) at 0.065 (1/day) of dilution rate in continuous cultivation. The chemical composition of the biomass obtained from this process showed 32.5% of protein, 27.5% of lipid, 16.5% of carbohydrate and ash 11.7%.

산업 혁명 이후 급속한 산업 발달과 폭발적인 인구 증가로 인하여 에너지 및 자원의 고갈은 물론, 오염물의 무분별한 대량 방출로 자연 생태계에 심각한 부작용들이 발생하고 있다(1). 이 중 인류의 생존을 크게 위협하는 것으로는 오존층의 파괴로 인한 자외선의 증가와 그리고 1980년대 이후의 전 세계적인 기상 이변과 해수면 상승의 원인인 지구 온난화 현상 등을 들 수 있는데 지구 온난화 현상의 경우 화석 연료의 대량연소시 발생하는 이산화탄소, 메탄 및 CFC와 함께 온실효과를 일으키는 것으로 알려져 있다. 산업 활동을 위축시키지 않으면서 이산화탄소의 배출량을 감소시키기 위해 여러 가지 이산화탄소 처리 공정들이 연구되고 있는데 이산화탄소의 고정화 기술로는 광합성 생물체를 이용하여 이산화탄소를 바이오매스로 전환하는 생물학적 방법과 촉매 등을 이용해 재자원화하는 화학적 방법, 그리고 액화 또는 CaCO<sub>3</sub> 의 형태로 해양에 폐기하는 방법 등이 있다(2).

생물학적 이산화탄소 고정화의 경우 고온 고압하에서 행하는 화학적 고정화에 비해 반응속도가 늦어 생산성 및 효율이 상대적으로 낮은 반면, 상온 상압하에서 태양

에너지 그리고 해수만으로 이산화탄소 고정화가 가능한 장점이 있다(3). 또한 배출 가스를 분리 회수하여 농축시키는 과정이 필요없음과 동시에 직접 적용할 수 있고 이산화탄소를 기질로 바이오매스를 생산함과 동시에 여러 유용 물질을 얻을 수 있다(1). 이같은 생물학적 공정을 가능하게 하는 생물체는 크게 두 가지로 나눌 수 있는데, 고등 식물(plant), 조류(algae), 시아노박테리아(cyanobacteria)와 H<sub>2</sub>S와 같은 화합물을 이용하는 세균성 광합성 생물이 있다(4).

따라서 본 논문에서는 여러 종류의 조류중 이산화탄소 고정화 효율이 높은 *Chlorococcum littorale*을 이용해 이산화탄소의 고정화 공정의 scale-up을 위한 기초자료로서 배양공학적 자료들을 산출했다. 또한 생물학적 고정화 공정의 경제성 확보를 위해 공정 부산물로서 균체 사료원의 영양원을 조사했다.

### 재료 및 방법

#### 균주 및 배양방법

본 실험에 이용된 광합성 미세조류는 *Chlorococcum littorale*로서(New Energy and Industrial Technology Development Organization, Japan) 1000 ml Erlenmeyer flask에 신선한 배지 600ml에 균주 10%(v/v)로 접

\*Corresponding author

Tel. 82-361-50-6455, Fax. 82-361-56-4819

E-mail: hyeonl@cc.kangwon.ac.kr

Key words: *Chlorococcum littorale*, Carbon dioxide, Biological fixation

중한 다음 광합성 배양기(HAN Back Scientific Co. Korea)에서 배양했으며 배지 조성은 A solution( $H_3BO_3$ , 2.86 g/l;  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ , 2.2 mg/l;  $ZnSO_4 \cdot 5H_2O$ , 79 mg/l;  $Na_2MoO_4$ , 0.021 g/l;  $H_2SO_4$ , 1drop) 1 ml; Fe solution( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  2.0 g/l;  $H_2SO_4$  1.0 ml/l) 1 ml;  $KNO_3$  1.25 g/l;  $KH_2PO_4$  1.25 g/l;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1.25 g/l; NaCl 15 g/l; Distilled water 1l로 구성되었으며(5), 조제된 배지는 고압 멸균기(Kuk Je Co. Korea)에서 121°C, 15분 동안 가압살균하여 접종하였다. 배양 온도 30°C, 광도 16 W/m<sup>2</sup> 그리고 95 rpm의 교반 속도를 유지하며 배양조에 유입되는 기체는 공기와 이산화탄소를 이용 Flow meter(Dwyer RMA-21-SSV, USA)로 조정하여 이산화탄소 농도를 단계별로 조성하여 연속적으로 배양했다. 이산화탄소 농도에 따른 균체 생육 속도는 1000 ml 삼각 플라스크에 접종농도 약 0.04(g/l)로하여 처음 5% 이산화탄소 유입 농도에서 시작하여 여러 단계를 거쳐 최종 이산화탄소 농도를 70%까지 높여 배양을 실시함으로 알 수 있었다. 연속 및 회분 배양은 200 cc/min의 속도로 50% 이산화탄소를 유입하여 배양된 균을 700 rpm에서 원심분리하여 최대 working volume 14L인 KF-14 series(한국 발효기)광배양조에 0.19 g dry wt./L로 접종 실시했다. 이때 광도 32 W/m<sup>2</sup>, 온도 30°C 그리고 180 rpm의 교반속도를 유지하며 배양 했으며 pH는 on-line pH meter에 의해 자동 기록되었다.

#### 균체 생육, 이산화탄소 소비속도 및 부산물 농도 측정

균체의 생육 정도는 spectrophotometer (Metertek SP-830, USA)를 이용하여 600nm에서 O.D.(optical density)값을 측정하였으며, 건조 균체량은 배양조에서 매일 20 ml를 취해 0.45 μm크기의 여과지로 여과하여 105°C로 유지되는 dry oven (Sam Hwa Co, KOREA)에서 6시간 건조후 측정하였다. 균체내 단백질 함량 측정은 Lowry법에 따라 측정하였다(6). 균체의 이산화탄소 소비속도를 알아보기 위하여 본 실험에서는 유입되는 이산화탄소 농도를 CO<sub>2</sub>/OXYGEN PAK 12P (USA)를 이용 측정하였으며, 또한 배지내 녹아있는 용존 이산화탄소 농도를 계산하였다(7). 소비되지 않고 밖으로 유출되는 이산화탄소의 농도는 gas chromatograph(HP 5890 seriesII, USA)를 이용 측정하였다.

#### 결과 및 고찰

광원은 미세조류에 의한 이산화탄소 고정화 공정에 있어 가장 중요한 인자로서(8) *C. littorale*의 최적 생육 광도를 구한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 광도가 32W/m<sup>2</sup>일 때 가장 높은 비생육속도인 0.095(1/day)를 보였으며 10W/m<sup>2</sup>의 배양 조건에서 가장 낮은 0.06(1/day)의 비

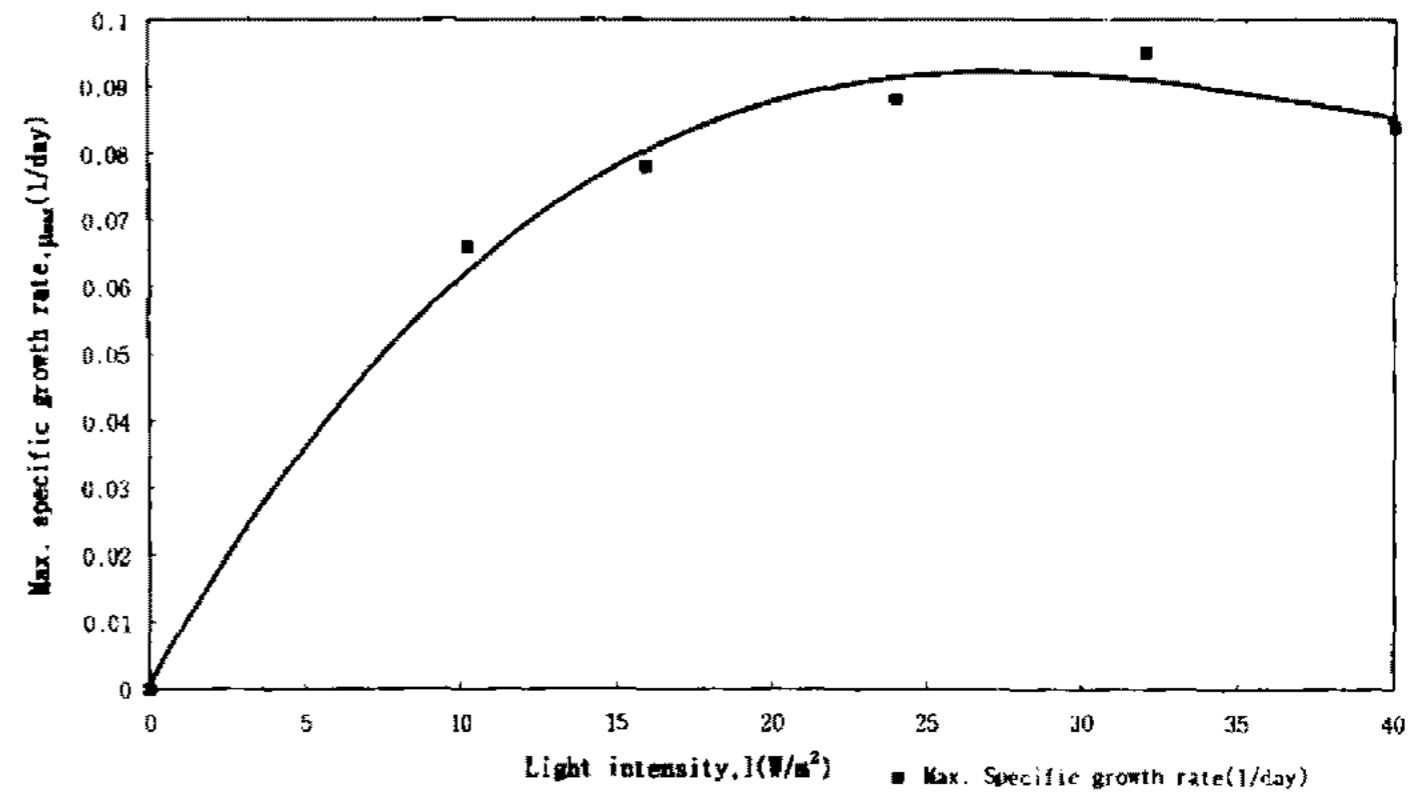


Fig. 1. The effect of incident light intensity on cell growth rate.

Solid line is the results of fitting the data to a photo-inhibition model.

생육속도를 나타냈다. 광포화 상태가 될 때까지 광도의 증가에 따라 비생육 속도는 증가한다는 사실을 알 수 있으며 이러한 결과로 볼 때 *C. littorale*의 생육에 있어 광도는 중요한 제한 요소임을 알 수 있다. 또한 높은 광도에서 생육이 저하되므로 photo-inhibition 상태가 존재 할수있어 이같은 현상을 표현할 수 있는 것이 아래식이다.

$$\mu = \mu_{\max} \cdot I / (I + (K_0 + K_i) / I)$$

$K_0$  = half-saturation constant, W/m<sup>2</sup>

$K_i$  = inhibition parameter, W/m<sup>2</sup>

$\mu$  = the specific growth rate, 1/ day

$\mu_{\max}$  = Maximum specific growth rate, 1/ day

여기서  $K_0$ 는 half-saturation constant (W/m<sup>2</sup>),  $K_i$ 는 inhibition parameter (W/m<sup>2</sup>),  $\mu$ 는 비 생육속도(1/day)를 나타내며  $\mu_{\max}$ 는 최대 비 생육속도(1/day)를 나타낸다.  $\mu_{\max}$ 는 0.095(1/day),  $K_0$ 는 8(W/m<sup>2</sup>) 그리고  $K_i$ 는 각각 35(W/m<sup>2</sup>)로 계산되었다. 이는 다른 조류인 *Laminaria saccharina*의  $\mu_{\max}$  0.15(1/day),  $K_0$  5(W/m<sup>2</sup>)와 유사한 결과를 얻었다(9). 또한 온도 생육에 중요한 요소로서 본 자료에 나타내지는 않았으나 Arrhenius식을 적용한 결과 *C. littorale*의 활성화 에너지는 11.2 (kcal/mol)로 계산된 반면 Clement(10)에 의해 보고된 *Spirulina platensis*는 13.8(kcal/mol) 그리고 *Chlorella*는 그 보다 낮은 7.72(kcal/mol)이 Lee와 Low(11)에 의해 보고 되었다. 대부분의 광합성 미생물의 생육은 연속적인 화학 반응과 개개의 화학적 반응 진행 속도로 간주할 수 있으며 조류의 생육은 온도에 직접적으로 영향을 받으며(12-13), 낮은 온도에서의 생육속도 저하는 세포내 생화학 반응 속도의 제한에 기인하는 것으로 사료된다(14).

Fig. 2는 공급되는 이산화탄소 농도에 따른 균체 생육도를 나타낸 결과로서 낮은 이산화탄소 농도인 5, 10,

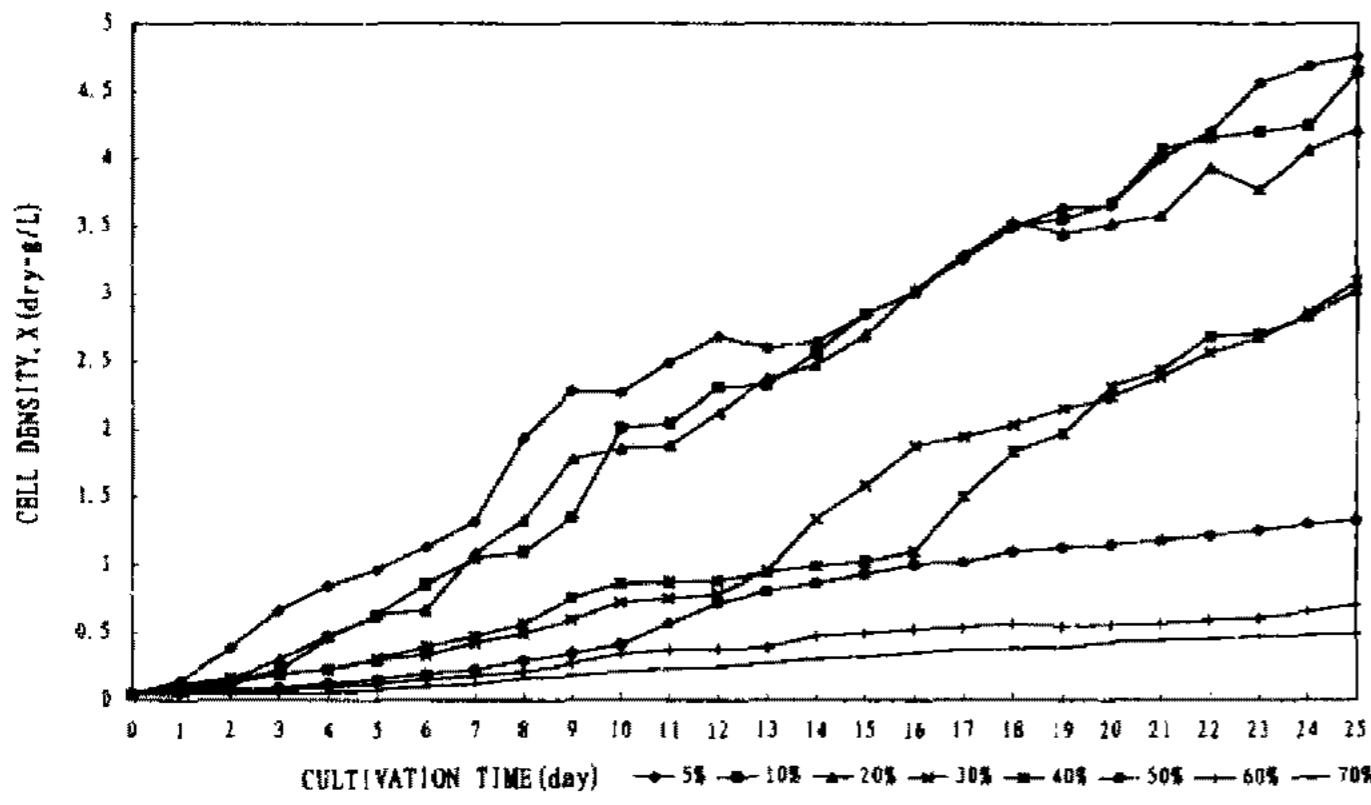


Fig. 2. The cell growth of *C. littorale* by adding various concentrations of CO<sub>2</sub> gas at 16 w/m<sup>2</sup> of light intensity of batch cultivation.

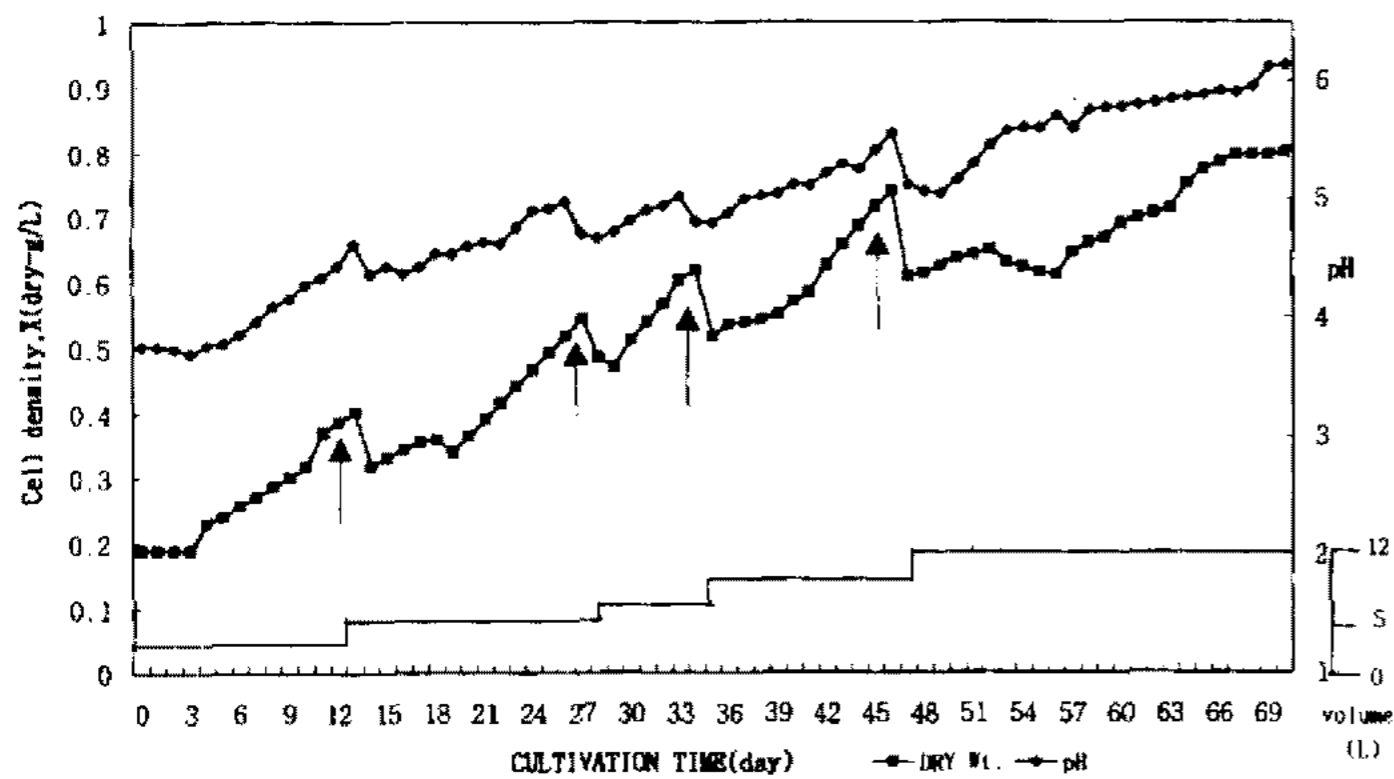


Fig. 3. Kinetics of cell growth and pH changes in adding 50% CO<sub>2</sub> gas for fed-batch cultivation in photobioreactor. Arrows are the points of adding fresh media.

20%의 CO<sub>2</sub>를 공급했을 때 그 생육도는 유사하였으나 30% 이상의 이산화탄소를 유입하였을 때는 생육 속도가 급격히 감소함을 알수 있다. 이러한 결과를 토대로 볼 때 *C. littorale*의 생육에 영향을 미치지 않는 이산화탄소 농도는 20%임을 알수 있다. 그러나 전체 공정의 경제성을 고려하면 고농도의 이산화탄소 농도중 비생육속도가 높은 50%가 본 실험의 주대상이 되었다. Kodama등(15)에 따르면 *C. littorale*은 60% CO<sub>2</sub> 공급시 배양 10일 이후에는 그 성장이 멈춰 사멸한다고 보고하였다. 그러나 본 실험에서는 70%의 이산화탄소를 공급시에도 비 생육속도는 0.06(1/day)로 낮으나 생육을 계속함을 알수 있었다. 조류의 성장중 pH는 배양일이 경과함에 따라 증가를 계속하였는데 이는 배지내 유입되는 이산화탄소를 균체가 이용하기 때문이다.

전반적으로 세포 농도가 다소 높은 값을 나타내는 회분 배양말기인 12일째 신선한 배지 2.5 l를 첨가함으로써 유가식 배양을 실시한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 세포 농도가 증가하여 0.567(g dry wt./l)와 0.685(g dry wt./l)에 접어들었을 때 각각 신선한 배지 2.5 l를 첨가했다. 처음 신선한 배지를 첨가했을 때 일시적인 생육 감소 현상이 나타

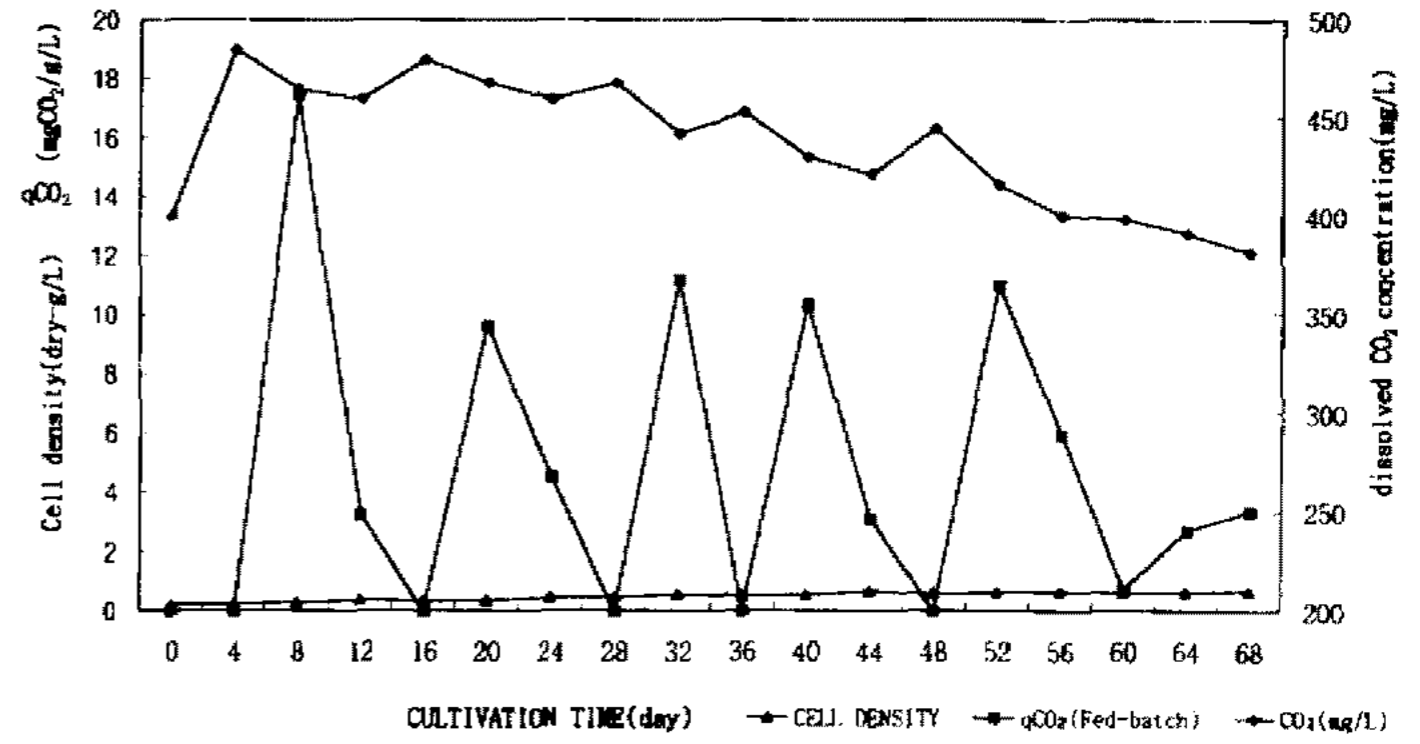


Fig. 4. The changes of cell density, residual carbon dioxide concentration and specific carbon dioxide consumption rate for fed-batch cultivation of *C. littorale* by adding 50% CO<sub>2</sub> gas on a photobioreactor.

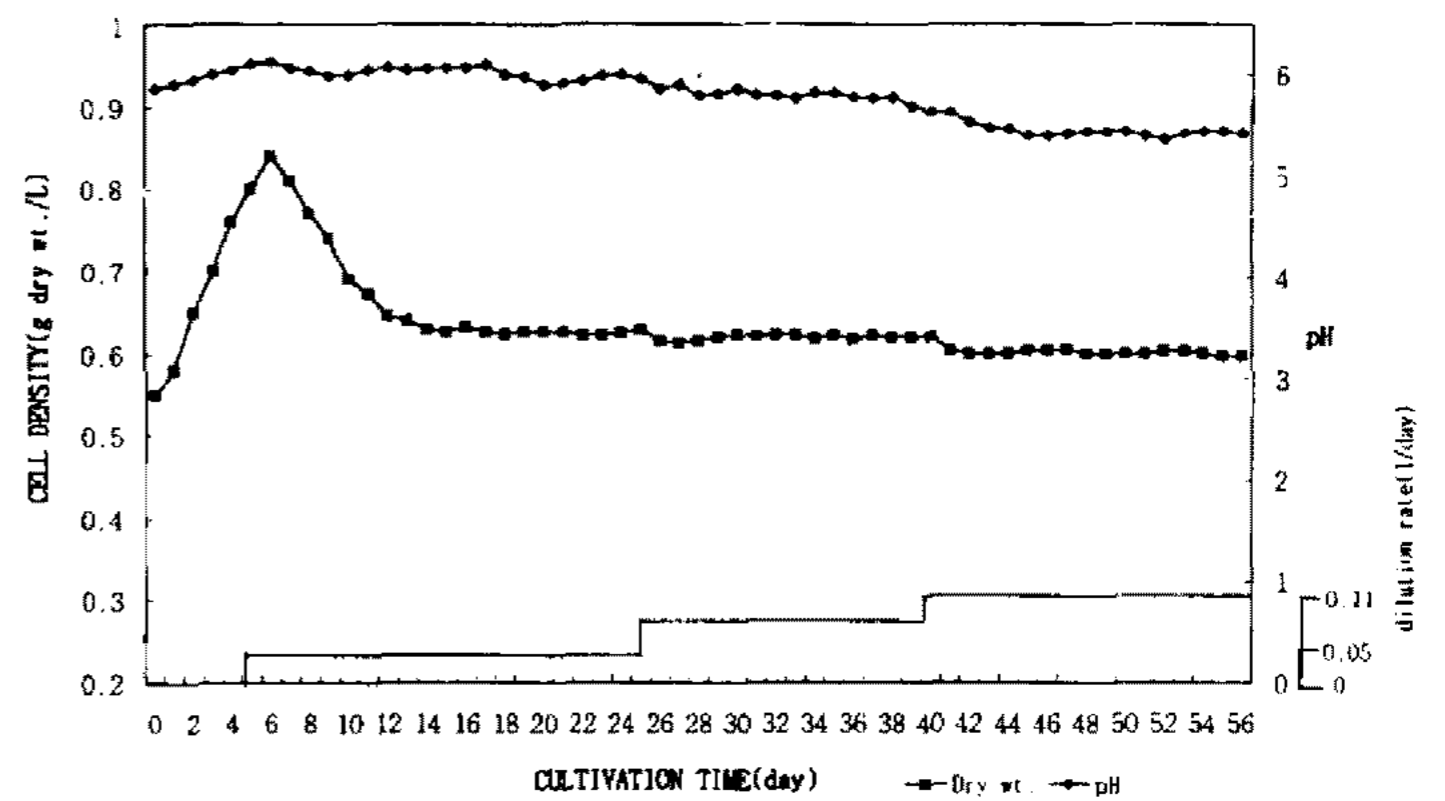


Fig. 5. The kinetics of growing cells for continuous cultivation of *C. littorale* in a photobioreactor at 16 W/m<sup>2</sup> of light intensity.

났으나 배양기간이 증가함에 따라 다시 증가 하였다.

유가식 배양기간 중 최대 건조 균체 농도는 0.8(g dry wt./l)를 나타 내었으며 pH는 전반적으로 세포생육과 연관되어 균체가 성장하는 과정에서 사소하나마 증가를 보였으나 신선한 배지를 첨가시에는 pH는 급격히 감소하였다. 이와 같은 유가식 배양시 소비되는 이산화탄소의 속도를 나타낸 것이 Fig. 4로서 균체생육, 용존 이산화탄소, 비 이산화탄소 소비속도인 q<sub>CO2</sub>를 비교한 결과이다. 이때 균체농도가 0.8(g dry wt./l)이고 용존 이산화탄소 농도는 381.6(mg CO<sub>2</sub>/l)를 최종 나타냈으며 q<sub>CO2</sub>는 배양 32일에서 11.2(mg CO<sub>2</sub>/g dry wt./l)로 가장 높았다. 신선한 배지 2.5L를 첨가한 후 용존 이산화탄소농도는 증가했다가 세포의 생육이 증가하여 이산화탄소를 소비함으로써 농도는 다시 낮아지는 전체적인 유가식 배양의 등락을 보였다. 또한 유가식 배양이 회분배양보다 높은 건조 균체농도와 긴 배양기간을 유지할수 있어 배양 공정을 scale up시 바람직할 것으로 판단된다.

Fig. 5는 연속배양을 실시한 결과로 희석율에 따른 건조 균체 농도와 pH변화를 나타낸 것이다. 희석율이 증가

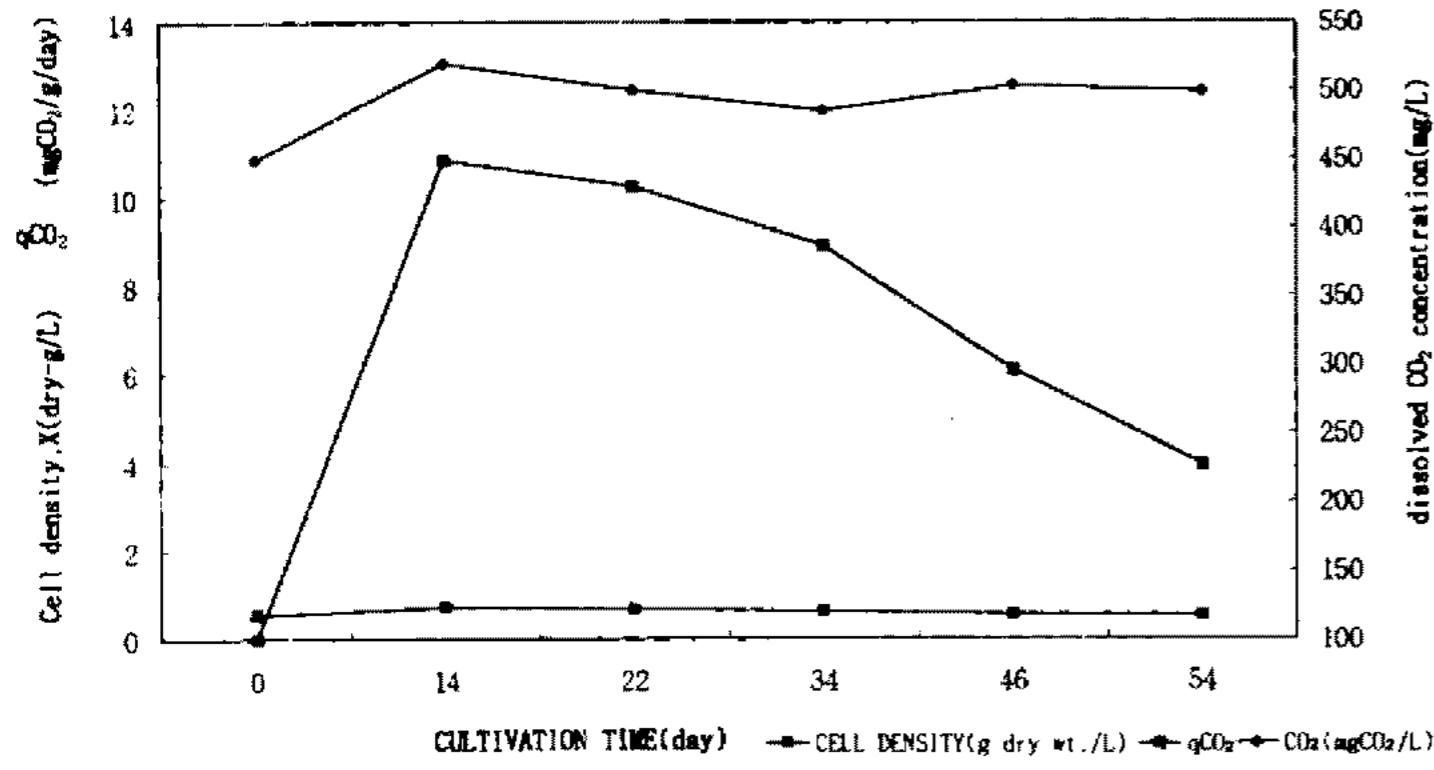


Fig. 6. The changes of cell density, residual carbon dioxide concentration and specific carbon dioxide consumption rate for continuous cultivation of *C. littorale* by adding 50%  $\text{CO}_2$  gas.

Table 1. Comparison of chemical composition of *C. littorale*, *Spirulina platensis* and *Chlorella pyrenoidosa*

Component (wt.%)	<i>C. littorale</i>	<i>Spirulina</i> <sup>(16)</sup>	<i>Chlorella</i> <sup>(16)</sup>
protein	32.5	46-63	57
lipid	27.54	4-9	2
carbohydrate	26.0	8-14	26
ash	11.7	42-14	15

함에 따라 세포 농도는 일정하게 유지되는 steady-state 상태에 도달했음을 보여주고 있다. 회석율이 0.065(1/day)일 때 최대 균체 농도인 0.64(g dry wt./L)를 유지하였다.

Fig. 6은 Fig. 5의 실험에서 회석율의 변화에 따른 용존 이산화탄소와 이산화탄소 소비속도를 나타낸 것으로 최대  $q_{\text{CO}_2}$ 는 배양 14일째 0.065(1/day)의 회석율에서 10.87 (mg $\text{CO}_2$ /g dry wt./L)로 나타났다. 회석율이 높아질수록 이산화탄소 비 소비속도는 포화상태에 도달후 서서히 감소함을 알 수 있다. 또한 용존 이산화탄소 농도와 균체농도의 변화가 미미한점으로 미루어 각 회석율에서의 안정상태로의 도달을 알 수 있다.

Table. 1은 *C. littorale*의 식품학적 조성을 비교한 결과로써 본 실험에서 사용된 균주가 *Spirulina*와 *Chlorella*에 비해 단백질 함량은 낮으나 탄수화물과 지질의 함량이 높은 것을 알 수 있다. 본 논문에서는 나타내지는 않았으나 아미노산조성은 세종류 모두 대체로 유사하였으나 arginine의 경우 *C. littorale*에 50%  $\text{CO}_2$  공급시 16.5%였으나 *S. platensis*는 1.03%, *Chlorella*는 3.06%로 본실험에서 사용된 균주에서 월등히 높은 수치를 나타냈으며 제1,2제한 아미노산 함량이 높아 *C. littorale*부산물들의 사료원 이용이 가능한 것으로 평가된다.

## 요 약

광합성 미세 조류인 *Chlorococcum littorale*을 이용해 이산화탄소의 생물학적 고정화를 위한 실험을 실시하였

다. 광도에 따른 균체의 최적 생육 조건을 구해본 결과 light-inhibition growth를 나타내어서 이 model을 적용해 생육 변수들을 측정된 결과  $\mu_{\text{max}}$ 는 0.095(1/day),  $K_0$ 는 8(W/m<sup>2</sup>) 그리고  $K_1$ 는 각각 35(W/m<sup>2</sup>)를 나타냈다. 이산화탄소 유입 농도에 따른 생육 속도를 살펴볼때 생육최적 이산화탄소농도는 20%였으나, 경제성을 고려한 최대 이산화탄소 농도는 50%였다. 광배양조에서 회분 배양시 배양 8일째  $q_{\text{CO}_2}$ 가 17.48(mg  $\text{CO}_2$ /g dry wt./L)로 가장 높은 수치를 보였으며, 유기식 배양에서는 용존 이산화탄소 농도는 381.6(mg  $\text{CO}_2$ /L)를 최종 나타냈으며  $q_{\text{CO}_2}$ 는 배양 32일에서 11.2(mg  $\text{CO}_2$ /g dry wt./L)로 가장 높았다.

연속배양시 이산화탄소 비 소비속도는 배양 14일째 0.065(1/day)의 회석율에서 10.87(mg $\text{CO}_2$ /g dry wt./L)로 나타났다. 또한 균체 증가속도와 이산화탄소의 고정화율은 비례한다는 사실을 본 실험 결과로 알 수 있었다. 균체의 식품 화학적 조성은 단백질이 32.5%, 지방 27.5% 그리고 탄수화물이 26%로서 기존의 잘알려진 *S. platensis*, *Chlorella*와 비교시 크게 뒤지지 않았다.

## 감사의말

본 연구는 농림수산부 지원의 농업 특정연구 현장 애로 사업(95-98)의 일환으로 수행한 결과 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. 이선복, 박찬범, 서인수. 1995. 생물학적 이산화탄소 고정화 공정의 개발. *Chemical Industry and technology*. 13(4): 13-19.
2. 박진원, 이승무 등. 1993. 이산화탄소에 의한 지구온난화와 대책기술의 연구동향. *화학 공업과 기술*. 11(4): 218.
3. 박찬범, 이선복. 1993. 제철소 부생가스의 생물학적 전환 기술. *생물화공*. 8(2): 49.
4. 조중훈, 양지원. 1995. 조류를 이용한 이산화탄소 고정화 제거 기술. *Recent Advances in Bioprocess Engineering*. 3: 157-165.
5. 민병무, 김성현, 손재익. 1992. 에너지 이용과 지구온난화 대책. *화학공업과 기술*. 10(2): 68.
6. Lowry, O. H., N. J. Rosebrought, A. L. Farr, and R. J. Randall., 1951, Protein measurements with the Folin phenol reagent, *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.
7. Birmingham, C. and B. Colman.1979. Measurement of Carbon Dioxide Compensation Points of Freshwater Algae. *Plant Physical*. 64: 892-895.
8. Satoshi, H., M. Hayashitani, M. Taya, and S. Tone. 1996. Carbon Dioxide Fixation in Batch Culture of *Chlorella* sp. Using a Photobioreactor with a Sublight-Collection

- Device. *J. Ferment. and Bioeng.* **81**(5): 470-472.
9. Hans, Q. and L. Gregory., 1994. Photolithotrophic Cultivation of *Laminaria saccharina* Gametophyte Cells in a Stirred-Tank Bioreactor. *Biotechnol. and Bioeng.* **45**: 251-260.
  10. Clement, C., C. Giddey. and R. Menzi., 1967. Amino acid composition and Nutritive Value of the Algae *Spirulina maxima*. *J. Sci. Fd. Agric.* **18**: 497-501.
  11. Lee Y. K. and C. S. Low., 1993. Productivity of outdoor algal cultures in enclosed tubular photobioreactor. *Biotechnol. and Bioeng.* **41**: 1003-1006.
  12. Tomaselli, L., L. Giovannetti., B. Pushparaj. and G. Torziolo., Monogr.1987. Effects of temperature on growth and biomevhanical composition in *Spirurina platensis*. *CNR-IPRA, Roma* 15-30.
  13. Peter A. T. and M. Guo., 1992. Effects of Variation in Temperature on the Biochemical Composition of Eight Species of Marine Phytoplankton. *J. Phycol.* **28**: 481-488.
  14. Grima, E. M., Perez, J.A.S., Camancho, and F. G., Medina, A. R. 1993. Gas-liquid transfer of CO<sub>2</sub> in microalgal culture. *J.Chem. Tech. Biotechnol.* **56**: 329-337.
  15. Kodama, M., H. Ikemoto, and S. Miyachi., 1993. A new species of highly CO<sub>2</sub>-tolerant fast-growing marine microalga suitable for high-density culture. *J. Mar. Biotech* **1**: 21-25.
  16. Becker, E. 1994. Chemical composition. *Microalgae Biotechnology and microbiology.* 178-179.

(Received 10 February 1997)