

수소생산을 위한 *Rhodopseudomonas sphaeroides*의 최적 배양조건

김진상^{1*} · 홍용기² · 신일식³ · 조학래³ · 장동석³
부산수산대학교 ¹미생물학과, ²생물공학과, ³식품공학과

Optimum Culture Conditions for Hydrogen Production of *Rhodopseudomonas sphaeroides*

Kim, Jihn-Sang^{1*}, Yong-Ki Hong², Il-Sik Sin³, Hak-Rae Cho³ and Dong-Suk Chang³

¹Department of Microbiology, ²Department of Biological Science and Technology, and
³Department of Food Science and Technology, National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea

Abstract — We examined optimum culture conditions of *Rhodopseudomonas sphaeroides* B5 for effective utilization of substrate and sunlight for hydrogen production. The optimum concentration range of DL-lactate as electron donor for hydrogen production by resting cells was from 5 to 50 mM, and optimum C/N ratio (lactate/glutamate) for maintenance of hydrogen production activity by growing cultures was from 5 to 6. Hydrogen production by the cultures of low cell density (0.36 mg/ml dry cells) was saturated with 10 Klux light intensity. Under constant illumination of 50 Klux which was set up as the average medium value of annual variation of sunlight intensity, hydrogen production with various cell densities in the culture resulted in highest production rate (132 μ /hr/mg dry cells) up to 0.64 mg/ml dry cells. However, the amount of total hydrogen production was saturated with cell density of 2.1 mg/ml dry cells. In addition to these, the optimum inner thickness previous to light of the culture vessel for hydrogen production which was measured under sunlight was 5 cm.

서 론

광합성세균은 광에너지를 이용하여 수소를 생성하는 활성을 가지며 수소는 무공해의 이상적인 에너지 자원으로서, 또는 수송과 저장이 편리한 에너지 매체(2차 에너지)로서 고려되고 있다(1-3). 광합성세균의 광의존 수소생산은 1949년 Gest와 Kamen(4)에 의해 *Rhodospirillum rubrum*에 있어서 발견된 이래, 홍색 비유황세균의 일반적 특성인 것으로 인식되었다. 홍색 비유황세균은 혐기적 광의존 전자전달과정에 의해 유기화합물로부터 수소를 생성하며, 이 반응은 최종적으로 질소고정 효소인 nitrogenase에 의해 촉매되는

것이 명백해졌다(5-7). 홍색비유황세균의 nitrogenase 촉매에 의한 수소생성은 N₂와 암모늄염에 의해 저해된다. 그러나 질소원으로서 어떤 아미노산(예: glutamate, aspartate 등) 첨가배지의 증식세포에 있어서는 최대로 수소가 생산되었다(4, 7, 8).

Hilmer와 Gest(8)는 *Rhodopseudomonas capsulata*의 증식세포에 있어서 수소생산은 배지 중의 N/C ratio에 크게 영향을 받으며, 균체증식과 수소생성은 특정 광조사강도에 포화현상을 나타냄을 밝혔다. 저자들은 *Rhodopseudomonas palustris*에 있어서 nitrogenase 합성의 유도물질로서 N₂ 또는 glutamate를 이용했을 때 N₂ 가스보다는 glutamate 증식세포에 의한 수소생산활성이 더 높고, lactate, malate 등의 유기산이 유효 전자공여체임을 보고했으며(7), *Rhodopseudomonas sphaeroides* B5의 옥외회분배양(9)에 있

Key words: Hydrogen production, optimum conditions, *R. sphaeroides*

*Corresponding author

어서 광조사가 수소생산의 제한인자이며, 배양액온도 또한 중요한자임을 보고하였다. 그러나, 효율적 수소생산을 위한 배지 및 배양의 최적조건에 대한 기초적 검토는 아직 부족하다.

광합성세균에 의한 수소생산의 효율증대와 전자공여체의 유효이용, 그리고 장기간의 지속적 수소생산을 위하여는 세포생육과 nitrogenase의 활성유지를 위한 적절한 전자공여체(또는 탄소원)와 질소원 함유배지의 공급이 중요하고, 또한 광조사와 관련하여 배양액 중의 적당한 균체농도 및 배양조의 최적광투과깊이 등의 제조건 확립이 필요하다. 본 연구에서는 *R. sphaeroides* B5를 이용하여 수소생산에 영향을 미치는 이들 주요조건을 검토하여 배양의 최적화를 기하고저 하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

본 실험에는 저자 등이 태국의 Bangkok 주변에서 분리·동정한 *Rhodospseudomonas sphaeroides* B5(10, 11)를 사용하였다.

Biotin(15 µg/l)을 함유하는 Ormerod 등(12)의 최소배지를 다음과 같이 수정하여 기본배지로서 사용하였다. Thiamine-HCl(1 mg/l)과 nicotinic acid (1 mg/l)를 첨가하고, ammonium sulfate와 malic acid는 제거하였다. 따라서 이 기본배지는 탄소원(또는 전자공여체)과 질소원을 함유치 않는다.

배양방법

모든 배양은 혐기조건에서 광합성적으로 실시하였고, 균의 접종은 계대배양 보존 중인 G5배지(13)의 agar slant로부터 실시하였다. 20 ml 용량의 부착 시험관에 5 mM의 sodium L-glutamate와 30 mM의 sodium DL-lactate를 함유하는 기본배지(GL기본배지)를 기포없이 가득 채워 정상기까지 배양한 것을 종배양으로 사용하였다. 수소생산실험에 사용하기 위한 전배양으로서, 소규모배양(20 l)은 종배양액 1적을 GL기본배지에 접종하여 종배양시와 같은 방법으로 하였고, 대규모 배양은 고무전이 부착된 1.3 l 용량의 유리배양용기(수광면 25 cm×12 cm, 광투과깊이 5 cm)에 GL기본배지 1l를 주입하고, 여기에 종배양액 0.5%를 접종한 후, 배양액 상부 표면을 액체파라핀

으로 피복한 혐기조건으로 배양하였다. 배양은 33°C로 조절한 유리수조 중에 배양용기를 넣고, 200 w 백열등으로 광조사(약 10 Klux)하여 실시하였다.

수소생산 측정

비중식세포에 의한 수소생산 측정을 위하여 상기의 소규모배양과 같이 증식한 균체(대수증식기)를 8,000 ×g, 5분간(실온) 원심집균하여 기본배지로 균체를 2회 원심세척한 후, 30 mM 또는 1~200 mM의 sodium DL-lactate를 함유하는 무질소배지에 균농도를 적절히 조절하여 현탁하였다. 균현탁액은 Ar가스로 약 5분간 통기한 후 즉시 수소생산 측정에 공시하였다. 수소생성반응은 사전에 Ar가스 치환한 반응튜브(30 ml 용량의 코크 부착 시험관, φ 1.8 cm)에 균현탁액 5 ml를 주사기로 주입한 후, 33°C에서 30분간 예비배양하여 온도가 균일하게된 후 즉시 광조사하여 시작되었다. 광조사는 200 W 백열등으로 강도를 적절히 조절하였다.

증식균체에 의한 수소생산은 2.5~50 mM 범위의 sodium L-glutamate와 15~50 mM 범위의 sodium DL-lactate를 각기 함유하는 기본배지 각 1l를 1.3 l 용량의 유리용기(수광면 25 cm×12 cm, 광투과깊이 5 cm)에 주입하여 상술한 소규모배양액(정상기 균)을 0.5%씩 접종한 후, 배양액 상부표면을 액체파라핀으로 피복한 혐기조건으로 33°C에서 광조사(약 30 Klux) 배양하여 측정하였다. 수소생산량은 배양용기 상부의 가스출구를 gas meter(wet type, model W-NK-1A, shinagawa seiki Co., Ltd., Japan)에 연결하여 측정하고 표준상태로 환산하여 표시하였다.

옥외배양에 의한 배양조의 최적 광투과깊이 측정을 위한 배양조로서 수광면을 20 cm×12 cm로 일정하게 하고, 광투과 깊이를 2.5 cm, 5 cm, 7.5 cm로 각기 달린 아크릴 수지제 배양조 3조를 준비하였다. 상술한 대규모 배양액(대수증식기)을 원심집균(8,000×g, 5분)하여 30 mM의 sodium DL-lactate 함유 무질소배지로 2회 원심세척한 후, 세척시와 동배지에 균체를 균일하게 현탁(0.64 mg/ml 건조균체)하였다. 광투과 깊이가 2.5, 5, 7.5 cm인 배양조에 균현탁액을 각각 500, 1,000, 1,500 ml씩 주입하고, 배양액 상부표면을 액체파라핀으로 피복하여 가스출구를 부착한 고무전을 한 후, 실험실 남쪽창밖의 옥외 태양광하에 배양하여 수소생산을 측정하였다. 각 배양조에 설비한

가스출구를 실험실 내에 설치한 0.1 N NaOH 용액을 채운 역위 삼각플라스크(1l 용량)에 연결, 물치환 (14)에 의해 수소생산량을 측정하고 표준상태로 환산하여 표시하였다.

분석

상술한 제조건의 배양에 의해 생성되는 수소는 적당한 시간 간격으로 가스분석용 주사기에 의해 반응 튜브 또는 배양용기의 기상부에서 가스시료(100 ml)를 채취하여 gas chromatography (Shimadzu, GC-8A, Japan)에 의해 분석하였다. 수소의 검출을 위하여 Molecular sieve 5A(Nishio Co., Japan)를 충전한 Column을 70°C로 유지하고, 열전도 검출기는 100°C, bridge current 는 70 mA로 조절하였고, Ar을 carrier gas(flow rate 50 ml/min)로 사용하였다.

세포중식은 Spectrophotometer(Spectronic 20, Milton Roy Co., U.S.A.)에 의해 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 건조균체량은 배양액을 원심(8,000×g, 5분) 집균하여 증류수로 2회 세척한 후 105°C 건조기 중에서 24시간 건조하여 측정하였다.

광조사 강도는 Topcon photocell illuminometer (model SPI-71, Tokyo Kogaku Kikai, K.K., Japan)에 의해 측정하였다.

결과 및 고찰

수소생산배지의 조건

전자공여체의 최적농도범위 : 홍색비유황세균의 수소생산 전자공여체로서는 acetate, propionate, butyrate, malate, pyruvate, lactate 등의 저급유기산류가 유효하고(15), 특히 lactate는 효율적으로 수소를 생성하므로(7, 8), 이를 전자공여체로 하여 비중식세포에 있어서 수소생산에 대한 최적농도범위를 조사하였다. Fig. 1은 5~200 mM 범위의 DL-lactate 함유 무질소배지의 균현탁액(0.36 mg/ml 건조균체)에 있어서 수소생산속도를 측정된 결과이다. 5~50 mM의 lactate 범위에서는 41~42 μl/hr/ml culture의 최대 수소생산속도를 나타내지만, 그 이상의 농도에서는 점차 낮아져 100 mM 이상의 lactate에서는 급속히 저하되었다.

저농도의 기질을 어느 정도 효과적으로 이용할 수 있는지를 알기 위하여 1~20 mM 범위의 저농도 lac-

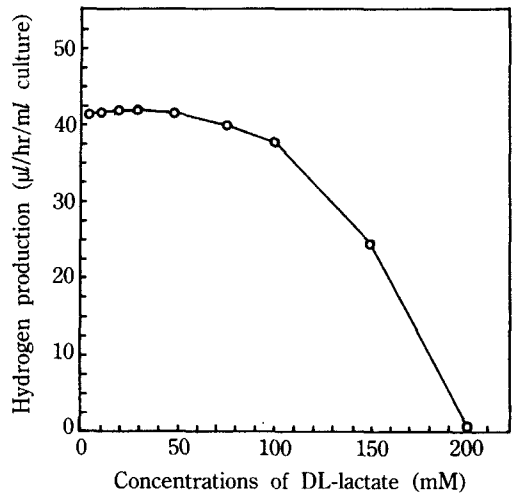


Fig. 1. Hydrogen production from various concentrations of DL-lactate.

Cells of exponential growth phase pregrown on the GL basal medium were harvested and washed twice with basal medium by centrifugation. Cells were resuspended in the basal medium containing from 5 to 200 mM of DL-lactate. Cultures were incubated at 33°C with illumination (about 10 Klux). Hydrogen production was then assayed by gas chromatography

tate 함유 무질소배지에 있어서 수소생성의 경시적 변화를 측정하였다(Fig. 2). 5 mM 이상에서 장시간 약 130 μl/hr/mg 건조균체의 최대속도로 수소가 생산되었다.

이들의 결과는 *R. sphaeroides* B5의 수소생산에는 5~100 mM의 lactate가 유효범위이고, 5~50 mM이 최적농도범위임을 나타내는 것이다.

전자공여체와 질소원의 공급비 : 세포생육과 수소 생성 활성유지에 유효한 질소원인 glutamate의 최적 농도범위를 결정함에 있어서 전자공여체(lactate) 농도와와의 상호관계를 검토하였다. DL-lactate와 L-glutamate의 함유비를 달리하여 조제한 기본배지에 있어서 *R. sphaeroides* B5의 증식세포에 의한 수소생산과 균체중식을 측정된 결과는 Fig. 3과 같다. 배지 중의 초발 lactate 농도가 15 mM일 때, 2.5, 5, 10 mM의 glutamate를 각기 달리 공급한 결과(Fig. 3, A.a)는 glutamate 농도가 높아지면 균체중식을 양호하나, 수소생산속도는 배양후기에 급격히 저하되었다. 한편, 2.5 mM의 glutamate 공급시 수소발생속도는 균체량에

의존되어 다소 낮으나 배양후기까지 비교적 안정성을 나타내었다. 초발 lactate 농도가 30 mM일 때(Fig. 3,

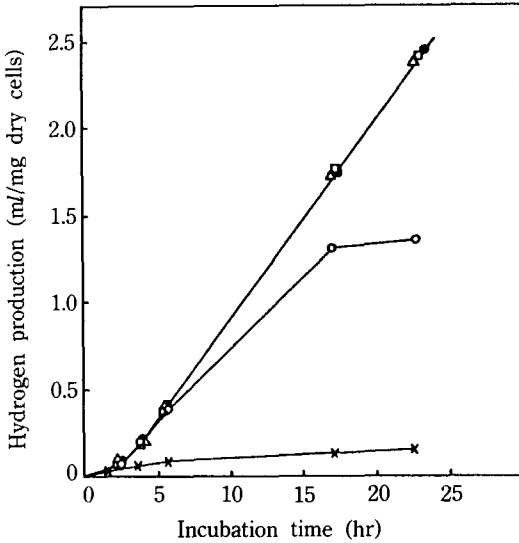


Fig. 2. Hydrogen production from low concentrations of DL-lactate.

Cell culture and hydrogen production conditions are the same as in the legend to Fig. 1 except that cells were resuspended in the basal medium containing from 1 to 20 mM of DL-lactate.

Symbols: 1 mM(X); 2.5 mM(O); 5 mM(●); 10 mM(Δ) and 20 mM(□); of DL-lactate

B.b), 10 mM의 glutamate 공급시에 균체증식이 가장 양호하나, 수소생성은 배양의 경과와 더불어 점차 저하되었다. 그러나, glutamate 농도가 5 mM일 때는 배양후기까지 수소생산속도가 거의 일정하게 유지되었다. 한편, 50 mM의 lactate 공급시에 10 mM의 glutamate 공급이 균체생육과 수소생산에 가장 적합함을 알 수 있으며 배양계 중에서 최대의 수소생산속도를 나타내었다(Fig. 3, C.c).

Hillmer와 Gest(8)는 *R. capsulate*에 의한 수소생성이 배지의 초발 N/C(glutamate/lactate) ratio에 크게 영향을 미치며, 어떤 임계치를 초과하면 배지 중에 free ammonia가 생성되며 이 때문에 수소생성이 저하되는 것으로 보고하였다. 본 실험에서 glutamate 농도가 높아질 때 수소생산이 저하됨은 유사한 이유 때문인 것으로 생각된다.

따라서 광합성 세균의 증식균체를 수소생산에 이용함에 있어서 안정된 수소생산을 위한 glutamate의 최적농도는 공급 lactate의 농도에 따라 달라지며, lactate가 15 mM일 때 2.5 mM의 glutamate, 30 mM의 lactate 공급시는 5 mM의 glutamate, 50 mM의 lactate 경우는 10 mM의 glutamate를 각각 공급함이 최적인 것으로 나타났다. 수소생산용 배지에 있어서 이 관계를 lactate와 glutamate의 농도비(C/N ratio)

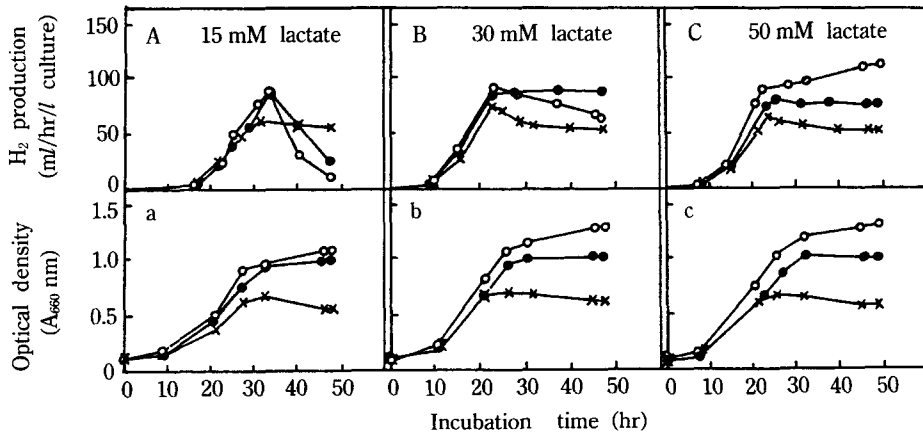


Fig. 3. Hydrogen production and cell growth from various concentrations of DL-lactate and L-glutamate.

Cells of stationary growth phase pregrown in the GL basal medium were inoculated in the one liter of basal medium containing from 2.5 to 10 mM of L-glutamate and from 1.5 to 50 mM of DL-lactate. Cultures were incubated at 33°C under illumination of 30 Klux. Hydrogen production and cell growth were then measured.

Symbols: Hydrogen production (A) and cell growth (a) in 15 mM of DL-lactate; hydrogen production (B) and cell growth (b) in 30 mM of DL-lactate; hydrogen production (C) and cell growth (c) in 50 mM of DL-lactate; 2.5 mM(X), 5 mM(●) and 10 mM(○) of L-glutamate

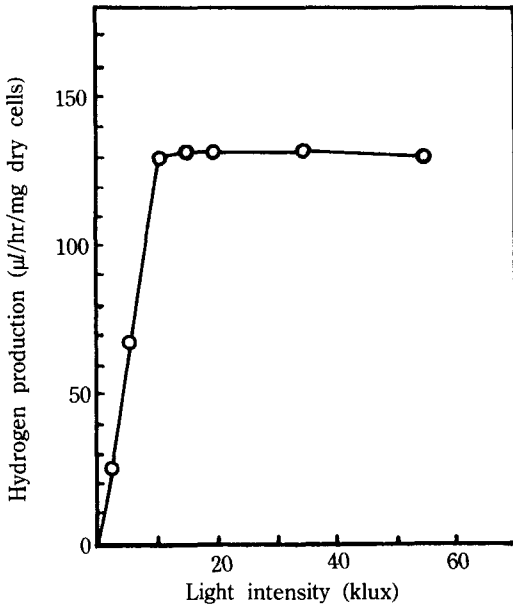


Fig. 4. The effects of light intensity on hydrogen production.

Cells of exponential growth phase pregrown in the GL basal medium were harvested and washed twice with basal medium containing 30 mM of DL-lactate, and were resuspended in the same basal medium. Cultures were incubated at 33°C with illumination at the indicated light intensity. Hydrogen production was then assayed by gas chromatography.

로 나타내면 C/N=5~6의 범위가 안정된 수소생산에 유효한 것으로 판단된다.

수소생산에 대한 광강도와 균체농도의 영향

광합성세균에 의한 수소생산은 광조사에 의존되며, 배양조에 입사되는 광강도와 배양액 중의 균체농도는 중요한 인자로 작용하므로 수소생산에 대한 양자의 영향을 검토하였다. Fig. 4는 저농도 균현탁액(0.36 mg/ml 건조균체)에 있어서 광강도를 달리한 조건으로 비중식세포에 있어서 수소생산속도를 측정할 결과이다. 광조사강도가 점차 강해짐에 따라 수소생산속도가 거의 직선적으로 증가하였고 10 Klux 이상에서는 더 이상 증가하지 않았다. 본 실험조건에 있어서 수소생산은 10 Klux에서 광포화현상을 나타내었다.

그러나 지표에 도달하는 태양광 강도의 범위는 계절 및 기상변화에 따라 최저 수천 lux에서 최대 평균 약 100 Klux의 범위로 년중 변동된다. 그러므로 태양광

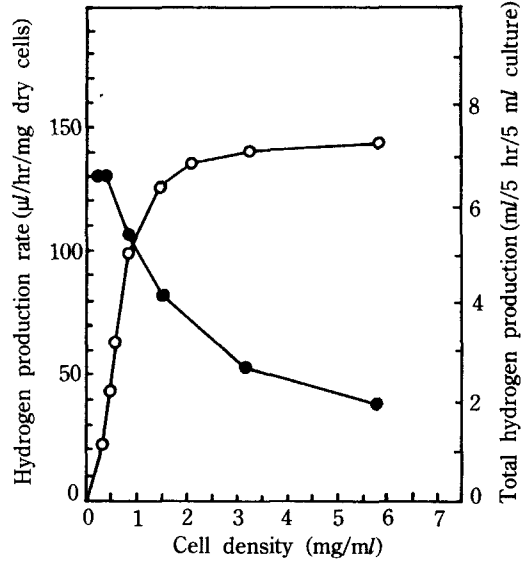


Fig. 5. The effects of various cell concentrations in hydrogen production under 50 Klux light intensity.

Cells of exponential growth phase pregrown as usual were treated the same as in the legend to Fig. 4. Cells were resuspended at the indicated cell densities in the basal medium containing 30 mM of DL-lactate. Cultures were incubated at 33°C under 50 Klux light intensity, and then hydrogen production was assayed by gas chromatography.

Symbols: Rate of hydrogen production(●); total hydrogen production(○).

변동폭의 중간치를 택하면 상변하는 자연광에 대응하는 조건을 얻을 수 있을 것으로 보고 50 Klux의 일정한 광조사로 균체농도를 달리하여 비중식세포에 의한 수소생산을 측정하였다. Fig. 5는 그 결과이며, 수소생산은 0.64 mg/ml 건조균체 농도까지 132 µl/hr/mg 건조균체의 최대속도를 유지하였고, 그 이상의 균체농도에서는 생산속도가 급격히 저하되었다. 그러나 총수소생산량은 0.8 mg/ml 건조균체 농도까지 거의 직선적으로 증가하였고, 그 이상의 농도에서는 점차 둔화되어 2.1 mg/ml 건조균체 이상에서 포화균체 농도를 나타내었다.

배양액 중에 보다 고농도의 균체유지를 위해서는 많은 영양물질의 공급이 필요한 점을 감안할 때, 본 실험조건에 있어서 최대 수소생산속도를 나타내는 0.64 mg/ml 건조균체(A₆₆₀ nm=1.0) 농도를 유지한다면 상변하는 태양광을 최대한 수소생산에 이용할 수 있을 것으로 본다.

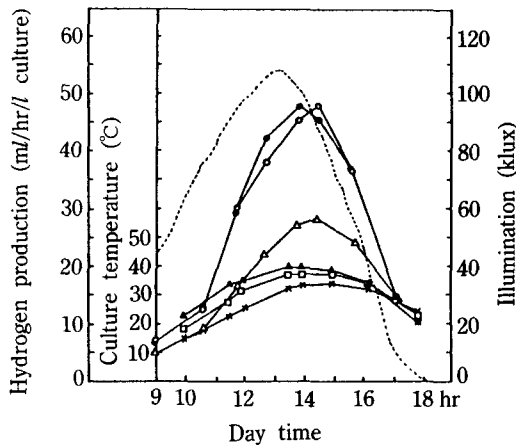


Fig. 6. Time courses of hydrogen production, temperature and illumination by outdoor cultures with culture vessels of different thickness.

Cells were cultured in the GL basal medium. In the exponential phase of growth, cells were harvested and washed as usual, and resuspended in the basal medium containing 30 mM of DL-lactate. Three sets of culture vessels, which inner thickness pervious to light is 2.5, 5 and 7.5 cm, respectively, filled with cell suspensions were incubated under outdoor conditions. Hydrogen production was then measured.

Symbols: Hydrogen production in culture vessels with 2.5 cm (●), 5 cm (○) and 7.5 cm (△) of thickness; culture temperature of culture vessels with 2.5 cm (▲), 5 cm (□) and 7.5 cm (X) of thickness; illumination (---)

배양조의 최적 광투과깊이

실용적 수소생산은 결국 옥외배양으로 실시하게 되며, 태양광의 효율적 이용을 위하여 자연광 이용 조건에서 수소생산에 대한 배양조의 최적 광투과깊이를 측정하였다. 청명한 날을 택하여 실험실 남쪽 창밖의 일광하에 준비한 3조의 배양조를 수광면이 나란히 남쪽을 향하게 하여 30°C 경사지게 배양하였다. 배양은 1989년 2월 1일에 실시하였다. 배양액온과 수소생산 그리고 일조의 변화를 측정된 결과는 Fig. 6과 같다. 3배양 모두 배양액온은 일출 후 조도 커브보다 뒤늦게 상승하였고, 조도와 온도가 상승함에 따라 수소생산속도가 증대되어 3배양 모두 배양액온이 30°C 이상에서 최대 생산속도를 나타내었다. 이날 외기온은 최고 15°C, 최저 5°C였다. 배양액의 균체농도가 0.64 mg/ml 건조균체로 일정하고 배양조의 광투과깊이가 2.5, 5, 7.5 cm일 때 각기 230 ml/day/culture, 229 ml/day/l culture 145 ml/day/l culture의

수소생산량을 나타내어 배양조의 광투과깊이 5 cm까지 최대량의 수소가 생산되었고 그 이상에서는 크게 감소되었다. 여기서 균체농도를 0.64 mg/ml 건조균체로 조절된 것은 Fig. 5의 결과에서 50 Klux 광조사시에 최대 수소생산속도를 나타내는 균체농도이기 때문이며, Fig. 6의 수소생산은 3배양조의 배양액량이 서로 다르지만 비교를 위하여 1 l culture로 환산하여 나타내었다. 본 실험조건에 있어서 태양광을 효율적으로 수소생산에 이용하기 위한 배양조의 최적 광투과깊이는 5 cm인 것으로 나타났다.

요 약

광합성세균에 의한 수소생산의 효율증대와 기질 및 태양광의 효과적 이용을 위하여 *Rhodospseudomonas sphaeroides* B5를 이용하여 배지 및 배양의 최적조건을 검토하였다.

비증식세포에 있어서 수소생산 전자공여체로서 DL-lactate의 최적 농도범위는 5~50 mM이었고, 증식세포의 수소생성활성 유지를 위한 배지의 최적 C/N ratio(lactate/glutamate)는 5~6의 범위였다.

0.36 mg/ml 건조균체의 저농도 균현탁액에 있어서 수소생산은 10 Klux의 광조사에 의해 포화현상을 나타내었다. 태양광 변화폭의 중간치로 설정한 50 Klux의 일정한 광조사조건에서 배양액의 균체농도를 달리하여 수소생성을 측정된 결과 0.64 mg/ml 건조균체농도까지 최대 생산속도(132 μ /hr/mg 건조균체)를 나타내었다. 그러나 총수소생산량은 2.1 mg/ml 건조균체 농도에서 포화되었다. 한편, 태양광하에서 저농도 균현탁액(0.64 mg/ml 건조균체)으로 측정된 수소생산을 위한 배양조의 최적광투과 깊이는 5 cm였다.

감사의 말

본 연구는 1986~1989년도 한국과학재단의 목적기 초연구비 지원에 의해 수행된 것이며, 재단의 지원에 깊이 감사드립니다.

참고문헌

1. Lawrence, W.J.: *Science*, **174**, 367 (1971)
2. Peschka, W. and C.J. Winter: *Int. J. Hydrogen*

- Energy*, **9**, 319 (1984)
3. Eickhoff, H.G., D. Martinsen and M. Walbeck: *Int. J. Hydrogen Energy*, **9**, 233 (1984)
 4. Gest, H. and D. Kamen: *Science*, **109**, 558 (1949)
 5. Wall, J.D., P.F. Weaver and H. Gest: *Nature*, **258**, 630 (1975)
 6. Hillmer, P. and H. Gest: *J. Bacteriol.*, **129**, 732 (1977)
 7. Kim, J.S., K. Ito and H. Takahashi: *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 827 (1980)
 8. Hillmer, P. and H. Gest: *J. Bacteriol.*, **129**, 724 (1977)
 9. Kim, J.S., K. Ito and H. Takahashi: *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 937 (1982)
 10. Watanabe, K.I., J.S. Kim, K. Ito, L. Buranakarl, T. Kampee and H. Takahashi: *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 217 (1981)
 11. Kim, J.S., H. Yamauchi, K. Ito and H. Takahashi: *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1469 (1982)
 12. Ormerod, J.G., K.S. Ormerod and H. Gest: *Arch. Biochem. Biophys.*, **94**, 449 (1961)
 13. Kohlmeier, E.F., Jr. and H. Gest: *J. Bacteriol.*, **61**, 269 (1951)
 14. Kim, J.S., K. Ito and H. Takahashi: *J. Ferment. Technol.*, **59**, 185 (1981)
 15. Zürrer, H.: *Experientia*, **38**, 64 (1982)

(Received February 19, 1991)