

## 반연속식 운전에서 *Chlorella* sp. HA-1의 이산화탄소 고정화 특성

†이재영·강현아·양지원  
한국과학기술원 화학공학과 생물환경공학연구소  
(접수 : 1999. 12. 1., 게재승인 : 1999. 12. 17.)

## The Characteristics of Carbon Dioxide Fixation by *Chlorella* sp. HA-1 in Semi-continuous Operation

Jae-Young Lee†, Hyun-Ah Kang, and Ji-Won Yang  
Dept. of Chemical Engineering, KAIST, Taejeon 305-701, Korea  
(Received : 1999. 12. 1., Accepted : 1999. 12. 17.)

The microalgal, *Chlorella* sp. HA-1, had good CO<sub>2</sub> fixation efficiency compared to other algal strains at the same operating condition. In this study, *Chlorella* sp. HA-1 showed similar tolerance both 10% and 20% CO<sub>2</sub> concentration. By optimization of the major operation variables such as pH, initial cell concentration, light intensity, the CO<sub>2</sub> fixation rate could be raised to a reasonably high value, 372 gCO<sub>2</sub>/m<sup>2</sup>·day in a 3 L internally illuminated photobioreactor. In order to maintain the CO<sub>2</sub> fixation rate for a long time, the method of semi-continuous operation was employed, in which dilution ratio was the controlling parameter. Starting with the dilution ratio of 0.5 with the increased increment of 0.1, the constant CO<sub>2</sub> fixation rate was obtained.

**Key Words** : biological CO<sub>2</sub> fixation, semi-continuous operation, *Chlorella* sp. HA-1

### 서 론

지구 온난화 현상이 심각해짐에 따라 최근 세계 각지에서는 각종 이상 기후현상들이 발생하고 있다. 그로 말미암아, 지구 온난화 현상의 주원인인 이산화탄소 배출량 감축에 대한 국제적인 논의가 계속되고 있고, 배출되는 이산화탄소를 효율적으로 제거할 수 있는 기술 개발에 관한 연구들이 다양하게 진행되고 있다. 특히 광합성 미생물을 이용하는 생물학적 고정화 방법은 고온, 고압에서 행해지는 화학적 고정화 방법에 비해 반응속도가 늦어 생산성과 효율이 떨어지는 반면, 상온 상압하에서 태양에너지와 해수만으로 이산화탄소를 고정화할 수 있고, 최종 산물인 biomass를 동물의 사료나 청정연료 등으로 재이용할 수 있는 장점을 지니고 있다(1-3).

생물학적 이산화탄소 고정화 공정에서 가장 중요한 과정은 광합성 미생물의 고농도 및 대량배양기술을 확립하는 것이다. 지금까지 개발되어진 배양 기술들은 공통적으로 미생물이 고농도일 때 반응기내로의 효율적인 빛 공급의 어려움, 반응기의 scale-up으로 인한 효율 저하 등의 문제점을 지니고 있다(3-7). 또한 광합성 미생물을 배양할 때 대표적으로 사용하는 방법이 회분식

(batch) 배양과 연속식(continuous) 배양인데, 이 방법들은 이산화탄소 고정화 효율을 유지하면서 동시에 장기간 운전을 할 수 없는 한계를 가지고 있다(8). 회분식 배양의 경우에는 균체가 성장기(growth phase)를 지나고 나면, 균체의 성장이 정지기(stationary phase)에 접어들게 된다. 다시 말하자면, 성장기 이후에는 균체에 의한 이산화탄소 고정화가 거의 이루어지지 않는다는 것을 의미한다. 반면 연속식 배양의 경우에는 장기간 운전은 가능하나, 지속적인 이산화탄소 고정화 효율을 얻을 수는 없다(8). 따라서 높은 광효율을 가진 광생물반응기의 개발과 동시에 이러한 반응기에서 장기간 지속적으로 이산화탄소를 고정화할 수 있는 새로운 배양방법을 적용하는 연구가 필요하다.

본 연구에서는 높은 이산화탄소 고정화 효율을 가지면서 동시에 장기간 운전을 할 수 있는 배양방법을 확립하기 위해 새로운 형태의 내부조사형 광생물반응기를 개발하였고, *Chlorella* sp. HA-1을 이용하여 최적 배양 조건을 확립하였으며, 이 결과를 바탕으로 반연속식(semi-continuous) 배양방법의 운전 조건을 결정하였다.

### 재료 및 방법

#### 균주 및 배지

본 실험에 사용된 균주는 이산화탄소에 대한 내성이 높고, 다른 미생물의 오염에 대해 강한 내성을 가지는 *Chlorella* sp. HA-1을 사용하였으며, 한국에너지기술연구소(KIER)로부터 기증 받았다(1). 배양을 위해 사용한 M4N 배지의 조성은 다음과 같다(1, 9). 증류수 1 L에 KNO<sub>3</sub> 5.0 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.25 g, MgSO<sub>4</sub>·

†Corresponding Author : Department of Chemical Engineering, KAIST, 373-1, Kusong-dong, Yusong-gu, Taejeon 305-701, Korea  
Tel : 042-869-3964, Fax : 042-869-3910  
E-mail : jwyang@cais.kaist.ac.kr

7H<sub>2</sub>O 2.5 g, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 3 mg, trace metal(H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 2.86 mg, MnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 2.5 mg, ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.22 mg, CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 0.08 mg, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 0.021 mg)을 용해시킨 후 121℃에서 15분간 멸균하여 사용하였다.

**광생물반응기**

길이가 55 cm이고 직경이 9 cm인 광생물반응기(총부피: 3 L, 운전부피: 2 L)를 아크릴로 제작하였다. 사용된 광원은 18 W 슬림라이트(FL20SD/18, Korea, Kumho)로 반응기의 내부에 설치하였으며, 반응기에 공급되는 가스는 100% 이산화탄소와 공기를 mixer기(MX-S, Tokyo, Japan)를 이용하여 일정비로 혼합하여 사용하였다(Figure 1). 반응기 내부의 온도는 반응기 외부에 설치된 water jacket을 이용하여 조절하였으며, 반응기에 공급하는 가스의 유량은 1 vol/vol · min(vvm)으로 조절하였다. *Chlorella* sp. HA-1은 약 15일간 10% 이산화탄소 농도에서 배양하여 수확한 후 원심분리를 하였다. 그리고 사멸 균체와 이온 물질을 제거하기 위해서 증류수로 여러 번 씻어낸 후, M4N 배지에 다시 suspension시켜 광생물반응기에 배양하였다.

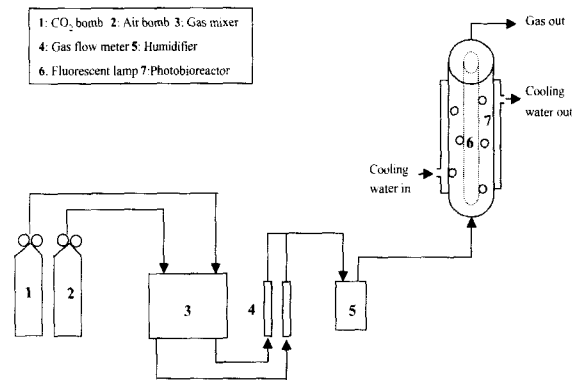


Figure 1. Schematic diagram of an internally illuminated photobioreactor system.

**분석방법**

광생물반응기에 조사되는 빛의 세기는 조도계(LI-250, LI-COR, Japan)를 사용하여 quantum의 양으로 측정하였다. 배지 중의 미세조류 농도는 UV spectrophotometer (8562A, Hewlett Packard, U.S.A)를 사용하여 660 nm에서 측정하였다. 균체건조량과 흡광도의 관계를 알기 위해서 균체 건조량은 50 mL의 배양액을 0.45 μm의 membrane filter로 여과한 후 80℃에서 24시간 건조한 후 무게차로 결정하였다. 그리하여 균체건조량=0.1705 × 흡광도(상관계수=0.99)의 관계를 얻었다. *Chlorella* sp. HA-1에 의해 소비된 이산화탄소량은 외부에서 이산화탄소 외에 다른 탄소원을 공급하지 않기 때문에 균체의 C, H, O, N의 원소성분을 분석한 결과를 통하여 간접적으로 계산할 수 있다(1, 2). 원소 분석은 한국화학연구소에 의뢰하였다. 그 결과 균체 성장량과 소비된 이산화탄소의 비는 1:1.6의 관계를 가졌다(data not shown).

**결과 및 고찰**

**이산화탄소 농도에 따른 성장 변화**

화력발전소나 대부분 산업체 시설에서 대기 중으로 방출되는

배기 가스 중에 이산화탄소의 함유량은 10~20%이다. 일반적으로 알려진 광합성 미생물들은 5~10% 이산화탄소 농도에서 성장이 저해되는 것으로 알려져 있으며, 최근 분리, 동정된 해양성 미세조류인 *Chlorococcum littorale* 등과 같은 일부 광합성 미생물들은 20~50% 이산화탄소 농도에서도 내성을 가지는 것으로 알려져 있다(10, 11). 본 실험에 사용한 균주인 *Chlorella* sp. HA-1의 경우 10% 이산화탄소 농도에 대해서는 강한 내성을 보이지만, 20% 이산화탄소 농도에서는 성장에 저해를 받는 것으로 알려져 있다(9). 그래서 본 연구에서는 *Chlorella* sp. HA-1의 이산화탄소 농도에 대한 내성을 향상시키기 위해 10%, 20% 이산화탄소 농도에서 각각 균주를 30일 간 적응(adaptation)시켰다.

균주를 적응시킨 후, 동일한 배양 조건에서 각각의 광생물반응기에 air와 CO<sub>2</sub> 농도를 10%, 20%로 각각 조절하여 이산화탄소 농도의 영향을 살펴보았다. 그 결과 air만을 공급해 주었을 경우, 고농도 이산화탄소를 공급하여 주었을 경우에 비해 균체의 성장 속도와 최대 균체 성장량이 현저히 떨어짐을 알 수 있었다. 이는 Air 속에 0.03%의 이산화탄소만이 함유되었기 때문에 탄소원의 부족으로 균체의 성장이 저해되는 것으로 사료된다. 반면 10% 이산화탄소와 20% 이산화탄소 농도에서 균체의 성장 속도가 거의 유사하게 나타났다(Figure 2). 이 결과는 *Chlorella* sp. HA-1이 20% 이산화탄소 농도에 대한 내성이 생겼음을 의미한다. 그러므로 화력발전소 같은 실제 산업체에서 배출되는 이산화탄소 농도에 대해 *Chlorella* sp. HA-1이 충분히 내성을 가질 수 있다.

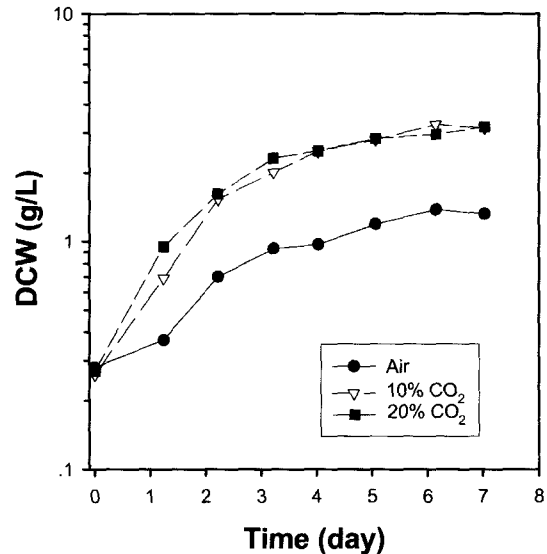
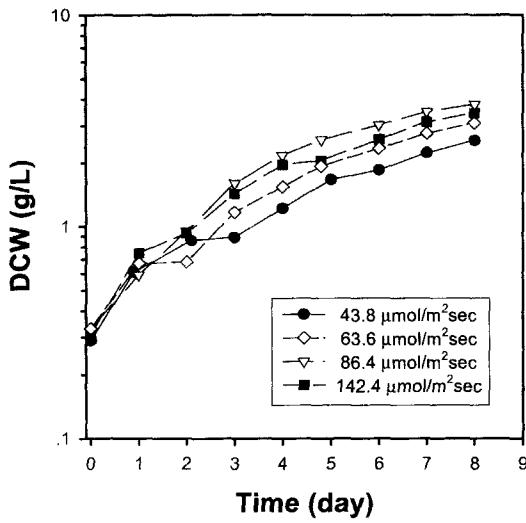


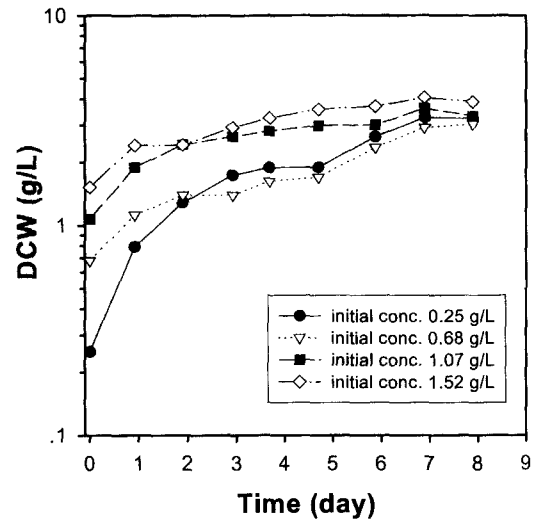
Figure 2. Effect of CO<sub>2</sub> concentration.

**광도(LI, Light intensity)에 따른 성장 변화**

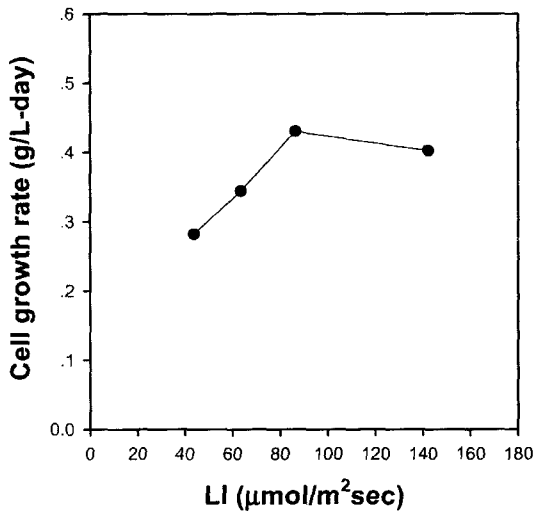
생물학적 이산화탄소 고정화 연구에서 광생물반응기의 운전효율을 높이기 위한 가장 중요한 인자는 광도이다(12). 본 연구에서는 최대의 균체의 성장속도를 얻을 수 있는 광도를 찾기 위하여 초기 광도를 각각 43.8, 63.6, 86.4, 142.4 μmol/m<sup>2</sup> · sec으로 조절하여 실험을 수행하였다. 광도는 반응기 내부에는 동일하게 1개의 형광등을 사용하고, 반응기 외부에 설치되어 있는 형광등의 개수를 달리하여 조절하였으며, 반응기 내부의 각각 다른 4곳의 지점에서 광도값을 측정하여 평균값을 계산하였다. 그 결



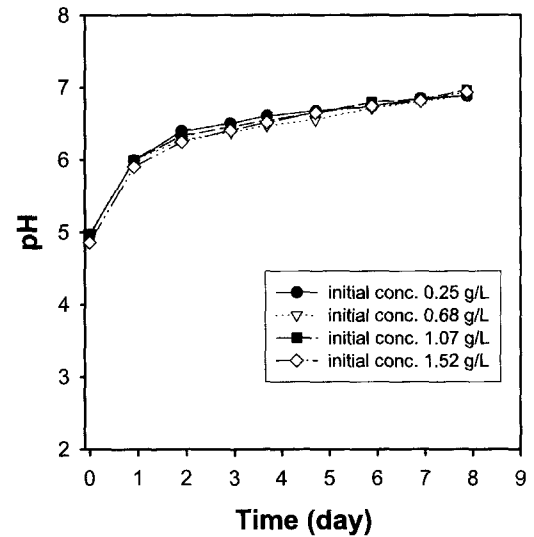
(A)



(A)



(B)



(B)

Figure 3. The cell growth (A) and the cell growth rate (B) with light intensity.

과 광도가 86.4  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$ 일 때, 최대의 균체성장속도를 나타내었다. 반면 광도가 142.4  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$ 의 경우에는 photo inhibition 현상이 일어나서 오히려 균체의 성장이 저해되는 현상을 나타내었다(Figure 3A, B). 이를 통해 일정 수준의 광도까지는 광도가 증가함에 따라 균체의 성장속도가 증가하지만, 그 이상에서는 오히려 성장이 저해됨을 확인할 수 있었다.

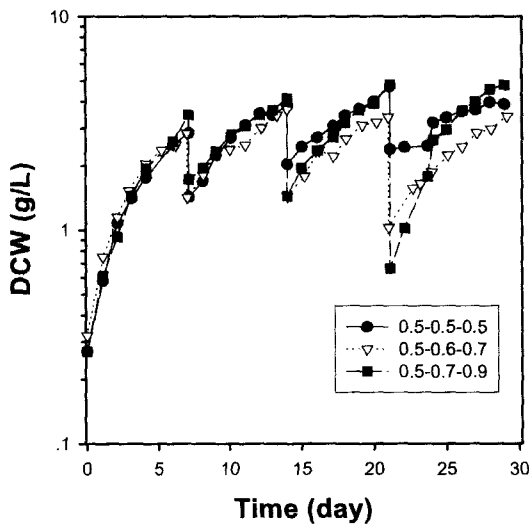
**초기 농도에 따른 성장 및 pH 변화**

광생물반응기에서 배지에 적정 초기균체량을 결정하는 것은 최대의 광에너지 전환 효율과 최대의 균체생성량을 얻기 위한 기본 전제가 된다(2). 그러므로 단위시간당 균체의 생성을 최대로 하기 위해서 즉, 최대의 이산화탄소 고정화 속도를 얻기 위해서 초기균체농도를 적절하게 조절하는 것은 중요하다.

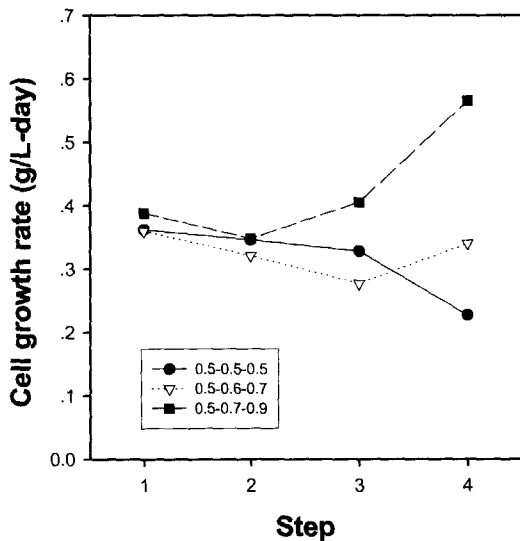
본 연구에서는 적절한 초기균체농도를 결정하기 위해서 10% 이산화탄소 농도에서 초기균체농도를 달리하여 단위 시간당 균

Figure 4. Effect of initial cell concentration (A) and the pH change (B).

체 성장 속도를 비교하는 실험을 수행하였다. 10% 이산화탄소 농도에서 최대의 균체성장속도를 갖는 초기균체농도를 보기 위하여 초기 농도를 0.25, 0.68, 1.07, 1.52 g/L로 각각 조절하였다. 그 결과, 초기균체농도가 증가함에 따라 최종균체농도는 향상되었으나, 균체의 성장속도는 떨어짐을 알 수 있었다(Figure 4A). 초기균체농도가 가장 낮은 0.25 g/L인 경우 최종 균체 농도는 3.26 g/L에 이르렀으며, 균체성장속도는 0.43 g/L·day이었다. 반면에 초기 농도가 가장 높은 1.52 g/L인 경우 최종 균체 농도는 초기 농도가 0.25 g/L인 경우에 비해 훨씬 향상된 4.06 g/L까지 이르렀으나, 균체성장속도는 오히려 0.36 g/L·day로 떨어졌다. 그러므로 높은 최종균체농도와 균체성장속도를 동시에 얻을 수 있는 초기 균체 농도를 선택하는 것은 중요하다. 그리하여 본 실험에서는 초기균체농도를 0.25 g/L로 하여 모든 실험을 수행하였으며, 이 때 최대 이산화탄소 고정화 속도는 372  $\text{gCO}_2/\text{m}^2 \cdot \text{day}$ 를 얻었다.



(A)



(B)

Figure 5. Effect of dilution ratio (A) and the cell growth rate per dilution period (B) in semi-continuous operation (the number: dilution ratio).

또한 초기균체농도에 따라 pH가 어떤 변화를 보이는지 살펴 보았다. Figure 4B에서 볼 수 있듯이 초기균체농도에 따른 pH의 변화 양상은 모두 비슷하게 나타났다. 초기 pH는 초기균체농도와 상관없이 5에서 시작하여 균체가 성장함에 따라 7까지 올라 갔다. Watanabe 등(9)의 실험을 통해 알려져 있듯이 *Chlorella* sp. HA-1의 경우 pH 6에서 8사이에서는 pH의 조절이 필요 없는 것으로 알려져 있다. 그러므로 본 실험에서는 초기균체농도에 관계없이 균체의 배양기간동안 pH 조절의 필요가 없었다.

**반연속식 운전**

본 연구에서는 배지에 적정 균체량을 유지하면서 균체성장속도를 최대로 하여 장기간 운전할 수 있는 공정으로 반연속식 공정을 사용하였다. 반연속식 공정이란, 균체의 성장이 지수 성장기(exponential growth phase)를 거쳐 선형성장기(linear growth

phase)에서 정지기로 접어들었을 때 새로운 배지로 기존의 배양액 일부를 교체하여 줌으로써 단위시간당 균체생성량을 계속 유지할 수 있는 공정을 말한다(13). 여기서 기존의 배양액 대신에 새로운 배지로 대체하는 작용을 희석(dilution)이라고 부르는데, 희석은 균체의 농도를 낮추어 줌으로써 반응기 내부에 조사되는 광도를 높여주고, 이산화탄소의 mass transfer 속도를 향상시켜 주는 역할을 한다. 그 결과 정지기에 접어들었던 균체의 성장이 다시 지수성장기의 형태를 띄게 된다. 그러므로 반연속식 공정은 지속적으로 균체성장속도를 유지하면서 이산화탄소를 고정화할 수 있는 공정이다.

반연속식 공정에서 가장 중요한 실험인자는 희석비(dilution ratio)인데, 희석비는 다음과 같이 계산한다.

$$D = \frac{V_n}{V_R}$$

여기서 D는 희석비, V<sub>R</sub>은 반응기의 운전부피, V<sub>n</sub>은 새로 첨가하는 배지의 부피를 나타낸다. 본 연구에서는 반연속식 공정에서 적절한 희석비를 결정하기 위하여 회분식 운전을 통해 얻은 최적의 배양조건에서 반응기를 한 달간 운전하였다. 희석은 균체의 성장이 정지기로 접어드는 시기인 7일째마다 하였다. 먼저 각각의 단계마다 비슷한 초기균체농도를 유지하기 위하여 희석비를 0.5로 일정하게 유지하는 실험을 수행하였다(Figure 5A). 그 결과, 처음 1주 동안에 균체의 성장속도가 0.362 g/L·day, 2주째에는 0.346 g/L·day, 3주째에는 0.328 g/L·day, 4주째에는 0.227 g/L·day로 나타났다(Figure 5B). 균체의 성장이 정지기에 접어들었을 때, 희석을 함으로써 장기간 균체의 성장속도를 유지할 수 있었으나, 일정비로 희석을 하였을 경우, 시간이 지남에 따라 균체성장속도가 감소하는 경향을 나타내었다. 특히 4주째에는 균체성장속도가 현저하게 떨어짐을 볼 수 있었다.

그래서 각각의 단계마다 희석비를 변화시켜서 균체의 성장속도를 살펴보는 실험을 진행하였다. 희석비를 각각의 단계마다 0.1, 0.2씩 증가시켜 희석비에 따른 균체성장속도의 변화를 비교하였다. 그 결과, 희석비를 0.1씩 증가시켰을 경우에는 균체의 성장속도가 각각의 단계마다 0.360, 0.321, 0.277, 0.340 g/L·day로 변했으며, 0.2씩 증가시켰을 경우에는 0.388, 0.348, 0.405, 0.565 g/L·day로 변했다(Figure 5A, B). 이와 같이 희석비를 변화시켰을 경우, 희석비를 0.5로 유지한 경우와는 달리 균체성장속도가 지속적인 감소 경향을 보이지는 않았다. 그러므로 장기간 운전하면서 일정한 균체성장속도를 유지하기 위해서는 적절한 희석비를 결정하는 것이 중요하다.

**요약**

새로운 형태의 내부조사형 광생물반응기에서 *Chlorella* sp. HA-1의 이산화탄소 고정화 특성을 살펴보았다. 높은 이산화탄소 농도에서 균체를 적응시켜 10%와 20% (v/v) 이산화탄소 농도 모두에서 내성을 가지도록 하였다. 그리고 조도, 초기균체농도, pH 등을 조절하여 이산화탄소 고정화량, 372 gCO<sub>2</sub>/m<sup>2</sup>·day을 얻었다. 또한 장기간 동안 지속적으로 배출되는 이산화탄소를 제거하기 위한 운전 방법으로 반연속식 배양방법을 사용하여 희석비를 0.1씩 증가시켰을 때 각 단계마다 균체성장속도를 일정

하게 유지하는 결과를 얻었다.

### 감 사

본 연구는 에너지관리공단의 청정에너지기술개발사업(과제번호 96C-CD02-P-01)의 연구비 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

### REFERENCES

1. Sung, Ki-Don, Jin-Suk Lee, Chul-Seung Shin, Mi-Sun Kim, Soon-Chul Park, and Seung-Wook Kim (1996), CO<sub>2</sub> fixation by *Chlorella* HA-1 cultured in bubble columns, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **26**(1), 1-6
2. Kim, Jang Kyu, Sung Ho Won, and Nam Ki Kim (1997), Biological fixation of carbon dioxide by *Synechocystis* pcc 6803, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **13**(1), 101-107
3. Karube I., T. Takeuchi, D. J. Barnes (1992), Biotechnological reduction of CO<sub>2</sub> emissions, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **46**, 63-78
4. John Pirt S., Yuan Kun Lee, Marek R. Walach, Margaret Watts Pirt (1983), A tubular bioreactor for photosynthetic production of biomass from carbon dioxide : Design and performance, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **33**, 35-38
5. Carlozzi P., G. Torzillo (1996), Productivity of *Spirulina* in a strongly curved outdoor tubular photobioreactor, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **45**, 18-23
6. Watanabe Y., D. O. Hall (1996), Photosynthetic production of the filamentous cyanobacterium *Spirulina platensis* in a cone-shaped helical tubular photobioreactor, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **44**, 693-698
7. Kei Mori (1995), Photoautotrophic bioreactor using visible solar rays condensed by fresnel lenses and transmitted through optical fibers, *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, **15**, 331-345
8. Hirata Satoshi, Masahito Taya, Setsuji Tone (1996), Characterization of *Chlorella* cell cultures in batch and continuous operations under a photoautotrophic condition, *J. Chem. Eng. Japan*, **29**(6), 953-959
9. Watanabe Y., N. Ohmura, H. Saiki (1992), Isolation and determination of cultural characteristics of microalgae which functions under CO<sub>2</sub> enriched atmosphere, *Energy Convers. Mgmt.*, **33**(5-8), 545-552
10. Hu Q., N. Kurano, M. Kawachi, I. Iwasaki, S. Miyachi (1996), Ultrahigh-cell-density culture of a marine green alga *Chlorococcum littorale* in a flat-plate photobioreactor, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **49**, 655-662
11. Negoro Masaaki, Norio Shioji, Yoshiaki Ikuta, Takenori Makita, Makoto Uchiumi (1992), Growth characteristics of microalgae in high-concentration CO<sub>2</sub> gas, effects of culture medium trace components, and impurities thereon, *Appl. Biochem. Biotech.*, **34/35**, 681-692
12. Ogbonna James C., Hideo Tanaka (1997), Industrial-size photobioreactors, *Chemtech.*, 43-49
13. Yanagi M., Y. Watanabe, H. Saiki (1995), CO<sub>2</sub> fixation by *Chlorella* sp. HA-1 and its utilization, *Energy Convers. Mgmt.*, **36**(6-9), 713-716