

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0159507

(43) 공개일자 2024년11월05일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C12P 3/00* (2006.01) *C12M 1/00* (2006.01)  
*C12N 1/12* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*C12P 3/00* (2013.01)  
*C12M 21/12* (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2024-0055906  
 (22) 출원일자 2024년04월26일  
 심사청구일자 2024년04월26일
- (30) 우선권주장  
 1020230056016 2023년04월28일 대한민국(KR)

- (71) 출원인  
 연세대학교 산학협력단  
 서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
- (72) 발명자  
 안현서  
 서울특별시 서초구 방배로2길 24-6, 13-607 (방배동, 임광아파트)
- 류원형  
 경기도 고양시 일산서구 대산로 161, 503동 1404호 (주엽동, 문촌마을5단지아파트)  
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
 특허법인지담

전체 청구항 수 : 총 13 항

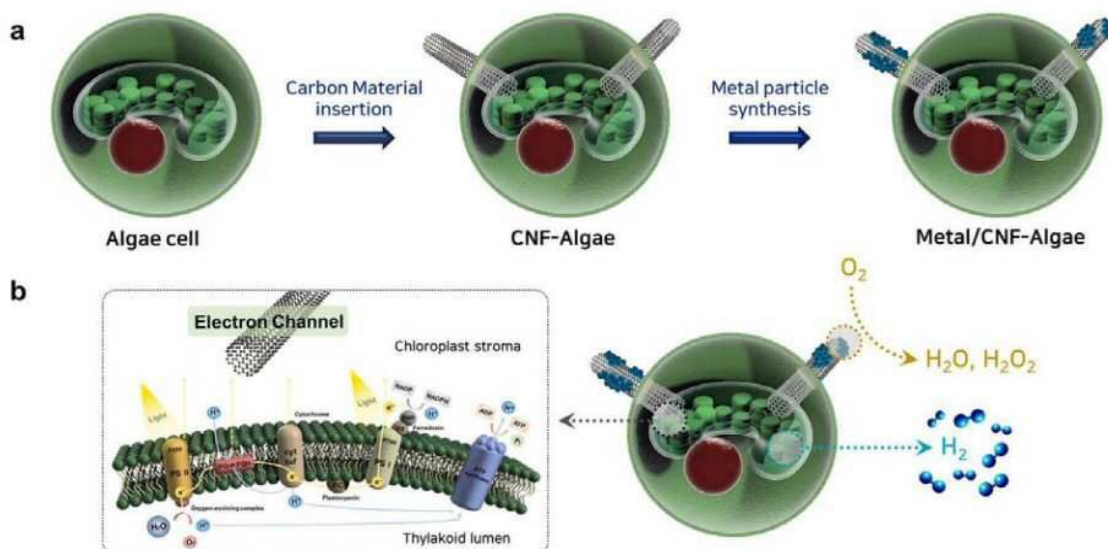
(54) 발명의 명칭 도선이 삽입되도록 조작된 세포를 이용한 수소생산방법

## (57) 요약

본 발명은 엽록체를 포함하는 세포; 및 상기 세포에 삽입된 도선을 포함하고, 상기 도선은 엽록체의 틸라코이드 막에 접촉하거나 관통하도록 삽입되어 광 에너지에 의해 광합성 전자가 세포 밖으로 추출될 수 있도록 조작된 세포를 이용하여 수소를 생산하는 방법 및 수소 생산 시스템에 관한 것이다.

(뒷면에 계속)

## 대표도 - 도1



본 발명에 따르면 엽록체를 포함하는 세포의 광합성 전자를 세포 밖으로 추출할 수 있도록 도선을 세포 내로 삽입한 조작된 세포를 제공하고, 이러한 조작된 세포의 광합성 전자를 활용한 금속촉매를 제공할 수 있다. 또한, 이를 이용하여 광합성 동안 발생하는 산소를 촉매하여 낮은 농도로 자가제어하며, 양성자를 촉매하여 지속적인 수소생산이 가능한 수소생산 시스템 및 방법을 제공할 수 있다. 또한, 본 발명에 따르면 전자원으로 CO<sub>2</sub>와 물만 소비하여 태양광을 연료로 전환할 수 있고, 특히 비용 효율성과 생산된 연료의 즉각적인 가용성 측면에서 매우 우수한 인공 광합성 시스템을 제공하는 효과가 있다.

(52) CPC특허분류

**C12N 1/12** (2019.02)

(72) 발명자

**권효진**

서울특별시 서대문구 연희로12길 46, 304호 (연희동)

**윤재형**

서울특별시 영등포구 디지털로 394, 602호 (대림동, 구레학사)

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

세포 외부에서 엽록체 내부까지 도선이 삽입되도록 조작된 엽록체를 포함하는 세포와 금속 이온 용액의 혼합물에 빛을 조사하여 수소를 생산하는 방법.

#### 청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 방법은

- a) 빛에 의해 세포 내부의 광합성 전자가 도선을 통해 세포 외부로 추출되는 단계;
- b) 상기 추출된 광합성 전자가 도선 표면에서 금속 이온을 형성하는 단계; 및
- c) 상기 금속 이온이 형성된 도선 표면에서 수소가 발생하는 단계;를 포함하는 것인, 수소를 생산하는 방법.

#### 청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 금속 이온은 금, 백금, 구리, 은, 철, 니켈, 코발트 및 납으로 구성된 군에서 선택되는 것인, 수소를 생산하는 방법.

#### 청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 빛은 0.1 내지 15 mW/cm<sup>2</sup>의 광량으로 조사되는 것인, 수소를 생산하는 방법.

#### 청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 빛은 5 내지 20 시간 동안 조사되는 것인, 수소를 생산하는 방법.

#### 청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 c) 단계의 초기에는 산소 환원 반응에 의해 금속 이온 용액 내의 산소가 제거되는 것인, 수소를 생산하는 방법.

#### 청구항 7

제 1항에 있어서,

상기 c) 단계에서 금속 이온 용액 내의 산소가 제거된 이후에 수소 발생 반응이 일어나는 것인, 수소를 생산하

는 방법.

#### 청구항 8

제 1항에 있어서,

상기 도선은 탄소나노물질 또는 전도성 금속 물질로 이루어진 것인, 수소를 생산하는 방법.

#### 청구항 9

제 8항에 있어서,

상기 전도성 금속은 금, 백금, 구리, 은, 철, 니켈, 코발트 및 납으로 구성된 군에서 선택되는 것인, 수소를 생산하는 방법.

#### 청구항 10

제 1항에 있어서,

상기 세포는 조류세포, 식물세포 및 엽록체를 포함하는 인공 세포로 구성된 군에서 선택되는 것인, 수소를 생산하는 방법.

#### 청구항 11

세포 외부에서 엽록체 내부까지 도선이 삽입되도록 조작된 엽록체를 포함하는 세포, 엽록체를 포함하는 정상 세포 및 금속 이온 용액을 포함하는 광합성 유도부;

빛 공급부;

CO<sub>2</sub> 공급부; 및

밀폐된 수소 저장부;를 포함하는 수소 생산 시스템.

#### 청구항 12

제 11항에 있어서,

상기 엽록체를 포함하는 정상 세포와 상기 조작된 세포는 1: 1 내지 3의 비율로 존재하는 것인, 수소 생산 시스템.

#### 청구항 13

제 11항에 있어서,

상기 엽록체를 포함하는 정상 세포와 상기 조작된 세포는 금속 이온 용액 내에서 부유하는 것인, 수소 생산 시스템.

### 발명의 설명

### 기술 분야

본 발명은 엽록체를 포함하는 세포; 및 상기 세포에 삽입된 도선을 포함하고, 상기 도선은 엽록체의 틸라코이드 막에 접촉하거나 관통하도록 삽입되어 광 에너지에 의해 광합성 전자가 세포 밖으로 추출될 수 있도록 조작된

[0001]

세포를 이용하여 수소를 생산하는 방법 및 수소 생산 시스템에 관한 것이다.

## 배경 기술

- [0003] 화석 연료의 고갈 및 환경 오염 문제로 지속 가능한 에너지원에 대한 수요가 증가하고 있으며, 더불어 태양에너지에 대한 관심도 급증하고 있다. 하지만 태양에너지는 직접적인 사용이 어려워 지열, 전력 등 다른 형태의 에너지로 변환하려는 연구가 지속적으로 이루어지고 있다. 여러 에너지 중에서 수소 연료는 탄소배출이 없고(carbon-free), 재사용이 가능한 장점이 있다. 또한, 가장 높은 에너지 밀도를 가지고 있으며, 생성물이 순수물이라 친환경적이다. 태양 에너지를 수소로 저장하는 방법의 하나로 재생 가능하고 생물학적 촉매의 다양한 조절이 가능한 생물학적 태양에너지-수소에너지 변환(solar to H<sub>2</sub>) 방법에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.
- [0004] 최근 주목받는 생물학적 태양에너지-수소에너지 변환 방법은 녹조류(green algae), 남세균(cyanobacteria), 자색 광합성 세균(purple photosynthetic bacteria)으로 대표되는 수소화효소-발현 유기물을 통한 수소 생산이다. 녹조류의 [FeFe]-수소화효소, 남세균의 [NiFe]-수소화효소(유기물 생체 내부의 수소화효소)를 이용한 태양에너지-수소에너지 전환이 대표적이다. 하지만 유기물 내부의 광계 2(Photosystem 2)를 이용한 수소 생산은 산소(O<sub>2</sub>) 생산을 수반하며 생산된 산소는 수소화효소의 기능을 저하하게 되어, 유기물에 빛을 조사하면서 그 즉시 무산소 환경을 만들거나 산소에 저항성이 있는(민감하지 않은) 수소화효소 개발을 위한 분자생물학적 조작이 필요하다는 한계가 있다. 이에 따라, 태양에너지의 수소 에너지로의 전환 효율을 높임과 동시에 전자 공여체(electron donor)로 물을 사용하기 위해서는 기존 방식과 다른 새로운 수소 생산 방법이 필요한 실정이다.
- [0005] 이에 본 발명자들은 태양광을 연료로 전환할 수 있는 효율적인 새로운 광생물학적 수소 생산 방법을 개발하고자 노력한 결과, 엽록체를 포함하는 세포의 광합성 전자를 세포 밖으로 추출할 수 있도록 도선을 세포 내로 삽입한 조작된 세포와 이를 이용한 수소 생산 시스템을 완성하게 되었다.

## 선행기술문헌

### 비특허문헌

- [0007] (비특허문헌 0001) 1. Jie Chen et al. Adv. NanoBiomed Res. 2021, 1, 2000051.
- (비특허문헌 0002) 2. Yimin Chen, Energy Environ. Sci., 2022, 15, 2843-2857.
- (비특허문헌 0003) 3. Jie Chen et al. Energy Environ. Sci., 2020, 13, 2064-2068.
- (비특허문헌 0004) 4. 신중환, 박태현, Korean Chem. Eng. Res., 2006, 44, 16-22.
- (비특허문헌 0005) 5. 김봉진, 김종욱, Trans. of the Korean Hydrogen and New Energy Society, 2008, 19, 322-330.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 목적은 엽록체를 포함하는 세포; 및 상기 세포에 삽입된 도선을 포함하고, 상기 도선은 엽록체의 틸라코이드 막에 접촉하거나 관통하도록 삽입되어 광 에너지에 의해 광합성 전자가 세포 밖으로 추출될 수 있도록 조작된 세포를 이용하여 수소를 생산하는 방법 및 수소 생산 시스템을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

- [0010] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명의 일 양상은 세포 외부에서 엽록체 내부까지 도선이 삽입되도록 조작된 엽록체를 포함하는 세포와 금속 이온 용액의 혼합물에 빛을 조사하여 수소를 생산하는 방법을 제공한다.

- [0011] 또한, 본 발명은 세포 외부에서 엽록체 내부까지 도선이 삽입되도록 조작된 엽록체를 포함하는 세포, 엽록체를 포함하는 정상 세포 및 금속 이온 용액을 포함하는 광합성 유도부; 빛 공급부; CO<sub>2</sub> 공급부; 및 밀폐된 수소 저장부;를 포함하는 수소 생산 시스템을 제공한다.
- [0012] 본 발명에 있어서, 상기 도선은 엽록체 틸라코이드 막과 접촉하거나 관통하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0013] 또한, 상기 도선은 탄소나노물질 또는 전도성 금속 물질로 이루어진 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 전도성 금속은 금, 백금, 구리, 은, 철, 니켈, 코발트 및 납으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0014] 또한, 상기 도선의 직경은 100 내지 400nm이고, 상기 도선의 길이는 5 내지 30  $\mu$ m인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0015] 본 발명에 있어서, 상기 세포는 조류세포, 식물세포 및 엽록체를 포함하는 인공 세포로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0016] 본 발명에서, 상기 조작된 세포는 빛에 의해 발생한 세포 내부의 광합성 전자가 도선을 통해 세포 외부로 전달되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0017] 이 때, 상기 빛은 0.1 내지 15 mW/cm<sup>2</sup>의 광량으로 조사될 수 있고, 5 내지 20 시간 동안 조사되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0018] 본 발명에 따른 수소 생산 방법에 있어서, 상기 방법은 a) 빛에 의해 세포 내부의 광합성 전자가 도선을 통해 세포 외부로 추출되는 단계; b) 상기 추출된 광합성 전자가 도선 표면에서 금속 이온을 형성하는 단계; 및 c) 상기 금속 이온이 형성된 도선 표면에서 수소가 발생하는 단계;를 포함할 수 있다.
- [0019] 이 때, 상기 c) 단계의 초기에는 산소 환원 반응에 의해 금속 이온 용액 내의 산소가 제거되고, 산소가 제거된 이후에 수소 발생 반응이 일어나는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0020] 본 발명에 따른 수소 생산 시스템에 있어서, 엽록체를 포함하는 정상 세포와 도선이 삽입되도록 조작된 세포는 1: 1 내지 3의 비율로 존재하는 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 엽록체를 포함하는 정상 세포와 상기 조작된 세포는 금속 이온 용액 내에서 부유하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0021] 또한, 이 때, 상기 b) 단계 이후에 금속 이온 용액을 제거하고, 금속 이온을 포함하지 않는 수소 생산을 위한 깨끗한 배양액으로 교체하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다. 이는 b) 단계를 통해 도선 표면에 금속 이온이 충분히 형성되었으므로, 불필요한 지속적인 금속 이온 환원 반응을 방지하고 수소 생산 반응의 효율을 높이기 위함이다.

### 발명의 효과

- [0023] 본 발명에 따르면 엽록체를 포함하는 세포의 광합성 전자를 세포 밖으로 추출할 수 있도록 도선을 세포 내로 삽입한 조작된 세포를 제공하고, 이러한 조작된 세포의 광합성 전자를 활용한 금속촉매를 제공할 수 있다. 또한, 이를 이용하여 광합성 동안 발생하는 산소를 촉매하여 낮은 농도로 자가제어하며, 양성자를 촉매하여 지속적인 수소생산이 가능한 수소생산 시스템 및 방법을 제공할 수 있다.
- [0024] 또한, 본 발명에 따르면 전자원으로 CO<sub>2</sub>와 물만 소비하여 태양광을 연료로 전환할 수 있고, 특히 비용 효율성과 생산된 연료의 즉각적인 가용성 측면에서 매우 우수한 인공 광합성 시스템을 제공하는 효과가 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [0026] 도 1은 본 발명의 일 예에 따른 수소 생산용 세포 시스템 및 이를 이용한 수소 생산 방법을 개략적으로 보여준다.
- 도 2는 본 발명에 사용된 녹조류 세포의 탄소 나노 섬유 삽입 형태의 광학 이미지이다.
- 도 3은 본 발명에 사용된 규조류 세포의 탄소 나노 섬유 삽입 형태의 광학 이미지이다.
- 도 4는 본 발명에 사용된 도선 종류에 따른 탄소 나노 섬유 삽입 형태의 광학 이미지이다.

도 5는 탄소 나노 로드 분산액을 보여준다.

도 6은 탄소 나노 로드를 식물세포에 도입하는 방법을 개략적으로 보여준다.

도 7은 탄소 나노 섬유의 직경 조절을 통한 세포 삽입률을 확인한 것이다.

도 8은 단일 세포 단위 광합성 전류 추출을 분석한 것이다.

도 9는 탄소 나노 로드와 도입된 식물세포와 금속 이온 용액의 혼합물에 빛을 조사한 후 식물세포 외부에 노출된 탄소 나노 로드와 금속 이온 입자가 형성되었는지 확인한 결과이다.

도 10은 탄소 나노 로드와 금속 이온 입자 형성과 구리, 은의 경우 세포 독성으로 인한 세포 사멸을 확인한 것이다.

도 11은 본 발명에 따른 인공 광합성 시스템의 에너지 이동 및 저장 경로 모식도이다.

도 12는 식물세포 외부에 노출된 탄소 나노 로드와 금속 이온 입자를 형성시킨 후 해당 식물세포로 밀폐 배치를 구성한 모습을 보여준다.

도 13은 빛 조사 시간 경과에 따른 밀폐 배치 내부의 산소 농도 및 생산된 수소 농도를 측정한 결과이다.

도 14는 엔지니어링 세포의 비율 최적화 및 배치 부피에 따른 수소 생산량 변화를 확인한 것이다.

도 15는 광합성 CO<sub>2</sub> 고정을 통한 이산화탄소 저감 효과를 확인한 것이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0027] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명의 일 양상은 엽록체를 포함하는 세포; 및 상기 세포에 삽입된 도선을 포함하고, 상기 도선은 엽록체의 틸라코이드 막에 접촉하거나 관통하도록 삽입되어 광 에너지에 의해 광합성 전자가 세포 밖으로 추출될 수 있도록 조작된 세포를 제공한다.
- [0028] 엽록체(chloroplast)는 진핵생물에서 광합성을 하는 세포 소기관으로 외막과 내막의 이중막으로 이루어져 있으며, 내부에는 납작한 틸라코이드(thylakoid)가 존재한다. 틸라코이드의 외부는 기질인 스트로마(stroma)로 채워져 있다. 틸라코이드 막에서 명반응이 일어나며, 물을 분해하여 산소를 방출하면서 NADPH와 ATP를 생성한다. 암반응은 명반응의 결과물인 NADPH와 ATP로 이산화탄소를 환원시켜 포도당(C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>)을 합성한다. 본 발명에서 엽록체의 광합성 과정에서 발생한 전자는 엽록체 틸라코이드 막에서 세포 밖으로 이어지는 도선을 통해 세포 외부로 추출될 수 있다.
- [0029] 본 발명에서, '도선(electric wire, chord)'은 전류가 흐를 수 있도록 도체를 길고 가는 선으로 만든 것을 말하며, 전선이라는 용어도 사용될 수 있다. 상기 도선은 전도성 튜브 형태일 수 있으며, '전도성 튜브'는 전도성 물질로 이루어진 관 형태의 구조물을 말한다.
- [0030] 상기 도선 또는 전도성 튜브는 도 1에 제시된 바와 같이 세포 외부에서 엽록체 내부까지 삽입되어 엽록체 내부와 세포 외부를 연결하며, 광합성 전자를 세포 밖으로 추출하는 역할을 한다. 이 때, 도선 또는 전도성 튜브는 엽록체 틸라코이드 막에 접촉하거나 이를 관통할 수 있고, 하나의 틸라코이드 막에 하나 또는 여러 개의 도선 또는 전도성 튜브가 접촉할 수 있다. 또한, 세포 외부의 산소가 전자를 얻어 물로 환원될 수 있도록 상기 도선 또는 전도성 튜브의 일부는 세포 외부로 노출되어 있다.
- [0031] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 도선 또는 전도성 튜브는 탄소 또는 전도성 금속으로 이루어지며, 전도성 금속은 백금, 금, 은, 구리, 철, 니켈, 코발트 또는 납을 포함할 수 있고, 세포 독성이 높은 금속을 제외하고 다양한 전도성 금속이 사용될 수 있다. 본 발명에서는 탄소계열 전도성 물질로 탄소 나노 섬유와 금속형 전도성 물질로 금을 각각 사용하여 엽록체 삽입을 실시하고, 특히 탄소 나노 섬유의 직경과 길이를 달리하여 엽록체에 삽입하여 최적의 크기를 결정하였다.
- [0032] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 전도성 튜브는 직경이 60 내지 200 nm, 바람직하게는 60 내지 150 nm, 더욱 바람직하게는 80 내지 120 nm일 수 있다. 전도성 튜브의 직경이 50 nm 이하이면 너무 작아 세포에 삽입하기 어렵고, 전도성 튜브의 직경이 300 nm 이상이면 세포사멸을 유도할 수 있다.
- [0033] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 도선 또는 전도성 튜브는 길이가 5 내지 30  $\mu$ m, 바람직하게는 5 내지 20  $\mu$ m, 더욱 바람직하게는 8 내지 15  $\mu$ m일 수 있다. 전도성 튜브의 길이가 너무 짧으면 엽록체와 세포 외부를 연결



할 수 없고, 반대로 너무 길면 삽입 효율이 떨어지게 된다.

- [0034] 도 6에 나타난 바와 같이, 상기 도선 또는 전도성 튜브는 유체 주사법, 불밀링 등의 방법으로 세포에 삽입될 수 있으며, 세포에 도입되는 개수는 무작위이나 대부분 세포 하나 당 한 개씩 도입될 수 있다. 유체 주사법의 경우 큰 직경의 관에 구별되어 존재하는 세포와 도선들이 작은 직경의 관으로 넘어가면서 물리적 유효 충돌이 증가하게 되고 그 과정에서 세포 내로 도선이 삽입되게 된다. 본 발명의 실시예에서는  $7\mu\text{m}$  길이,  $100\text{nm}$  직경의 CNF 사용 시, 최대 94% 효율로 전도성 물질이 세포 내에 삽입되는 것을 확인했으며, 이 비율은 세포와 전도성 물질의 비율을 조절하여 개선할 수 있다.
- [0035] 나아가, 탄소 나노 섬유(CNF)의 직경과 주사 횟수를 달리하여 각 경우에 삽입에 의해 찢어지는 세포와 삽입 이후 회복되는 세포의 정도를 확인하고, 탄소 나노 섬유의 직경과 주사 횟수에 따른 세포 삽입율을 확인하였다. 도 7에 나타난 바와 같이, 직경  $100\text{nm}$ 의 탄소 나노 섬유의 삽입율이 가장 높고 주사 횟수 증가에 따라 삽입율도 증가하였다. 또한, 시간이 경과된 이후에는 세포가 다시 회복되어 세포 손상 정도가 가장 낮은 것을 확인하였다.
- [0036] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 세포는 식물세포, 조류(algae), 또는 광합성 세균일 수 있으나 이에 제한되지 아니하며, 엽록체를 포함하는 인공세포 또한 사용될 수 있다.
- [0037] 상기 조류에는 갈조류(brown algae), 녹조류(green algae) 및 홍조류(red algae)가 포함된다. 조류는 엽록체를 가지며, 각자 자신이 가진 체색과 보색인 빛을 흡수해 광합성을 하는데 녹조류, 갈조류 및 홍조류는 각각 적색광( $640\text{ nm}$  내지  $700\text{ nm}$ ), 황색광( $570\text{ nm}$  내지  $590\text{ nm}$ ) 및 청색광( $400\text{ nm}$  내지  $500\text{ nm}$ )을 흡수해 광합성을 한다. 상기 광합성 세균에는 남세균(cyanobacteria), 자색 광합성 세균(purple photosynthetic bacteria)이 포함된다. 상기 광합성 세균은 세포벽을 가지고 있는데 세포벽과 세포막을 관통할 정도의 강도와 크기, 형태를 가진 도선을 사용하면 본원발명은 세포벽을 가진 세포에도 적용될 수 있다. 남세균은 광합성을 통해 산소를 만드는 세균으로 세포 내에 핵, 엽록체, 미토콘드리아 등의 세포 기관이 분화되어 있지 않으나, 엽록소 a와 남조소, 홍조소 등의 동화 색소를 가지고 있어 광합성이 가능하다. 상기 동화 색소는 틸라코이드의 내부나 틸라코이드 막 표면에 위치한다.
- [0038] 한편, 상기 세포는 자연 상태 그대로의 세포뿐만 아니라 변형된 세포를 포함한다. 예를 들어, 형질전환을 통해 세포벽을 약화시킨 세포나 엽록체 또는 다른 광합성 소기관을 도입한 인공세포 또한 사용될 수 있다.
- [0039] 본 발명에서는 클로렐라 속(*Chlorella* sp.), 클라미도모나스 레인하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*) 녹조류, 카에토세로스 속(*Chaetoceros* sp.), 페오닥틸럼 속(*Phaeodactylum* sp.), 아테야 속(*Attheya* sp.), 탈라시오시라 속(*Thalassiosira* sp.) 규조류를 사용하여 탄소 나노 섬유 삽입을 확인하였으며, 특히 녹조류 클라미도모나스 레인하르티는 생존 기간이 길고 성장 속도가 빠르며 엽록체가 세포의 70% 이상을 차지하여 본 발명에 사용되기에 적합한 특성이 있다.
- [0040] 본 발명의 또 다른 양상은 상기 조작된 세포가 금속 이온 용액 내에서 자유롭게 부유하는 혼합물을 제조하고, 이에 빛을 조사하여 도선을 통해 추출된 광합성 전자로 인한 금속 이온의 환원반응을 유도하여 금속 촉매를 제공한다. 또한, 추출된 광합성 전자는 용액에 녹아 있는 산소의 환원반응 및 수소 생산을 유도하여 수소를 생산하는 방법 및 수소 생산 시스템을 제공한다.
- [0041] 본 발명에서 상기 금속 이온은 백금, 구리 및 은으로 이루어진 군에서 선택되나 이에 제한되지 아니한다. 본 발명의 실시예에서는 저농도의 백금 이온을 사용하였다. 상기 '저농도'의 범위는 금속 이온이 세포에 주는 손상의 정도 및 금속 이온의 종류에 따라 달라질 수 있으며, 예를 들면  $0.1\text{ mM}$  내지  $10\text{ mM}$  범위일 수 있다.
- [0042] 이 때, 상기 조작된 세포는 세포의 기능을 유지할 수 있는 버퍼에 분산된 상태로 제공될 수 있으며, 본 발명의 실시예에서는 녹조류에 적합한 TAP 배지를 사용하였다.
- [0043] 본 발명에 따른 수소 생산 방법은 상기 조작된 세포와 금속 이온 용액의 혼합물에 빛을 조사하여 조작된 세포에서 도선을 따라 세포 밖으로 추출된 광합성 전자가 수소 생산 반응을 통해 수소를 생산하고, 생산된 수소를 수득하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0044] 보다 구체적으로, 상기 수소 생산 과정은 조작된 세포에 삽입된 도선 표면에서 금속 촉매 입자가 형성되는 단계, 금속 촉매 입자의 표면에서 수용액에 녹아 있는 산소 환원 반응을 유도하는 단계, 산소 환원 반응이 감소하고 수소 생산 반응을 유도하는 단계로 구성된다.
- [0045] 금속 촉매 입자가 형성되는 과정은, 빛 조사에 의해 틸라코이드의 광합성 전자 전달계가 활성화되고, 광합성 전자 전달계를 흐르는 전자의 에너지 레벨이 외부 수용액에 존재하는 금속 이온의 환원반응에 필요한 에너지 레벨



보다 크거나 같아지면 도선 또는 전도성 튜브에서 추출된 광합성 전자로 인해 금속 이온의 환원반응이 도선 또는 전도성 튜브의 표면에서 일어난다. 상기 환원반응으로 인해 세포 외부에 노출된 도선 또는 전도성 튜브의 표면에 금속이 코팅되거나 금속 입자가 형성된다. 이러한 금속 촉매는 광합성 동안 발생하는 산소를 촉매하여 산소를 낮은 농도로 자가제어하고, 양성자를 촉매하여 지속적인 수소 생산이 가능하도록 한다.

[0046] 이 때, 빛 조사 시간은 5시간 내지 20시간, 바람직하게는 8시간 내지 15시간, 더욱 바람직하게는 12시간 동안 수행될 수 있다. 상기 범위보다 짧은 시간에서는 금속 입자를 합성하기에 충분한 반응시간을 보장하지 못해 합성 반응의 재현성과 일관성이 떨어질 수 있다. 상기 범위보다 긴 시간에서는, 금속 입자는 충분히 합성이 되지만 수용액에 녹아 있는 금속 이온들의 세포 내부 침투가 더욱 많이 일어나 세포 생존력에 부정적인 영향을 끼칠 수 있다. 그러나 상기 빛을 조사하는 시간은 사용하는 수소 생산 세포의 농도, 금속 이온의 농도 등에 따라 달라질 수 있고, 상기 빛을 사용하는 세포나 엽록체에 포함된 색소의 종류에 따라 적절한 파장을 사용할 수 있다. 예를 들어, 녹조류를 사용한다면 파장이 긴 적색광을 조사할 수 있다.

[0047] 또한, 빛의 광량 5 내지 15, 바람직하게는 8 내지 12, 더욱 바람직하게는 10  $\text{mW}/\text{cm}^2$ 의 광량으로 조사될 수 있다. 상기 범위 이상의 광량에서는 과도한 광량으로 인해 녹조류 세포에서 유해한 활성산소종이 발생하거나 또는 빛을 충분히 흡수하지 못하는 광블리칭 (photobleaching) 효과가 일어날 수 있다. 반면에 상기 범위 이하의 광량에서는, 추출된 전자로 금속이온 환원 반응보다 금속 이온의 세포 내부로의 침투가 더 우세한 속도로 일어나 세포 생존력에 부정적인 영향을 끼칠 수 있다. 그러나 상기 광량은 사용하는 수소 생산 세포의 농도, 금속 이온의 농도 등에 따라 달라질 수 있다.

[0048] 도선 표면에 형성된 금속 입자를 포함하는 금속 촉매는 원심 분리기로 세포와 분리될 수 있고, 그 외 금속 촉매와 세포가 분리 가능한 모든 방법이 사용될 수 있다.

[0049] 본 발명에서 합성된 전도성 금속은 금, 백금, 구리, 은, 철, 니켈, 코발트 및 납으로 구성되어 있으며, 다양한 분야의 미래 촉매 산업에 적용이 가능하다.

[0050] 일례로, 고분자 전해질 연료전지는 수소나 메탄올 같은 연료를 산소와 전기화학적으로 반응시켜 연료의 화학에너지를 전기에너지로 변환시키는 장치로, 작동 온도가 낮으면서도 발전 효율이 좋아 휴대용 전자기기 등 소형 발전 장치, 전기자동차의 동력원 등으로의 이용이 유력하다. 고분자 전해질 연료전지의 산화전극(Anode)에서는 수소나 메탄올 등과 같은 연료가 산화되고 환원전극(Cathode)에서는 공기 또는 산소가 환원되어 물이 생성된다. 상기 산화환원 반응 촉매로 활성이 좋은 백금 나노 입자가 탄소재료에 담지된 형태의 촉매가 사용되고 있다. 본 발명에서의 탄소나노섬유와 결합된 백금 금속 촉매는 연료전지 촉매 분야에 적극 활용될 수 있다.

[0051] 본 발명의 실시예에 따르면, 엽록체를 포함하는 세포에 삽입된 도선에서 금속 촉매 입자의 합성이 일어나 도선 표면에 금속 입자가 함유된 복합촉매를 용이하게 제조할 수 있다. 이로 인해 금속 촉매 및 도선 표면에 증착된 복합촉매를 제조하는 공정의 과정이 축소되고 비용이 절감되어 대량 생산이 용이하고, 이차전지, 연료전지 및 슈퍼 커패시터 전극을 포함하는 전기화학 및 촉매화학 응용분야에 적용이 가능하다.

[0052] 산소 환원 반응과 수소 생산 반응은 도선 또는 전도성 튜브에 금속 촉매입자가 형성된 조작된 세포에서 빛 조사에 의해 추출된 광합성 전자가 금속 촉매입자의 표면에서 수용액에 녹아 있는 산소의 환원 반응을 유도함으로써 일어난다. 이로 인해 밀폐 배치 내부의 산소 농도가 감소하고 광합성으로 새로 생긴 산소 또한 지속적으로 제거되는 효과가 있다. 결과적으로 밀폐 배치 내부의 산소 농도가 1% 내외의 낮은 분율로 유지될 수 있다.

[0053] 수소 생산 과정은 도선 또는 전도성 튜브에 금속 촉매입자가 형성된 조작된 세포를 분리하여 밀폐 배치로 옮겨 수행될 수 있으며, 외부와 공기의 유출입이 이루어지지 않는 구별된 공간에서 생산되는 수소를 수득할 수 있으면 밀폐 배치로 옮기는 과정 없이 연속적으로 수행될 수 있다.

[0054] 여기서 밀폐 배치는 외부와 공기의 유출입이 이루어질 수 없는 구조물을 말하며, 세포 배양액이나 버퍼 등에 분산된 수소 생산을 위해 조작된 세포를 포함한다. 나머지 공간에는 일반 공기를 포함한다. 또한, 상기 밀폐 배치는 세포 배양액(예를 들어, TAP)을 교체하거나 또는 발생하는 수소 가스를 추출할 수 있는 구성을 추가로 포함할 수 있다.

[0055] 빛의 광량은 0.1 내지 5, 바람직하게는 0.5 내지 4, 더욱 바람직하게는 2  $\text{mW}/\text{cm}^2$ 의 광량으로 조사될 수 있다. 이 때, 수소 생산을 위해 밀폐 배치에 계속 빛을 조사하게 된다. 지속적인 빛을 받는 세포가 장기간 높은 광합성 효율을 유지한 채 수소를 생산하기 위해서는 1) 세포가 충분하게 모든 빛을 흡수할 수 있는 광량이어야 하고, 2) 세포 광합성 시스템에 과하지 않은 광량(통상 2~10  $\text{mW}/\text{cm}^2$ )이어야 한다. 본 발명자들은 세포의 광합성 활성도

를 고려하여 수소 생산에 필요한 광량을 상기 범위로 결정하였다.

[0056] 본 발명에 따르면 추출된 광합성 전자가 금속 촉매입자의 표면에서 산소의 환원반응을 유도하여 수용액에 존재하는 산소와 광합성으로 새로 생긴 산소를 제거하고 산소를 낮은 농도로 스스로 제어하게 되고, 이후에 수소 발생 반응이 이루어진다. 이러한 산소 자가 제어를 통해 산소의 추가적인 분리나 정제 없이 수소연료 활용이 가능하게 된다.

[0058] 세포배양

[0059] 클라미도모나스 레인하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*) 세포를 다음 성분으로 구성된 트리스/아세테이트/포스페이트(TAP) 액체 배지에서 배양하였다: 380 mg/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10 mg/L  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 10 mg/L  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 50 mg/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 20 mg/L  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 20 mg/L  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 50 mg/L  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 100 mg/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 50 mg/L  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 50 mg/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 110 mg/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 20 mg/L  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 50 mg/L EDTA, 1100 mg/L 빙초산 및 2420 mg/L Tris. 배지의 pH를 7.0으로 조정하고, 세포를 광합성 활성 방사선(PAR)으로 23  $\mu\text{moles}/\text{m}^2/\text{s}$ 의 조명 하에서 12시간 동안 배양한 후, 암실에서 22℃에서 12시간 동안 배양하였다. 조명으로 30W 할로겐 램프(SZ2-CLS, Olympus, Japan)를 사용하였고, 광파워미터(8230E-82311B, ADC Corp., Japan)를 이용하여 빛의 세기를 측정하였다. mL당 세포 수는 750nm(OD750)에서 흡광도를 측정하고 세포 계수를 위한 트리판 블루 분석을 수행하여 결정하였다.

[0061] 특성 분석

[0062] 광학현미경은 NSM-3B 현미경(SAMWON, South Korea)을 사용하고 주사전자현미경(SEM)은 에너지 분산 분광계가 장착된 JSM-7610F-Plus(JEOL, 일본)에서 수행되었다. 공초점 레이저 스캐닝 현미경 측정은 Carl Zeiss LSM 980 레이저 공초점 현미경을 사용하여 수행되었다. pH 값은 pH 4.01, 7.00 및 10.01 버퍼(Thermo Scientific™)로 보정된 마이크로 센서(Mettler Toledo, Thermo Scientific™)가 장착된 pH 측정기(Thermo Orion Star A211 pH Benchtop, Thermo Scientific™)를 사용하고, 유기물 분석에는 핵자기공명(NMR) AVANCE II 400(Bruker Biospin)을 사용하였다.

[0064] 엽록소 함량 측정 및 흡수 스펙트럼 분석

[0065] 엽록소를 추출하기 위해 수소 생산 시료로부터 *C. reinhardtii* - CNF/Pt 배양액 15mL를 80% 수성 아세톤(v/v)과 혼합하고 4℃에서 12시간 동안 배양하였다. 그런 다음 샘플을 3000g에서 10분 동안 원심분리하고 생성물 혼합물을 여과지를 사용하여 여과하여 여과액을 조엽록소 추출물로 남겼다. *C. reinhardtii*-CNF/Pt 배양물의 흡수 스펙트럼은 JASCO V-770 UV-vis 분광광도계를 사용하여 500 nm에서 750 nm까지 측정하고, 엽록소 함량은 하기 방정식을 사용하여 정량화하였다:

$$\text{전체 엽록소 함량}(\text{mg/g}) = \frac{CT \times V \times N}{w \times 1000}$$

$$CT = 6.63 \times A_{665} + 18.08 \times A_{649}$$

[0067]

[0069] (여기서 V는 엽록소 조추출물 부피(mL)이고, N은 희석 인자, W는 건조 중량(g)임)

[0071] 세포 생존율 분석

[0072] CellTiterGlo®(Promega, G7572)를 사용하여 세포 생존력을 평가하였다. 수소 생산 샘플로부터 *C. reinhardtii*-CNF/Pt 배양물 500  $\mu$ L를 원심분리(900g, 10분)하여 수확하였다. 수득한 조류 세포를 3회 세척하고 200  $\mu$ L PBS 완충액에 재현탁시킨 다음, 100  $\mu$ L PBS에 약  $1.83 \times 10^5$  개 세포를 96웰 플레이트(Nest, 701003)에 접종하였다.

[0073] 30  $\mu$ L의 CellTiterGlo® 용액을 첨가한 후, 플레이트를 암실에서 25°C에서 20분간 배양하였다. 490nm에서의 흡광도는 EnVision®2105(PerkinElmer)를 사용하여 측정되었으며, 모든 실험은 3중으로 수행되었다. 세포 생존율은 트리판 블루 배제 실험을 통해서도 확인하였다. 1:1 비율의 트리판 블루 용액(0.4% v/v)을 완충액에 첨가하였고, 살아있는 세포는 염료를 펌핑하여 파란색으로 나타나지 않았지만 죽은 세포는 염료를 유지하여 파란색으로 나타났다.

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{\text{Daily luminescence (RLU)}}{\text{Initial luminescence (RLU)}} \times 100$$

[0074] 

[0076] 전기화학 주사 현미경을 이용한 단일 세포 분석

[0077] 전기화학 주사 현미경(SECM)을 사용하여 단일 *C. reinhardtii*-CNF의 광합성 전류를 측정하였다. 실험은 광학 테이블 위 패러데이 케이지 내부에서 수행되었다. 나노 크기의 팁은 단일 셀 바로 위에 위치하고, 나노 팁을 세포 표면(0.1  $\mu$ m/s)과 CNF 표면까지 수직으로 천천히 이동하여 접근 곡선을 얻었다. 팁이 셀에 충분히 가까워지면 인가 전압은 광합성 전류 측정에 필요한 값으로 조정되었다. 팁 전위는 확산에 의해 지배되는 SECM 피드백에 대해 충분히 감응했다. 마지막으로 SECM의 일정 높이 모드를 적용하여 20  $\mu$ m x 20  $\mu$ m의 스캔 영역과 0.4  $\mu$ m/s의 스캔 속도로 세포를 스캔하였다. 모든 전기화학적 분석은 CHI920D SECM bipotentiostat(CH Instruments, USA)에서 수행되었다.

[0079] *C. reinhardtii*에 대한 탄소 나노 섬유 침투

[0080] 평균 직경 100nm, 길이 7000nm의 탄소나노섬유(CNF)를 Sigma-Aldrich(미국 미주리주 세인트루이스)에서 구입하였다. CNF 분산액은 1mg의 CNF와 0.2mg의 CTAB(99%, Sigma-Aldrich)를 10ml의 탈이온수에 첨가하여 100mg/L CNF와 20mg/L CTAB의 농도를 생성하도록 제조되었다. 용액을 40 kHz의 고정 주파수에서 욕조 초음파 처리기(CPX3800H-E, Branson, USA)에서 25°C에서 10시간 동안 초음파 처리하고, 용액을 2000g에서 30분 동안 원심분리한 다음 잘 분산된 CNF를 함유하는 상층액을 수집하였다. *C. reinhardtii*와 CNF를 통합하기 위해 3ml의 CNF 분산액을 12ml의 세포 배양물에 첨가하고, 혼합용액을 내경 0.86mm, 길이 7cm의 붕규산염 모세관(Sutter Instrument, USA)을 통해 10~100회 통과시켰다.

[0082] *C. reinhardtii* 침투 분석

[0083] 공초점 레이저 스캐닝 현미경(CLSM) 측정은 Carl Zeiss LSM 980 레이저 공초점 현미경을 사용하여 수행되었다. 세척된 기질을 즉시 propidium iodide (PI; 5  $\mu$ g/mL)로 15분간 염색한 후, 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; 5  $\mu$ g/mL)로 15분 동안 암실에서 대조염색하였다. DAPI는 핵산과 결합하여 405nm 파장의 레이저에 의해 여기되면 파란색으로 형광을 발하고 모든 세포에 침투하고, 반면에 PI는 침투된 것으로 간주되었던 막 손상이 있는 세포에만 들어가며, DAPI보다 더 높은 친화력으로 핵산과 결합하게 된다. 이후 CLSM을 사용하여 기관을 이미지화하였다.

[0085] CNF 표면에 금속 입자 형성

[0086] 광합성 전자를 통한 금속 입자 형성을 위해 0.5mM 질산은( $\text{AgNO}_3$ , 99%, Sigma-Aldrich), 0.25mM 질산구리( $\text{Cu(NO}_3)_2$ , 99%, Sigma-Aldrich) 및 0.4mM 사염화백금산칼륨( $\text{K}_2\text{PtCl}_4$ , 99%, Sigma-Aldrich)를 세포 배양물에

첨가하였다. 혼합물을 PAR 범위에서  $133 \mu\text{moles/m}^2/\text{s}$ 의 조명 하에 1-5시간 동안  $22^\circ\text{C}$ 에서 배양하였다. 광세기는 광파워미터(제품번호 8230E-82311B, ADC Corp., Japan)를 이용하여 측정하였다. 인큐베이션 후, 용액을 900g에서 5분간 원심분리하고 상층액을 제거하였다. 이 세척 단계는 새로운 TAP 배지를 사용하여 3회 반복하였다.

[0088] 광합성 수소 생산

[0089] *C. reinhardtii*-CNF/Pt(15mL)의 배양물을 기밀 유리 바이알(20mL)로 옮겨 5mL의 헤드스페이스를 남기고 pH를 7.0으로 조정하였다. 그 다음, 가스 누출을 방지하기 위해 고무 마개와 테프론 테이프로 바이알을 밀봉하고 PAR 범위에서  $105 \mu\text{moles/m}^2/\text{s}$ 의 조명 하에  $22^\circ\text{C}$ 에서 배양하여 100rpm의 속도로 지속적으로 흔들면서 며칠 동안 광합성 수소 생산을 유도하였다. 밀봉된 바이알의 상부 공간에 있는  $\text{H}_2$ ,  $\text{O}_2$  및  $\text{CO}_2$  함량을 검출하기 위해 기밀 주사기를 사용하여 여러 시점에서 100  $\mu\text{L}$ 의 가스를 빼내고 열전도도 검출기(TCD) 및 Carboxen 1000 12피트 컬럼(Supelco)가 장착된 Agilent 7890B 가스 크로마토그래프에 주입하였다. 향상된 신호 대 잡음비를 위해 고순도 헬륨(99.999%)을 운반 가스로 사용하였다.  $\text{H}_2$ ,  $\text{O}_2$  및  $\text{CO}_2$  함량은 알려진 농도의 표준 가스를 주입하여 사전 보정된 피크 면적을 기반으로 계산되었다. 본 작업에 사용된 연료전지 구동 RC 차량은 Horizon Educational, H-racer 2.0(No. FCJJ-23)에서 구입하였고, 내장된 PEM 연료전지는 출력 전력 270mW, 출력 전압 0.6V(DC), 출력 전류 0.45A이다.

[0091] 실시예 1. 탄소 나노 섬유가 삽입된 세포의 제작

[0092] 1-1. 탄소 나노 섬유의 직경 조절을 통한 세포 삽입물 확인

[0093] *C. reinhardtii*에 탄소 나노 섬유를 삽입하기 위하여 CNF 분산액을 세포 배양물에 첨가하고, 혼합용액을 내경 0.86mm, 길이 7cm의 봉규산염 모세관(Sutter Instrument, USA)을 통해 10~100회 통과시켰다. 이 때, 탄소 나노 섬유의 직경을 100nm, 200nm, 400nm로 달리하여 세포 삽입을 모니터링 하였다.

[0094] 그 결과, 평균  $1.2 \pm 0.2$  CNF는 100nm 끝 직경의 7 $\mu\text{m}$  길이 CNF가 적용될 때 최대 94% 효율로 세포에 침투하였다. 또한, 삽입 과정 도중과 삽입 이후 세포벽의 침투 및 회복을 공초점 레이저 스캐닝 현미경으로 모니터링한 결과, 직경 100nm의 탄소 나노 섬유의 삽입율이 가장 높고 주사 횟수 증가에 따라 삽입율도 증가하였다. 또한, 시간이 경과된 이후에는 세포가 다시 회복되어 세포 손상 정도가 가장 낮은 것을 확인하였다(도 7).

[0096] 1-2. 단일 세포 단위 광합성 전류 추출 기능 분석

[0097] CNF가 실제로 엽록체의 틸라코이드막과 세포 외부의 전해질 용액 사이의 전기적 연결을 확보하는지 확인하기 위해 전기화학 주사 현미경(SECM)을 수행하였다. 약 425 nm 직경의 백금 나노전극이 SECM 팁으로 사용되었고, 세포 외 광전류는 팁과 *C. reinhardtii*-CNF 사이 약 1  $\mu\text{m}$  거리에서 측정되었다. 국부 전류는 도 8c에 표시된 것처럼 SECM으로 매핑할 수 있고, 여기서 CNF 전해질 인터페이스에서 추출된 광전자가 산화환원 매개체와 반응함에 따라 빛 조사 하에서 뚜렷한 전류 증폭이 관찰되었다. 23개 세포에 대한 통계 분석을 통해 오류 없는 전기적 연결을 확인하였으며, 그 결과 세포외 광전류가 광합성 연구의 일반적인 밀도인  $18.2\sim 108 \mu\text{mol 광자} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  범위의 빛 강도에 따라 선형적으로 나타났다. 평균적으로 0.7%의 광자-전자 변환 효율이 관찰되었으며, 최고 효율은 0.9%를 나타내었다(도 8e). 클라미도모나스 속(*Chlamydomonas* genus)의 전형적인 광자 활용도가 약 1%인 점을 고려하면 거의 정량적 광전자 추출이 이루어짐을 알 수 있었다. 또한, 도 8d에 나타난 바와 같이, 간헐적 빛 시간전류측정법을 통해 빛 조사 시에는 전류가 명확하게 시작된 후 어둠상태에서는 갑자기 전류가 차단되는 것을 통해, SECM 관찰 전류가 실제로 조류 광계에서 유래한다는 것을 확인할 수 있었다. 또한 시스템을 DCMU(광전자 전달 사슬을 차단하는 것으로 알려진 조류제, 3-(3,4-디클로로페닐)-1,1-디메틸우레아)로 처리하면 세포외 전류가 완전히 중단되어 측정된 전류가 조류 광계에서 추출된 것임을 확인할 수 있었다. 이와 같이 본 발명에 따른 *C. reinhardtii*-CNF는 셀당 9.5pW를 제공하는 친환경적인 셀룰러 광전지 발전소로 기능한다고 볼 수 있다.



[0099] **실시예 2. 탄소 나노 섬유가 삽입된 세포를 이용한 금속 촉매 입자의 형성**

[0100] 티라코이드 Z 구조의 전자 운반체 화합물의 전압 환경은 도9에 나타내었으며, 본 발명에 따른 C. reinhardtii-CNF 발전소에서 광전류 방출을 담당하는 광계 I의 들뜬 상태에 있는 화합물은 Cu, Ag 및 Pt 양이온보다 더 많은 음극 표준 산화환원 전위를 나타내고, 산화환원 전위의 이러한 차이는 광전자를 환원제로 사용하는 CNF의 세포 외 말단에서 촉매를 형성하는 연료로서 금속 나노입자의 합성을 가능하게 하였다. 도 9에 나타난 바와 같이, Cu, Ag 및 Pt이 CNF 표면에 깨끗하고 선택적으로 형성된 것을 확인하였다. 다만, 합성 Cu 및 Ag 입자는 세포 독성으로 인해 장기적으로는 조류-CNF에 적합하지 않을 것으로 예상되었다(도 10).

[0102] **실시예 3. 수소 발생 금속 촉매 기반의 수소 생산**

[0103] **3-1. 산소 환원반응을 통한 산소 제거 및 수소의 생산**

[0104] 완전히 설계된 C. reinhardtii-CNF/Pt 복합 발전소를 통해 광합성 수소 생산을 확인하고자 하였다. C. reinhardtii-CNF/Pt가 포함된 밀봉된 배치 반응기를 준비하고 수소가 모이는 헤드스페이스의 기체 분율을 모니터링하였다. 다양한 비율로 조작되지 않은 원시 조류세포와 조작된 조류 세포를 테스트하여 수소 생산량 변화 추이를 확인하였고, 1:1 비율일 때 최적의 수소 생산을 나타내는 것을 확인하였다(도 14).

[0105] 추출된 광전자는 Pt 표면에 환원당량으로 전달되고, 광계에 의해 부여된 전위로 환원될 수 있는 두 가지 화학 종, 양성자와 이산화 분자가 수용액에 존재하는데, 두 가지 반응인 수소 발생과 산소 환원은 각각  $-0.41$  및  $-0.33V$ (SHE 대비)의 형식 전위와 경쟁하게 된다(도 13d). 백금은 두 반응 모두에 좋은 촉매체이며, 음극 형식 전위가 낮기 때문에 산소 환원 반응이 수소 발생보다 먼저 발생하게 된다. 도 13a 내지 13c에 나타난 것과 같이, 작동 첫 4일 동안에는 세포의 전류가 산소 감소에만 사용되었다. 산소 환원 형식 전위는  $O_2$ 와  $O_2^-$  농도 비율의 Nernstian 함수이기 때문에 감소된 산소 농도는 형식 전위 음극을 밀어내게 되었다. 4일 후에 산소 농도가 5% 아래로 떨어졌고, 결과적으로 수소는 6일째에 헤드스페이스에 처음 기록되었으며, 환원 경로는 이 지점 이후부터 수소를 생산하는 방향으로 작동하였다(도 13c). 산소 환원과 수소 발생 사이의 경쟁에서 본 발명에 따른 시스템은 외부 도움 없이 헤드스페이스의 산소 농도를 1.0% 미만으로 자동 조절하였다. 인공 광합성의 초기 단계에서 산소 환원이 급증하면서 검출 가능한 양의 과산화수소가 생성되었으며(도 13f), 이는 수소 생산 단계에서 시간이 지남에 따라 자연분해되었다. 산소 환원 시 양성자 소비로 인해 과산화물 형성과 동시에 짧은 pH 상승이 발생하였다(도 13g). 또한, 엽록소 농도 감소(도13h)와 세포 생존력(도 13i)은 과산화물 생성 및 pH 증가와 일치하였다. 그러나 과산화물이 줄어들고 pH가 생리학적인 수준으로 돌아감에 따라 두 요인 모두 산소가 고갈된 수소 생산 단계에서 지속 가능한 수준으로 완전히 돌아오게 되었다.

[0106] 경쟁적인 산소 환원으로의 전자 유출이 최소화됨에 따라 수소 생산은 6일째부터 가속화되었다.  $0.8 \mu\text{mol H}_2 \cdot \text{mg}$  엽록소 $^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 의 최고 생산 속도는 10일차에 기록되었고, 15mL 배치에서  $363 \mu\text{mol}$ 의 수소 생산을 위해 50일차까지 유지되었다(도 13b). 전체 실험 주기 동안  $0.45 \pm 0.09\%$ 의 반응에 대한 높은 양자 수율이 기록되었다(도 13c). 여기서 관찰된 광자-수소 양자 수율은 보고된 조류 및 식물의 탄소 고정 효율(일반적으로 0.2~1.6% 범위)과 비교할 때 우수하며, 이는 본 발명에 따른 조류 세포 발전소의 광전자 중계 체인이 매우 효율적인 것을 의미한다.

[0107] 본 발명에서 확인한 50일을 초과하는 지속적인 광합성 수소 발생은 가장 오래 지속되는 시스템 중 하나이고, 수소의 발생 속도도 보고된 것 중 가장 빠른 수준이다. 또한 연료 생산 속도는 배치의 부피에 따라 선형적으로 확장되는 것을 확인하였다(도 14). 150mL 배치에서 최대  $4\text{mmol}$ 의  $H_2$ 가 합성되었으며 이는 학술 실험실 규모 실험에서는 드물게 많은 양을 합성한 것이다. 이와 같이 많은 양의 축적된 연료와 자체 조절된 최소 산소 함량의 특징으로, 배치 반응기의 상부 공간에서의 가스 직접 분사를 통해 RC 차량 탑재 연료 전지에 전력을 공급할 수 있었고, 순수 수소로 구동되는 차량과 비슷한 부드러운 주행을 확인하였다(도 13e). 특히, 연료로 활용하기 전에 별도의 정화 또는 연료 분리 단계가 필요하지 않다는 점에서 큰 장점이 될 수 있다는 것을 확인하였다.

[0109] **3-2. 세포의 광합성 CO<sub>2</sub> 고정을 통한 지속적인 전자 공급 시스템**

[0110] 도 11에서 볼 수 있듯이 조작된 조류 세포에는 광전자가 도선을 통해 세포 밖으로 추출되어 작은 부분만이 CBB

주기에 들어갈 수 있기에 호흡 과정에는 추가적인 전자 공급원이 필요했고, 성장 배지의 아세테이트 분자를 전자 공급원으로 사용하였으나 배양 4일 만에 고갈되었음을 확인하였다. 그러나 아세테이트를 모두 소모한 후에도 수소 생산량은 감소하지 않았고, 헤드스페이스  $\text{CO}_2$  농도의 감소가 관찰되었기 때문에 조작되지 않은 조류 세포에 의해 분비된 탄소 고정 생성물(예: 다당류)이 전자 공여체의 역할을 채우는 것으로 추정하였다.

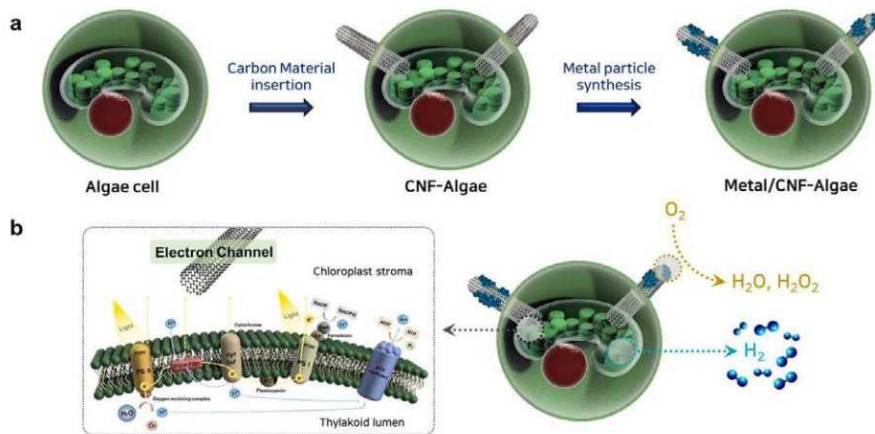
[0111] 이에 전자 공여체로서 아세테이트를 소비하지 않고 수소 발생을 위해 반응 조건을 추가로 수정하였다. *C. reinhardtii*-CNF/Pt는 아세테이트가 없는 배지에서 배양되었으며 다양한 농도의  $\text{CO}_2$ 로 헤드스페이스 충전되었다. 설계된 대로, 깨끗한 조류는  $\text{CO}_2$ 를 *C. reinhardtii*-CNF/Pt와 공유할 수 있는 저장 화합물로 고정하여  $\text{CO}_2$ 와 햇빛만을 사용하여 장기간 수소를 생산해낼 수 있음을 보여주었다(도 15). 아세테이트는 전자 공여체로서의 역할 외에도 *Chlamydomonas* 배양의 성장을 촉진하는 기능을 하므로, 아세트산이 없는 배지의 수소 생산 속도는 아세테이트 대비 약 60%를 나타내었다. 그럼에도 불구하고 전자원으로  $\text{CO}_2$ 와 물만 소비하여 태양광을 연료로 전환하는 것은 충분히 우수한 결과이다.

[0112] 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

[0113] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

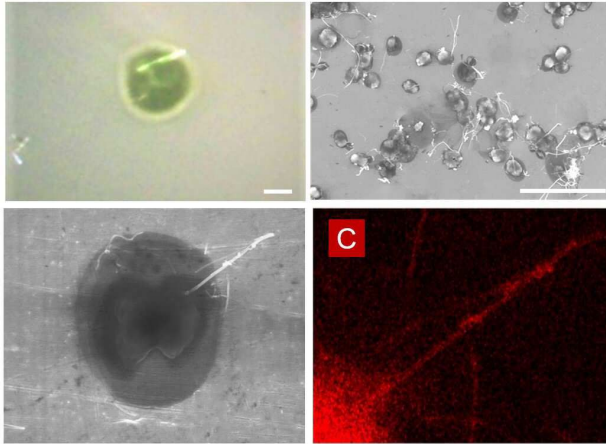
## 도면

### 도면1

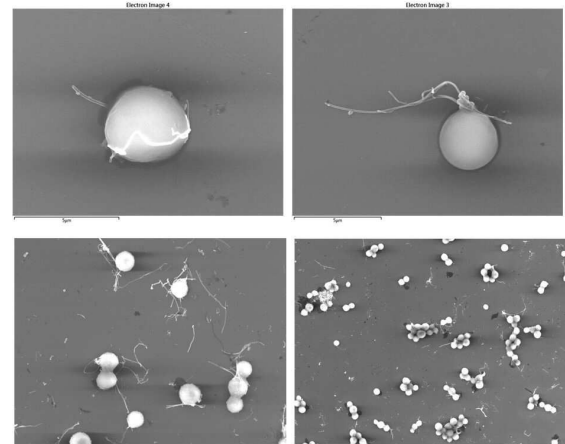


도면2

❖ 녹조류 – *Chlamydomonas reinhardtii*



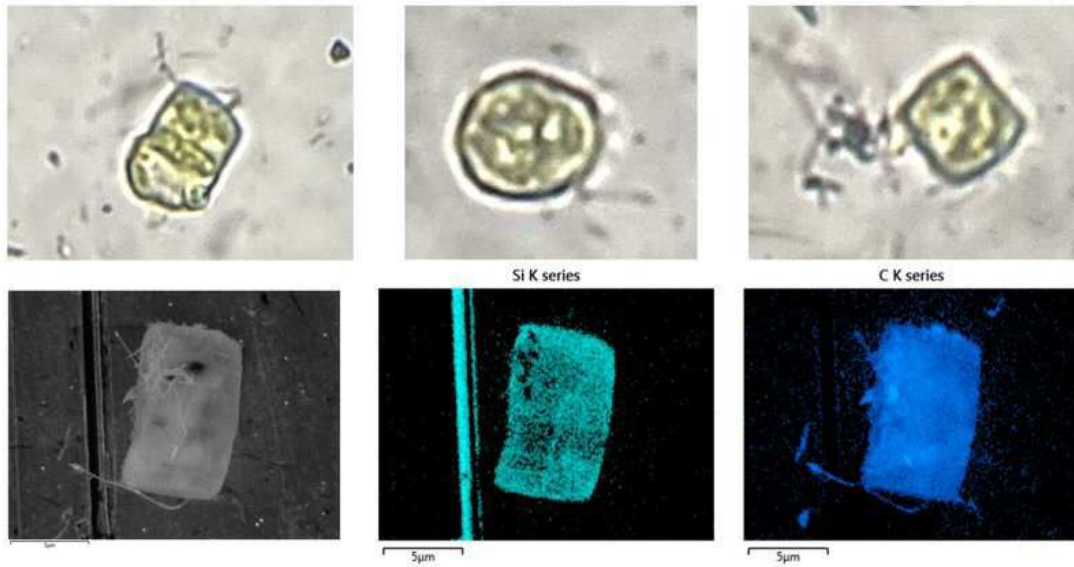
❖ 녹조류 – *Chlorella sp.*



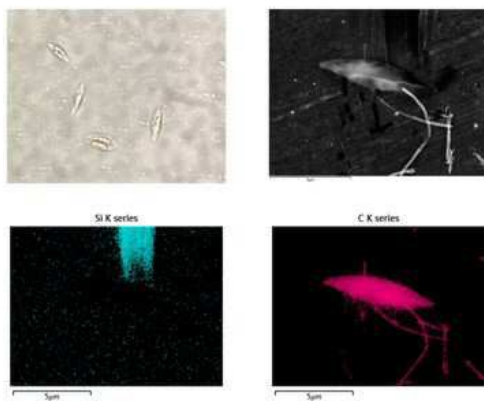


### 도면3

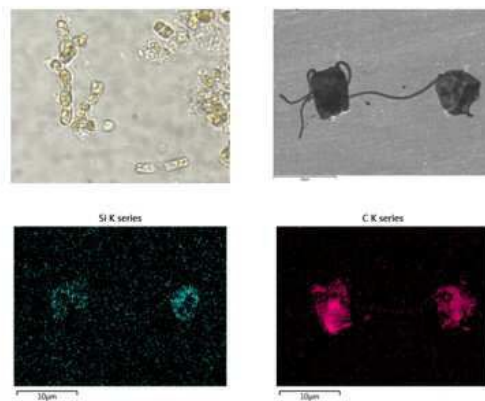
#### ❖ 규조류 - *Thalassiosira* sp.



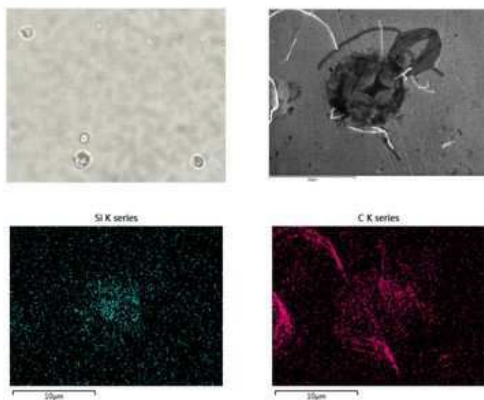
#### ❖ 규조류 - *Phaeodactylum tricornutum*



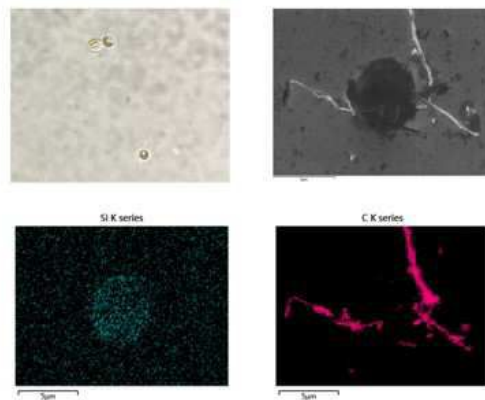
#### ❖ 규조류 - *Attheya longicornis*



#### ❖ 규조류 - *Chaetoceros muelleri*

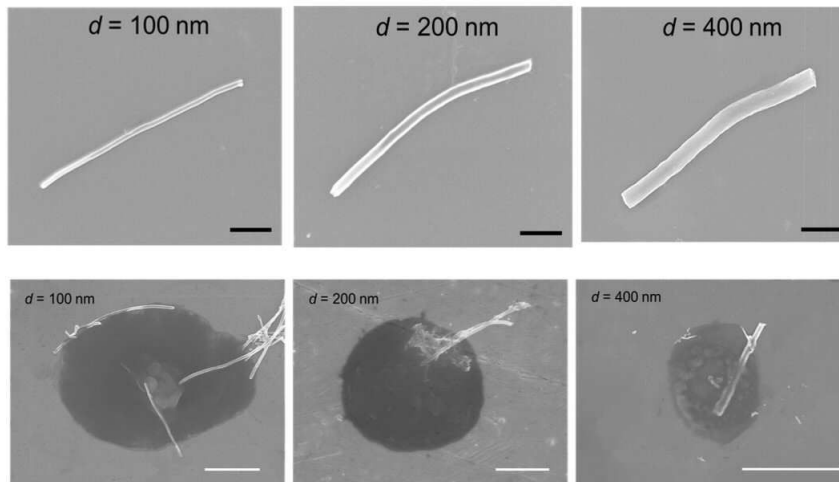


#### ❖ 규조류 - *Chaetoceros gracilis*

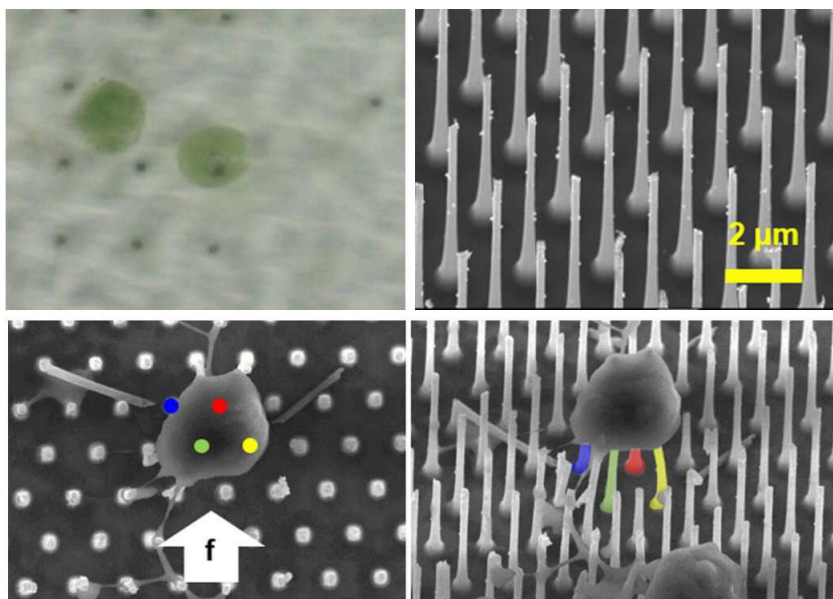


도면4

❖ 탄소 나노 튜브 / 섬유



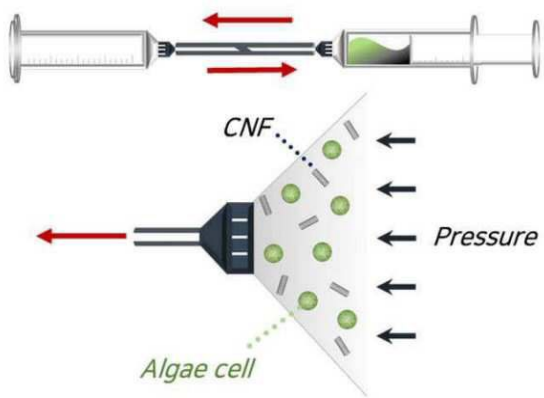
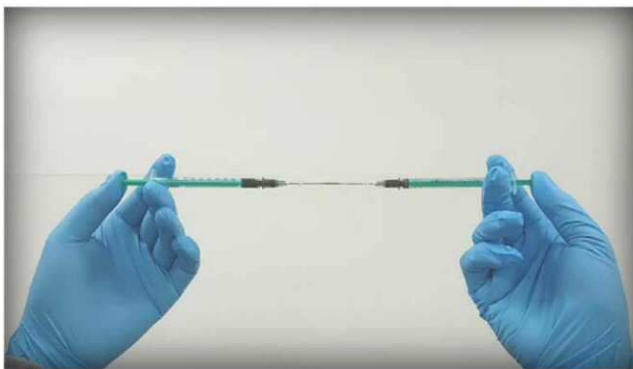
❖ Au(gold) + (Ti)Titanium + SiO<sub>x</sub>(silicon oxide) needle



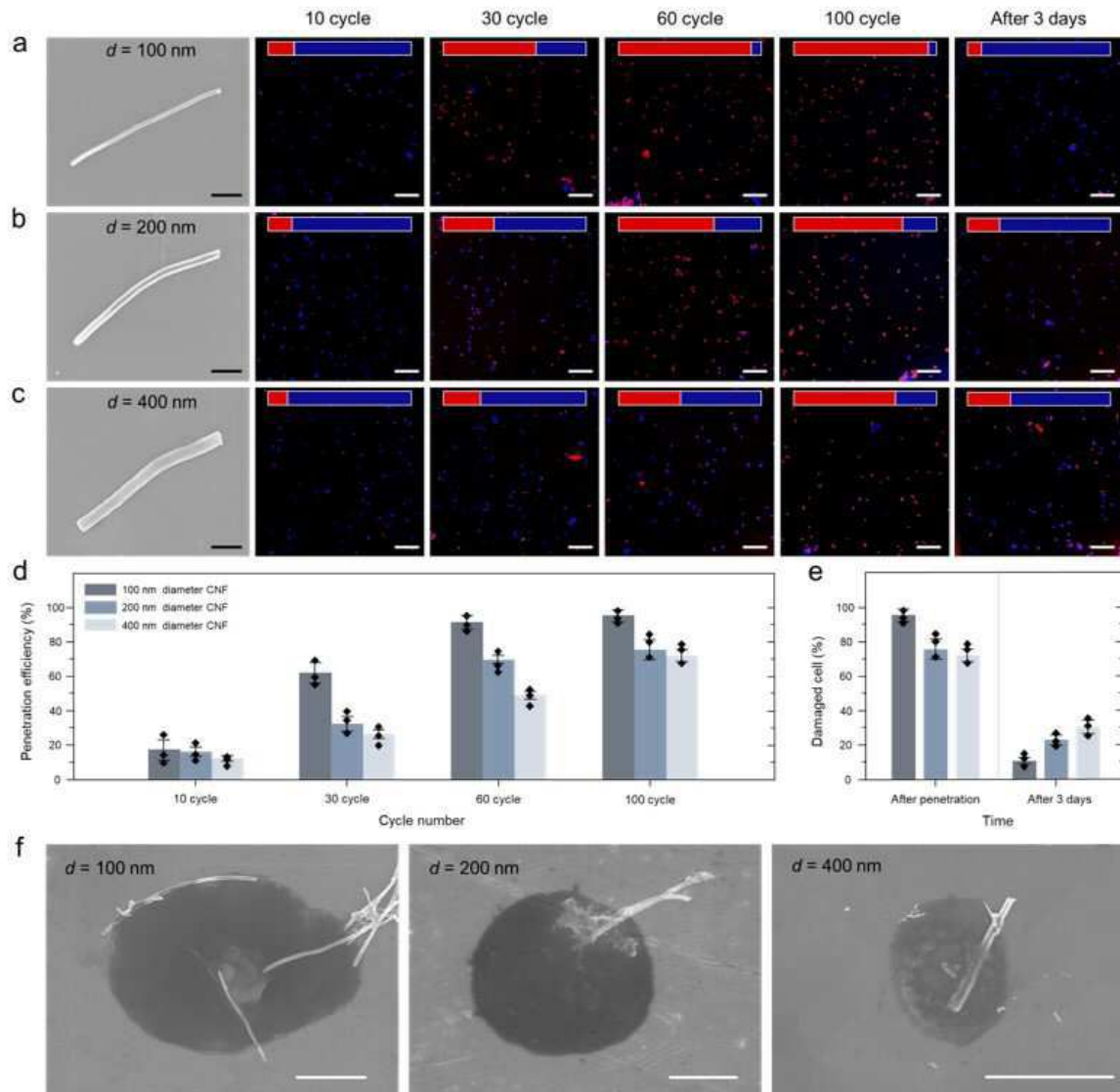
도면5



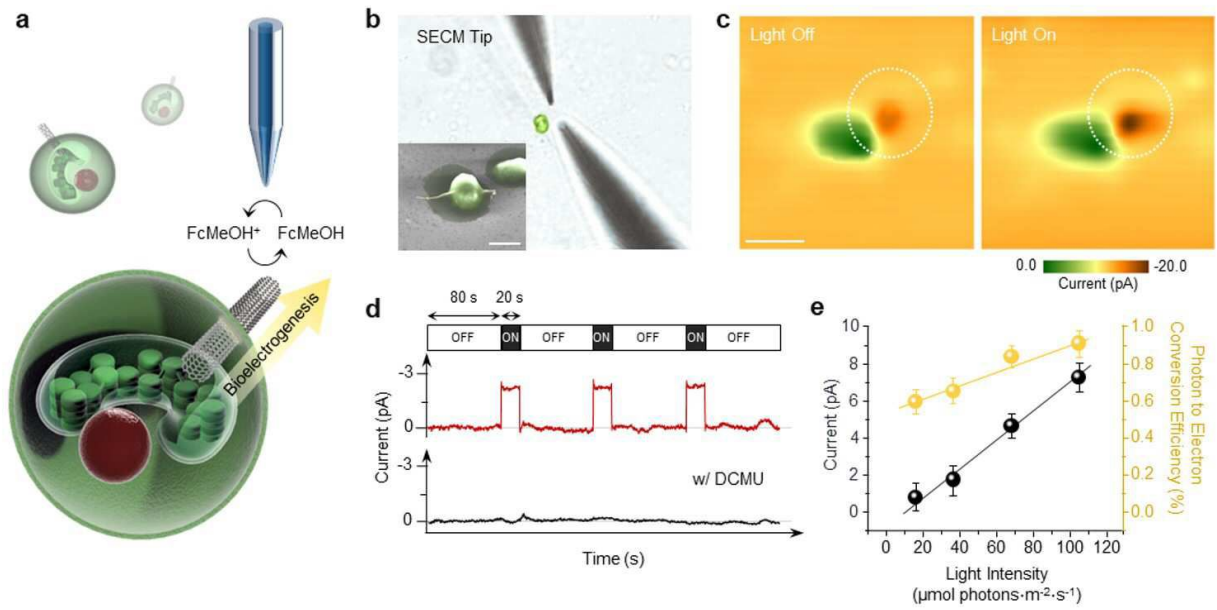
도면6



도면7

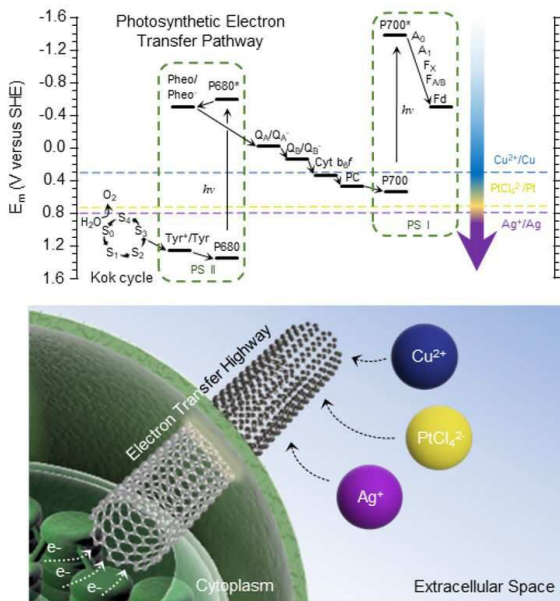


도면8

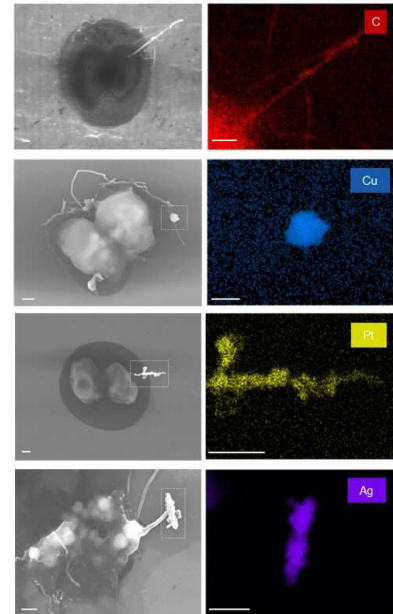


도면9

- 광합성 전자 전달 에너지 레벨에 속한 금속 촉매 선정



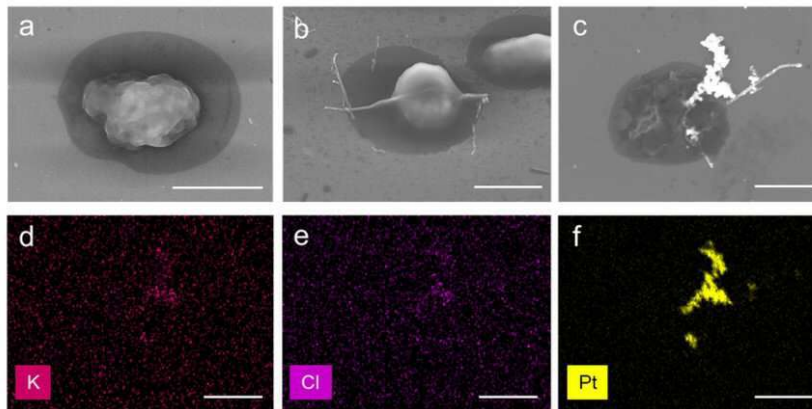
- SEM/EDX 전자 현미경으로 확인한 금속 촉매 합성



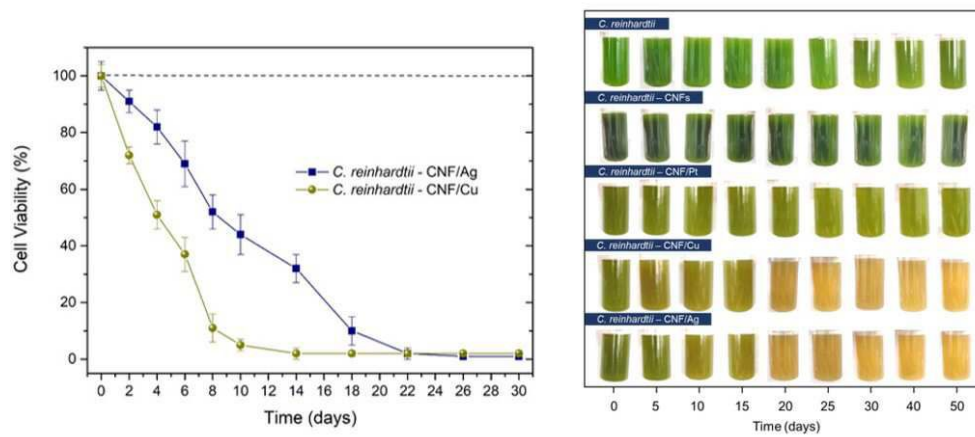


도면10

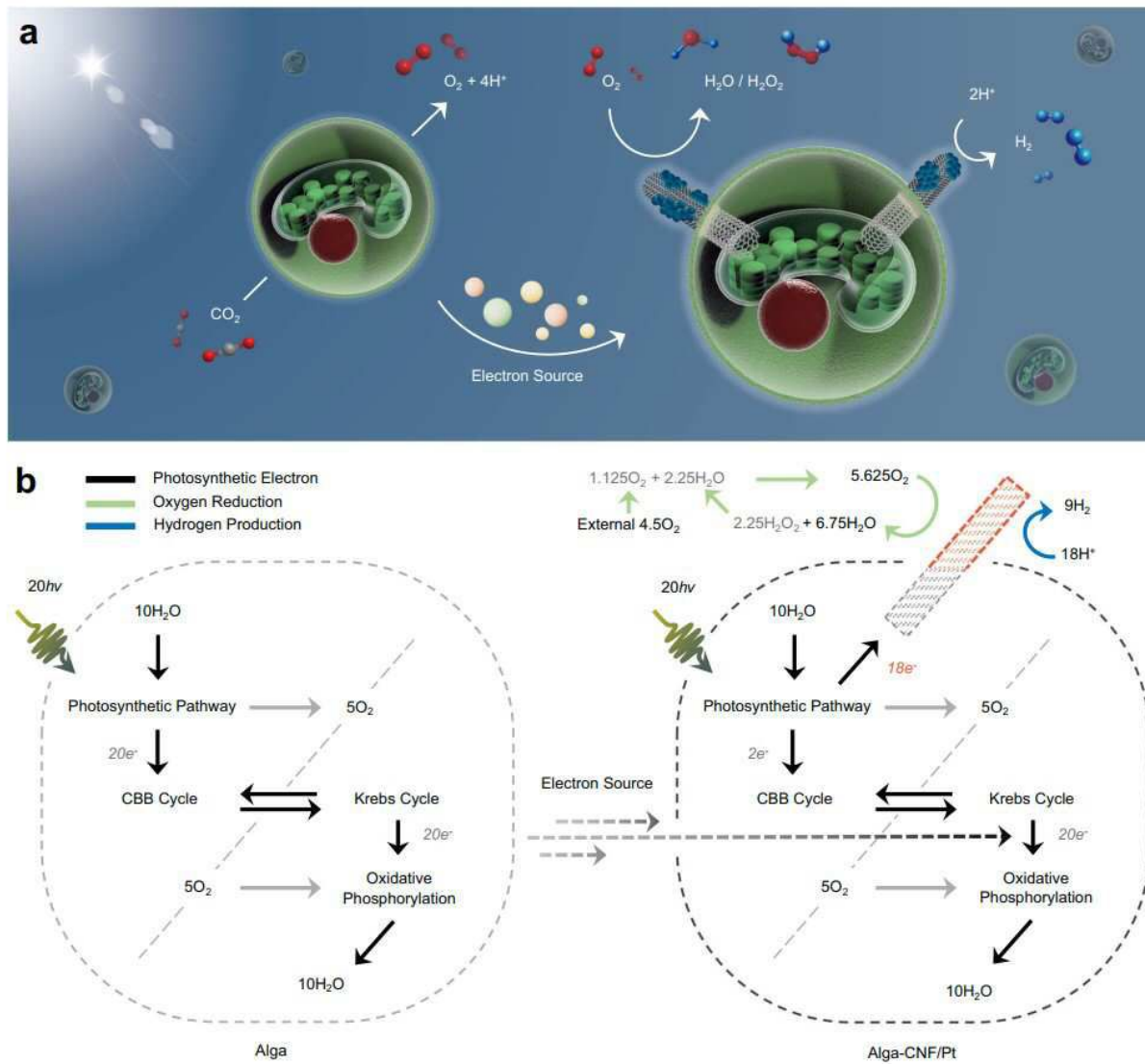
- Platinum precursor ( $K_2PtCl_4$ ) 석출이 아닌 Pt 입자 합성임을 확인



- Silver / copper 경우 세포 독성으로 인한 세포 사멸 관찰



도면11

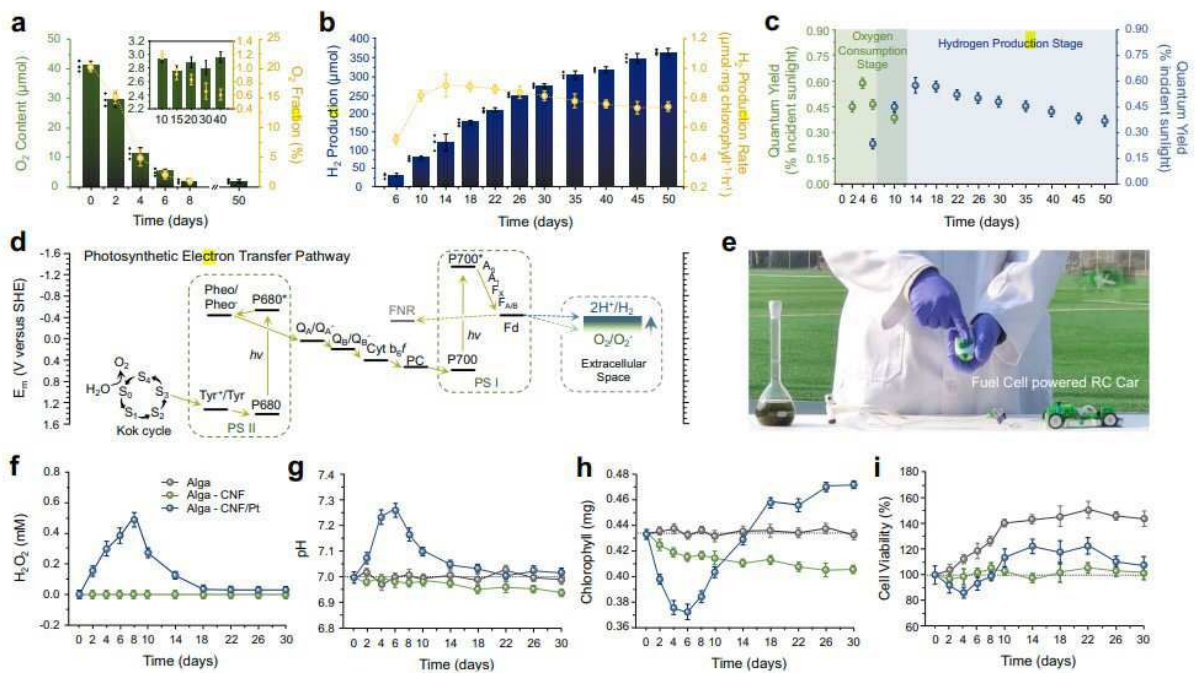




도면12

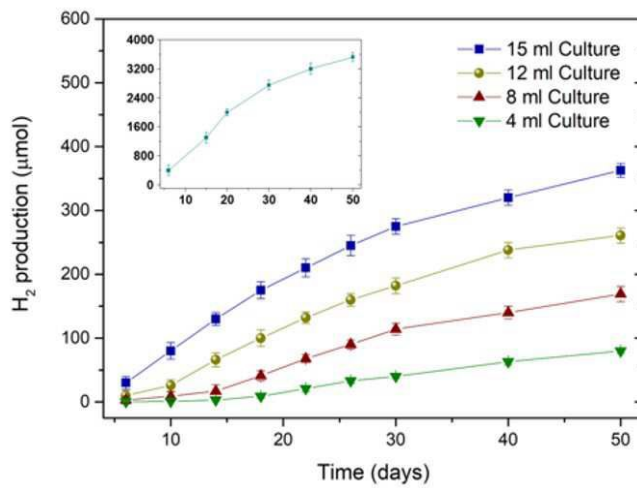
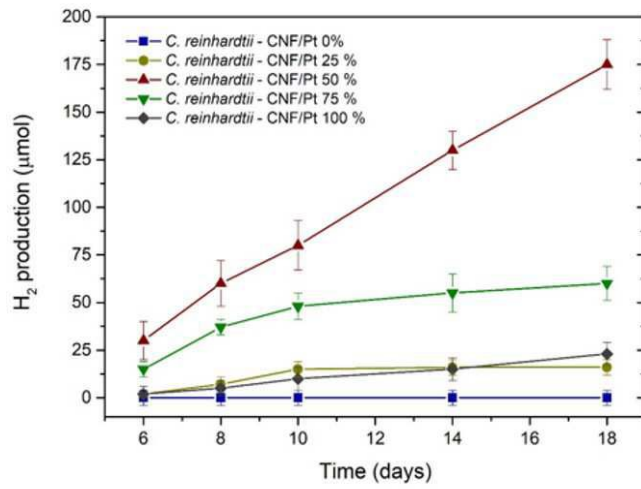


도면13



도면14

- 엔지니어링 세포 비율 최적화 및 배치 부피에 따른 수소 생산량 변화 추이



도면15

- 녹조류 세포의 광합성 CO<sub>2</sub> 고정을 통한 이산화탄소 저감 효과 증명

