Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.
Vol. 13, No. 3, 303-309 (1985)

고정화 미생물에 의한 에너지 생산
광합성 박테리아에 의한 수소 생산 -

조영일 · 선용호

(연세대학교 공과대학 화학공학과)

(1985년 8월 20일 수리)

Biofuel Production by Immobilized Living Cells
- Hydrogen Production by Photosynthetic Bacteria -

Yung-il Joe and Yong Ho Seon

Department of Chemical Engineering, Yonsei University

(Received August 20, 1985)

Continuous production of hydrogen by Ca alginate-immobilized photosynthetic bacteria was studied in a packed-bed bioreactor. The dilution rate and input concentration of carbonaces substrate were selected as operating parameters. To choose the strain for immobilization, hydrogen productivities of *Rhodopseudomonas capsulata* 10006 and *Rhodospirillum rubrum* KS-301 were compared through preliminary batch cultures of their free cells: the former was found to show better hydrogen productivity in spite of its lower specific growth rate. For the continuous production of hydrogen by immobilized *R. capsulata*, the optimum dilution rate was about 0.84 h^{-1}. The immobilized cells gave beiter hydrogen yield and conversion efficiency than free ones. And a kinetic parameter K'_m was determined for the packed-bed bioreactor; being practically constant for a specific range of dilution rates.

최근 생물학적 방법에 의한 대체 에너지 생산에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 이 중 수소는 이른바 clean energy로 기대되는 것으로, 미생물의 대사 기능을 이용하는 방법과 태양 에너지를 활용하는 전기 화학적 방법등이 연구되고 있다[1-4].

생물학적 수소 생산에 있어서는, 광합성 및 혐기성 박테리아, 조류등이 연구의 대상이 되고 있다[5-7]. 광합성 박테리아의 경우, 빛의 존재하에서 ***Rhodospirillum rubrum***이 수소를 생성한다는 사실을 Gest등[8]이 보고한 이래, Zürrer등[9]은 유기성 폐수를 이용하였고, Hillmer등[10]은 ***Rhodopseudomonas capsulata***에 관하여 연구하였다. 최근에는 자유 세포(free cell)뿐 아니라 고정화 세포의 이용이 시도되고 있다[11-15].

본 연구에서는 고정화 미생물에 의한 수소 연속 생산 가능성 검토의 일환으로, 고정화 광합성 미생물 충전층 반응기의 조작 특성 일부를 규명하고자 하였다. 먼저 ***R. rubrum***과 ***R. capsulata***의 자유 세포를 사용한 회분 실험을 통하여 수소 생산성을 비교하였다. 이어서 고정화 ***R. capsulata***의 충전층 반응기에서 연속 수소 생산 실험을 행하고, 도입 기질 농도와 희석 속도의 영향을 검토하였으며, 겉보기 Michaelis상수를 평가하였다.

속도론

고정화 세포에 대하여 Fig. 1과 같은 간단한 모델을 가정한다. 여기서 확산에 의한 기질의 플럭스 J_d는 $J_d = -D \text{ grad } S$

$$= D(S_0 - S_1)/L \quad (1)$$

박테리아 표면에서의 반응 속도는, 고정화 담체 내부에서의 균체의 실질증식을 무시할 때, Michaelis-Menten형에 따른다고 본다.

$$v = V_m S_1/(K_m + S_1) \quad (2)$$

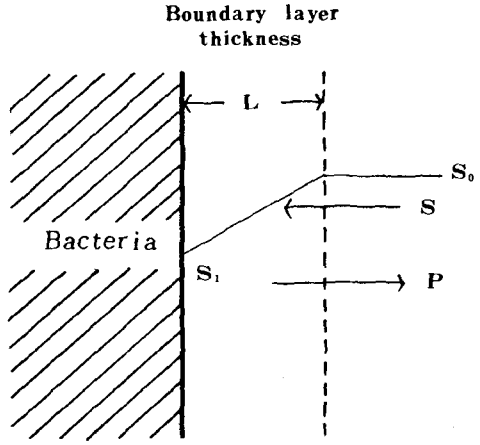

Fig. 1. Immobilized bacterial system

어느 편이 율속이거나 간에, 정상 상태에서는

$$J_d = v \quad (3)$$

이다. 이들 관계식으로부터 v의 유효 근사해를 구하면

$$v = V_m S_0/(K'_m + S_0) \quad (4)$$

$$K'_m = K_m + L\ V_m/D \quad (5)$$

$L \rightarrow 0$ 이면, $K'_m = K_m$이 된다.

지금 고정화 균체 충전층 반응기에서, 본체 흐름 중의 기질 농도 S_0와 균체 표면에서의 기질 농도 S_1의 관계는 선형적이라 보면,

$$-dS_0/dt = r(-dS_1/dt) \quad (6)$$

또한 반응기에서의 기질의 총괄 전화율은 다음과 같다.

$$X = 1 - (S_0)_{out}/(S_0)_{in} \quad (7)$$

$t = 0$ 일때 $S_0 = (S_0)_{in}$, $t = 1/D_t$일때

$S_0 = (S_0)_{out}$ 이므로,

$$X(S_0)_{in} = K'_m \ln(1-X) + V'_m/D_t \quad (8)$$

$V'_m = rV_m$

따라서 실험 자료로부터 K'_m을 평가할 수 있다.

실험 장치 및 방법

균주

본 실험에서는 제공받은 균주 중에서 *R. capsulata* 10006과 *R. rubrum* KS-301두 종을 사용하였다.

균주의 보관 및 배양

기본 배지로는 Ormerod basal *medium*[16]을 사용하였다. 전 배양에서는 기본 배지에서 탄소원으로

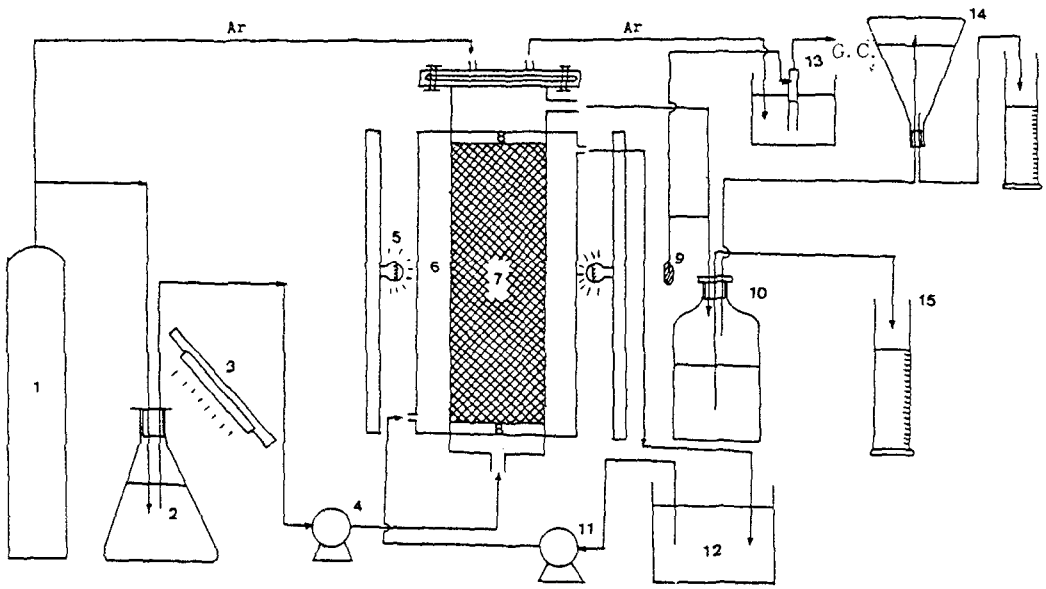

Fig. 2. Schematics of packed-bed bioreactor

1. Air tank
2. Feed tank
3. U.V. lamp
4. Peristaltic pump
5. Incandescent lamp
6. Water jacket
7. Packed bed
8. Support (nylon net)
9. Sampling port
10. Liquid-gas separator
11. Circulation pump
12. Water bath
13. Gas sampling tap
14. Gas collector
15. Graduated cylinder

DL-malic acid대신에 sodium lactate (30 mmol/L) 와 biotin (15μg/L)을 첨가한 것을 사용하였다. 본 배양에서는 lactate의 농도를 변화시켰다.

회분 반응 장치 및 실험

회분 반응기로는 용량 1.5L (단면적 12×5.6cm^2, 빛을 받는 넓이 12×15cm^2)인 유리 용기를 사용하였다. 배양액에는 알곤 가스를 통하여 혐기성이 되게 하였으며, 30℃로 유지하면서 자석 교반기로 혼합하였다. 빛의 강도는 12000Lux이었다[16] Lactate초기 농도는 5, 10, 20, 30, 50, 100 mmol/L로 각각 변화시켰다.

연속 반응 장치 및 실험

반응기는 Fig. 2에 나타낸 것처럼 두께 3 mm 의 아크릴 수지 판으로 제작하였으며, 부피는 0.4L (단면적 2×10cm^2, 높이 20cm) 이었다. 반응기 상부에는 나일론 망을 설치하여 고정화 bead의 부상을 방지하였다. 미량 펌프로 반응기 하부에 도입한 기질 용액은 상부에서 생성기체와 분리된 후 자연 일류되도록 하였다.

Ca alginate법에 의한 *R. capsulata*의 고정화는 통상적 방법에 의하였다[11,12]. Bead의 평균 크기는 3.0mm, 공극율은 0.318 이었다.

한편 충전층 반응기 조작 조건은 Table 1과 같다. 도입 기질 용액 중에는 겔 안정제로서 염화칼슘 3g/L를 첨가하였다. 정상 상태는 수소 생성 속도와 잔류 lactate농도가 일정하게 유지될 때로

Table 1. Operating conditions of packed-bed reactor.

Item	Quantity
Reactor	
Bottom area (cm^2)	2×10
Height (cm)	20
Total volume (cm^3)	400
Working volume (cm^3)	360
Packed-bed volume (cm^3)	300
Void fraction of Ca alginate bead	0.318
Illuminated area (cm^2)	180 (10×18)
Illumination (Lux)	12000
Flow rate (cm^3/h)	20−100
Inlet sodium lactate concentration (mmol/L)	30, 50
Inlet pH	6.9
Reaction temperature (℃)	30

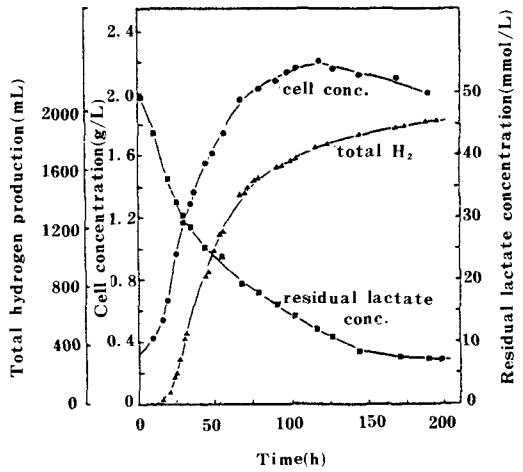

Fig. 3. Time course of total hydrogen production, cell concentration, and residual lactate concentration for the batch culture of *R. capsulata*
(Initial lactate conc. =50mmol/L).

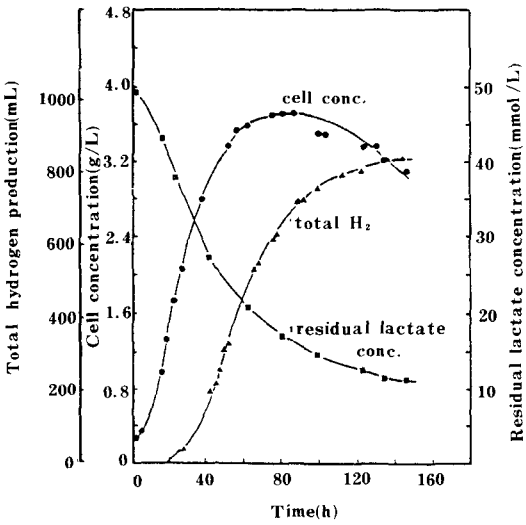

Fig. 4. Time course of total hydrogen production, cell concentration, and residual lactate concentration for the batch culture of *R. rubrum.*
(Initial lactate conc. =50mmol/L).

하였다.

분석

균체는 분광 광도계로 O.D. (660nm)를 측정하고 건조 질량으로 환산하였다. Lactate의 농도는 Barker등의 방법으로[17], 생성 기체는 가스 크로마토그래피로 분석하였다[5].

실험 결과 및 고찰

회분 실험

*R. capsulata*와 *R. rubrum*의 회분 배양 결과를 Fig. 3 ~ 6에 보였다.

Fig. 3과 4는 각각 sodium lactate 초기 농도 50 mmol/L일 때의 *R. capsulata*와 *R. rubrum*의 균체 농도, 잔류 sodium lactate 농도, 누적 수소 생성량의 시간적 변화를 보인 것이다. Sodium lactate 의 초기 농도를 5, 10, 20, 30, 100mmol/L로 하였을 때도 같은 경향의 실험 결과를 얻었다.

실험결과로 부터 Lineweaver-Burk plot (Fig. 5) 으로 Monod식 상수들을 구하면 다음과 같다.

	μ_m (1/h)	K_s (g/L)
R. capsulata	0.062	0.128
R. rubrum	0.088	0.064

Fig. 6은 수소 비생성 속도를 보인 것이다.

이상의 회분 배양 결과를 종합하면 Table 2와 같다. *R. capsulata*는 *R. rubrum*에 비하여 균체의 비증식 속도 및 수량은 작지만, 수소의 비생성 속도, 수량, 전화율 등은 오히려 큼을 알 수 있다.

고정화 *R. capsulata*에 의한 연속 수소 생산

자유 균체의 회분 배양 결과, *R. capsulata*의 수소 생산성이 좋았으므로, 이의 고정화 균체를 충전

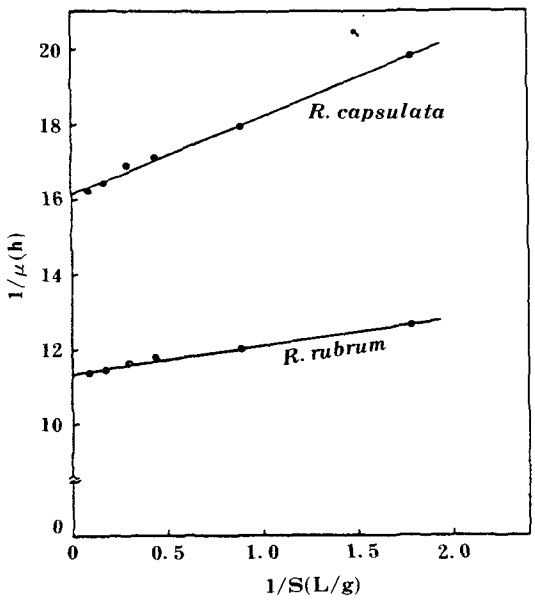

Fig. 5. Lineweaver-Burk plot for the growth of *R. capsulata* and *R. rubrum*.

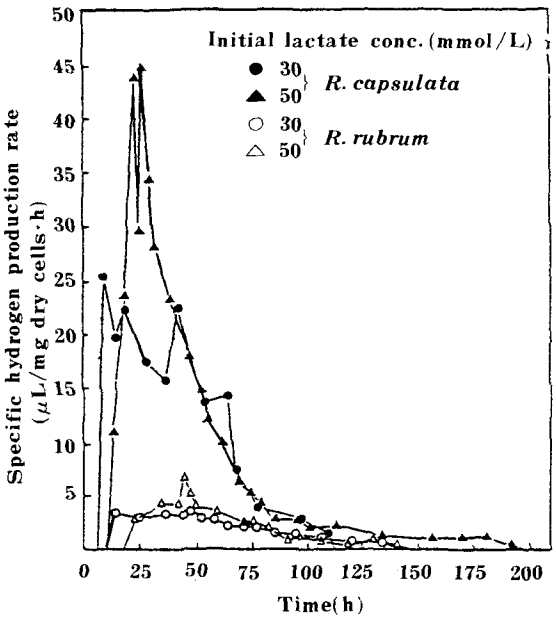

Fig. 6. Effect of initial lactate concentration on specific hydrogen production rate.

Table 2. Kinetic parameters obtained from batch experiments.

Kinetic parameter	Strain	Initial lactate conc. 30mmol/L	50mmol/L
Specific hydrogen production rate, q_p (mmol/g·h)	*R. capsulata*	1.035	0.731
	R. rubrum	0.144	0.176
Specific lactate utilization rate, q_s (mmol/g·h)	*R. capsulata*	0.390	0.232
	R. rubrum	0.141	0.153
Cell yield, $Y_{x/s}$ (g/g)	*R. capsulata*	0.385	0.393
	R. rubrum	0.922	0.790
Hydrogen yield, $Y_{p/s}$ (mol/mol)	*R. capsulata*	2.410	2.025
	R. rubrum	1.091	0.975
Hydrogen yield, $Y_{p/x}$ (mmol/g)	*R. capsulata*	55.86	45.97
	R. rubrum	10.57	11.01
Hydrogen conversion efficiency, (%)*	*R. capsulata*	40.23	33.75
	R. rubrum	18.18	16.25
Lactate conversion, (%)	*R. capsulata*	78.27	85.50
	R. rubrum	77.67	77.60

*Based on the theoretical value (6 mol of hydrogen formed per 1 mol of lactate)

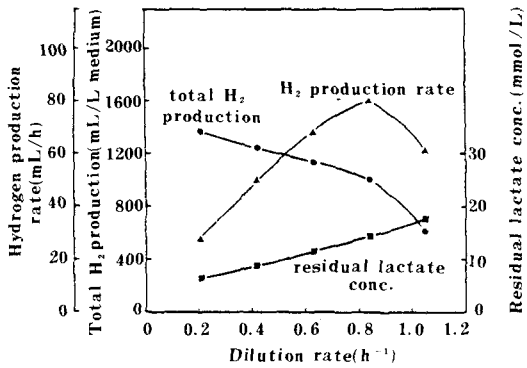

Fig. 7. Change of total hydrogen production, hydrogen production rate, and residual lactate concentration with dilution rate at steady state continuous culture of immobilized *R. capsulata*.
(Initial lactate concentration=30mmol/L).

한 충전층 반응기에서 수소 연속 생산 실험을 행하였다. 이때 lactate의 도입 농도는 30 및 50mmol/L로 하고, 희석 속도는 0.21~1.05h^{-1}의 범위에서 변화시켰다(Fig. 7~10).

(1) 도입 lactate농도 및 희석 속도의 영향

Fig. 7은 도입 lactate 농도 30mmol/L 일 때의 희석 속도에 따른 정상 상태 수소 생성량(mL/L도입 배양액), 수소 생성 속도(mL/h), 잔류 lactate 농도(mmol/L 배출액)의 변화를 보인 것이다. Fig. 8은 도입 lactate 농도 50 mmol/L인 경우의 실험 결과이다.

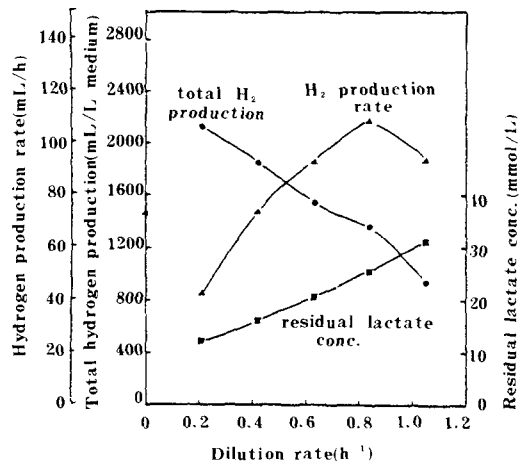

Fig. 8. Change of total hydrogen production, hydrogen production rate, and residual lactate concentration with dilution rate at steady state continuous culture of immobilized *R. capsulata*.
(Initial lactate concentration=50mmol/L).

수소 생성량(mL/L 도입 배양액)은 희석 속도가 작을수록 많고 잔류 lactate 농도는 희석 속도가 커질수록 증가하지만, 수소 생성 속도는 희석 속도의 증가와 함께 커지다가 다시 작아짐을 알 수 있다. 수소 생성 속도가 최대가 되는 것은 희석 속도 0.84 h^{-1} 정도인 때로서, 도입 lactate 농도 30 및 50mmol/L일때, 각각 80.1 및 108.2mL/h이었다.

이상의 실험 결과로부터 수소 비생성 속도, lactate 비소비 속도, 수소 수량 등을 구하여 종합하면, Fig. 9 및 10과 같다.

수소 비생성 속도 및 lactate 비소비 속도 역시 희석 속도의 증가에 따라 커지다가 작아지는데, 희석 속도 0.84h^{-1} 부근에서 최대값이 된다. 도입 lactate농도 30 및 50mmol/L일 때의 수소 비생성 속도의 최대값은 각각 5.95 및 8.04mmol/g. h이고, lactate 비소비 속도의 최대값은 각각 2.10 및 3.30 mmol/g. h이다.

한편 lactate기준의 수소 수량은, 희석 속도가 큰 경우를 제외하고는 크게 달라지지 않는데, 각각 2.6-2.8 및 2.3-2.4 mol/mol 정도이었다. 이때 수소 전화율은 각각 43.3-47.0 및 38.8-41.2% 정도가 된다.

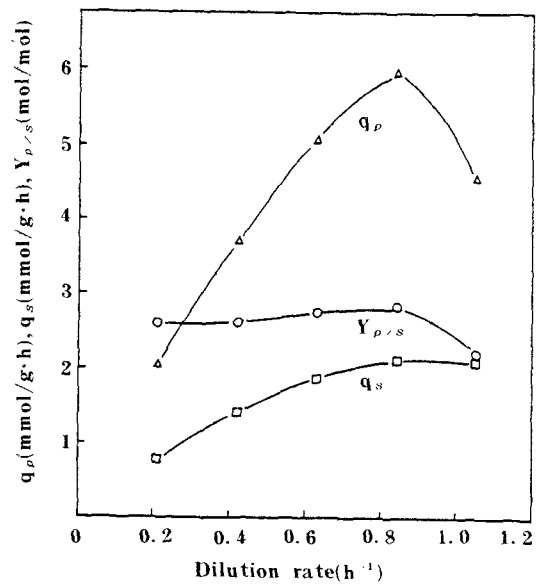

Fig. 9. Change of specific hydrogen production rate(q_p), specific lactate utilization rate (q_s), and hydrogen yield($Y_{p/s}$) with dilution rate at steady state continuous culture of immobilized *R. capsulata*.
(Initial lactate concentration=30mmol/L).

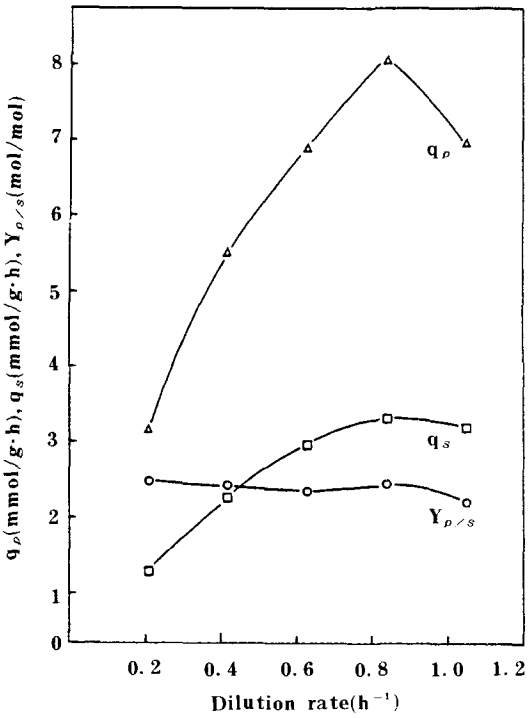

Fig. 10. Change of specific hydrogen production rate(q_p), specific lactate utilization rate (q_s), and hydrogen yield($Y_{p/s}$) with dilution rate at steady state continuous culture of immobilized *R. capsulata*.
(Initial lactate concentration=50mmol/L).

여기에서 자유 균체와 고정화 균체의 수소 생성능을 비교하기 위하여 다음과 같은 총괄 효율 인자를 정의한다[18].

$$\eta = \frac{\text{고정화 균체에서의 최대 수소 비생성 속도}}{\text{자유 균체에서의 최대 수소 비생성 속도}}$$

본 실험의 경우, 총괄 효율 인자는 lactate 초기 농도 30mmol/L인 경우 1.9—5.7, lactate 초기 농도 50 mmol/L인 경우에는 4.3—11.0 정도가 된다. 이 결과는 보다 세밀하게 검토하여 보아야 할 소지가 있으나, 고정화에 의하여 수소 비생성 속도가 상당히 커짐을 나타내는 것이다. 실험 결과를 비교하면, 수소 수량 및 수소 전화율도 고정화에 의하여 다소 증가함을 알 수 있다.

(2) 속도식의 고찰

실험 결과를 사용하여 식 (8)에 의하여 충전층 반응기에 대한 겉보기 Michaelis 상수 K'_m 값을 구하면 다음과 같다.

D_i (1/h)	0.21	0.42	0.63	0.84	1.05
K'_m (g/L)	175	144	143	140	131

이 결과는 유속이 증가하면 경계층의 두께가 감소하게 되는 일반적 경향을 나타내는 것으로 볼 수 있다. 그러나 희석 속도 0.21h^{-1}인 경우를 제외하고는 거의 일정한 값으로 보아도 좋을 것인데, 이는 Ca alginate법에 의한 고정화 균체를 이용한 수소 생산에 있어서, 희석 속도가 어떤 값 이상이 되면 외부 물질 전달 저항이 크게 문제가 되지 않음을 의미하는 것으로 볼 수 있다. 그러나 이 문제는 고정화 균체 bead의 모델을 한층 현실화하고 bead의 크기를 변화시켜서 행한 실험을 통하여 보다 정밀하게 검토하여 보아야 할 것이다.

결 론

고정화 광합성 균체를 이용하여 대체 에너지 물질의 하나인 수소의 연속 생산에 관하여 실험한 결과, 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 자유 균체를 사용한 회분 실험 결과, 균체의 비증식 속도는 *R. rubrum*이 크지만, 수소 생산성은 *R. capsulata*가 우수한 것으로 판명되었다.

2. *R. capsulata*의 Ca alginate 고정화 균체를 충전한 충전층 반응기에서, 도입 sodium lactate농도와 희석 속도를 조작 변수로 하여 연속 수소 생산 실험을 행한 결과, 희석 속도 0.84h^{-1}부근에서 수소 생산성이 가장 좋았다.

3. 고정화 균체의 경우가 자유 균체에 비하여 수소 수량 및 수소 전화율이 다소 증가하였다.

4. 충전층 반응기에서 겉보기 Michaelis상수 K'_m을 평가할 수 있었는데, 희석 속도가 0.42h^{-1} 이상인 범위에서는 거의 일정하였다.

후기

(1) 본 연구는 한국 학술 진흥 재단의 1984년도 연구비 지원에 의하여 수행된 것으로, 당 재단에 감사드립니다.

(2) 균주를 제공하여 주신 고 영희 님과 김 병홍 님(한국 과학 기술원), 이 현순 님(성균관 대학교), 가루베 이사오 님(동경 공업 대학)과, 실험 수행을 적극적으로 도와준 강 호철, 김 종성, 한 정우, 홍 영식 군께 감사드립니다.

사용기호

D : *molecular diffusivity of substrate in liquid* (m^2/h)

D_i : dilution rate (h^{-1})

J_d : flux due to diffusion for substrate (mol/ m^2·h)
K_m : Michaelis constant (mol/L)
K'_m : apparent Michaelis constant (mol/L)
K_s : saturation constant (mol/L)
L : effective boundary-layer thickness (m)
P : product
S : substrate or substrate conc. (mol/L)
S_0 : substrate conc. in bulk solution (mol/L)
$(S_0)_{in}$: substrate conc. in bulk solution at column inlet (mol/L)
$(S_0)_{out}$: substrate conc. in bulk solution at column outlet (mol/L)
S_1 : substrate conc. at immobilized bacteria surface (mol/L)
V_m : maximum reaction rate
V'_m : $= rV_m$
X : overall conversion in the packed-bed
r : proportionality constant
t : time (h)
v : reaction rate
μ : specific growth rate (h^{-1})
μ_m : maximum specific growth rate (h^{-1})
η : effective factor

참고문헌

1. 조영일, 박돈희, 화학공업과 기술, **1**(2), 13 (1984).
2. 강호철, 석사학위논문, 연세대학교 대학원,
3. Pimental, D., et al.: *Solar Energy*. **30**(1), 1(1983).
4. Kodratieva, E.N. and I.V. Gogotov : *Adv. in Biochem. Eng.*, **28,** 139 (1983).
5. Kim, J.S., H. Yamaguchi and K. Ito : *J. Ferment. Technol.*, **59**(3), 185 (1981).
6. Mitsui, A., et al., "Alternative Energy Sources II", vol. 8, 1980, p. 3483.
7. Aiba, S.: *Adv. in Biochem. Eng.* **23,** 85 (1982).
8. Gest, H. and M.D. Kamen : *J. Bacteriol.*, **58**(2), 239 (1949).
9. Zürrer, H. and R. Bachofen : *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**(5), 789 (1979).
10. Hillmer, P. and H. Gest : *J. Bacteriol.*, **129**(2), 732 (1977).
11. Suzuki, S., I. Karube and T. Matsunaga: *J. Biotechnol. Bioeng. Symp.*, **8,** 501 (1978).
12. Brosseau, J.D. and J.E. Zajic : *Adv. in Biotechnol.*, **2,** 281 (1981).
13. Lim, D.J. and C.Y. Choi : *Hwahak Konghak*, **23**(1), 9 (1985).
14. Weetal, H.H., B.P. Sharma and C.C. Deter : *Biotechnol. Bioeng.*, **23,** 605 (1981).
15. Cheetham, P.S. Jr., K.W. Blunt and C. Bucke : *Biotechnol. Bioeng.*, **21,** 2155 (1979).
16. Ormerod, J.G., K.S. Ormerod and H. Gest : *Arch. Biochem. Biophys.*, **94,** 449 (1961).
17. Barker, S.B. and W.H. Summerson : *J. Biol. Chem.*, **138,** 535 (1941).
18. Sliniger, P.J., et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, **24,** 2241 (1982).