

*Rhodopseudomonas sphaeroides*와 *Clostridia*의 혼합 배양에 의한 수소 생성

이혜주·배 무*

이화여자대학교 자연과학대학 생물학과

Hydrogen Evolution by Mixed Culture of *Clostridia* with *Rhodopseudomonas sphaeroides*

Yi, Hye-Joo and Moo Bae*

Department of Biology, College of Natural Science, Ewha Womans' University, Seoul 120-750, Korea

Abstract— Hydrogen evolution by mixed fermentation of *Clostridium butyricum* and photosynthetic bacteria which were capable of consuming clostridial metabolites and evolving hydrogen was investigated. Acetate and butyrate formed from anaerobic clostridial fermentation were efficiently utilized by *Rhodopseudomonas sphaeroides* K-7. For complete bioconversion of clostridial metabolites such as acetate and butyrate into hydrogen, mixed culture of both anaerobic organisms forming molecular hydrogen was performed. By the mixed culture, the yield of hydrogen production increased by 20 to 75% and the levels of clostridial metabolites such as acetate, butyrate decreased in the fermentation broth. Influence of cell mixing ratio, mixing time and inoculum level on hydrogen evolution by mixed culture were examined. And then cometabolic pattern compared with in pure culture was observed as time course.

이상적인 대체 연료로서의 수소에 대한 관심은 비화석 연료로부터 수소를 생산하는 과정 중에서 생물학적인 과정 연구를 활발히 진행되도록 하였다. 이제까지 각종 수소생산 system이 개발되어 왔으며 그 중 미생물 및 조류를 이용한 수소생산 과정은 폐기물 처리라는 부수적 이점을 더불어 지남으로써 산업화의 가능성을 증대시키고 있다. 즉, 수소 생성 연구가 이에 해당하는 일환으로 수행되고 있다.

*Clostridium butyricum*은 *Cl. pasterianum*과 더불어 대표적인 butyrate생성 세균으로 혐기적 발효를 통하여 acetate, butyrate 그리고 CO₂와 H₂를 주로 생성한다(3). 대사 산물의 비는 배양조건과 균주에 따라 다르나 전체적인 redox balance 결정은 대사시 과량의 환원물질이 H₂로 제거되는 것으로 이루어진다. *Cl. butyricum*은 기질 이용 범위가 비교적 넓은 균주로 그 혐기적 발효의 potential이 지니는 이점을 이용하여 그 환원형 대사 산물의 연계적 대사를 고

려할 수 있다.

본 연구실에서 분리된 *Rhodopseudomonas sphaeroides*(1,2)는 자연계에 풍부하게 존재하는 유기산을 활발히 이용하며, nitrogenase 활성에 의해 다량의 수소 분자를 생성하는 것으로 알려져 있다. 이 두 균주의 특성으로부터 자연계의 주요 성분인 유기물을 연계적으로 대사시키고 그로부터 수소로 전환되는 이론적인 수율의 증가를 고려할 수 있다. 이러한 가능성을 바탕으로 이제까지 이루어진 발효조건의 개선, 생산성 증대를 시도해 볼 수 있다. 이 중에서 본 연구는 배양조건의 최적화와 혼합 배양계의 구성을 시행하였다. 본 연구의 목적은 두 혐기성 균주의 혼합 배양을 통한 수소 생성의 안정된 반응계 확립과 다양한 기질로부터 수소로의 전환 효율을 증가시키는 데에 있다.

재료 및 방법

Key words: Hydrogen evolution, mixed culture
*Corresponding author

실험균주

본 실험균주로는 *Clostridium butyricum* NCIB 9576과 Bae 등에 의해 분리 동정된 광합성 세균 *Rhodospseudomonas sphaeroides* K-7(1), *Rhodospseudomonas* sp. E15-1(2)을 사용하였다.

배지 및 배양조건

*Cl. butyricum*의 계대 배양에는 PYG 배지(4)를 사용하였으며 광합성 세균과의 혼합 배양 및 단독 배양의 양상 비교를 위한 실험에는 Ormerod 배지(5)를 변형하여 사용하였다(Table 1). 혐기성 세균의 집락을 얻기 위한 roll tube용 배지로는 *Cl. butyricum*의 경우 Brewer anaerobic agar(Difco, B279)를 사용하였으며, 광합성 세균의 경우 1.5% agar를 첨가한 modified Ormerod 배지를 사용하였다. 두 균주의 단독 및 혼합 배양은 50 ml serum bottle을 배양기로 사용하여 10,000~12,000 lux의 광조사하에 혐기적 정지 배양으로 행하였다. 혼합 배양은 집균된 균체량을 기준으로 혼합하였다. 모든 조작은 혐기적 조건하에서 시행하였으며 각 반응기는 수조내 배양으로 일정한 조건을 유지하였다. 배양액을 일정시간 간격으로 일회용 주사기를 통해 시료로써 채취하고 발효 산물을 비롯한 배양액의 조건 분석에 사용하였다.

분석

균체량의 측정에는 흡광도(A_{660}), 건조 균체량(DCW, mg/ml), 균체 단백질 함량 측정 및 생균수 측정 등을 통하여 산출하였다. 기질 이용도는 DNS법과 Anthrone-sulfuric acid 시약(6)으로 당분석을 통하여 산출하였으며, 수소를 비롯한 발효 산물의 분석을 gas chromatography(Shimadzu GC-9A)로 행하였다. 각 분석결과는 3~5회 분석의 평균치로 나타내었다.

결과 및 고찰

광합성 세균에 의한 clostridial metabolites로서의 유기산 이용

Rhodospseudomonas sphaeroides K-7과 *Rhodospseudomonas* sp. E15-1에 의한 clostridial metabolites 중 유기산(acetic acid, butyric acid)의 이용 및 그로부터의 수소 생성을 검토하였다. 단일 기질로써 acetate 또는 butyrate 이용시 수소 생성 및 기질 이용성을 관찰하였다(Table 2). 그 결과 butyrate의 이용능이 E15-1 균주에서는 결여된 것으로 보여지며 acetate로부터의 수소 생성능도 K-7에 비하여 낮은 것으로 나타났다.

*Cl. butyricum*에 의한 유기산의 생성비는 세포내외의 조건에 따라 다양하지만 acetate와 butyrate의 molar ratio가 약 1.5(총 농도 : 25 mM)가 되도록 혼합된 기질로부터 혐기적 발효시 생성되는 수소의

Table 1. Media used for the culture of *Clostridium* and *Rhodospseudomonas*

Basal medium (l)		<i>Clostridium</i> and mixed culture medium	<i>Rhodospseudomonas</i> culture medium
MgSO ₄ ·7H ₂ O ^a	200 mg		
CaCl ₂ ^a	75 mg		
EDTA	11.8 mg		
FeSO ₄ ·7H ₂ O	11.8 mg	Basal medium	Basal medium
H ₃ BO ₃	28 mg	+	+
MnSO ₄ ·2H ₂ O	21 mg	1% glucose ^a	10 mM acetate
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	7.5 mg	(ca. 55.5 mM)	10 mM butyrate
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2.4 mg		
Cu(NO ₃) ₂ ·3H ₂ O	0.4 mg		
Biotin	10 µg	0.5% CaCO ₃ ^a	
p-aminobenzoic acid	200 µg		
Thiamine	1 mg		
K ₂ HPO ₄	10 mM		
KH ₂ PO ₄	10 mM	pH 8.0	pH 6.8
Sodium glutamate	7 mM		

^aseparately sterilized.

Table 2. Hydrogen evolution and utilization of acetate or butyrate as electron donor by *Rhodopseudomonas sphaeroides* K-7 and *Rhodopseudomonas* sp. E15-1

	<i>Rhodopseudomonas</i> sp. E15-1		<i>R. sphaeroides</i> K-7	
	Acetate	Butyrate	Acetate	Butyrate
Biomass (A_{660})	1.70	0.13	1.87	1.16
pH	7.40	6.90	8.21	7.80
Electron donor utilized (%)	82.6	not used	98.2	52.5
Total H ₂ evolved ($\mu\text{l}/\text{mg}$ of DCW)	1077.2	—	1324.5	1633.5

Cells were grown with 30 mM acetate or butyrate at pH 6.8, 33°C under light anaerobic condition. Analysis was carried out after 70 hr incubation. DCW: dry cell weight.

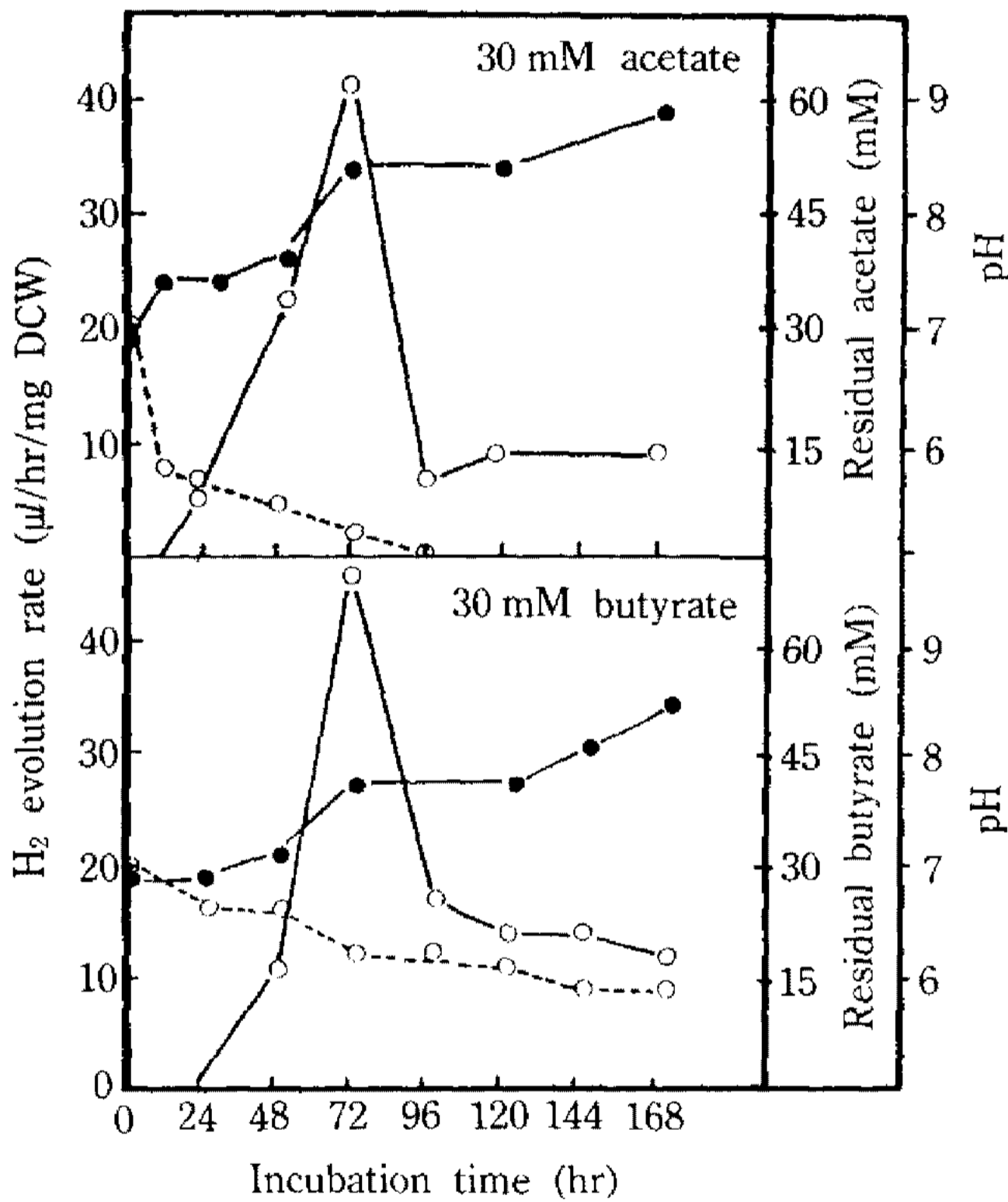


Fig. 1. Hydrogen evolution rate and pH variation during the fermentation by *R. sphaeroides* K-7 with acetate or butyrate as substrate.

○-○: H₂ evolution rate; ●-●: pH; ○-○: residual substrate.

양을 관찰하였다(Fig. 1). 배지의 pH는 발효과정이 진행되는 동안 9.2까지 증가하였으며, K-7 균주에 의한 배양액당 수소 생성량은 E15-1에 비하여 약 2배 가량 많은 것으로 관찰되었다. 따라서 *Cl. butyricum* 과의 혼합 배양을 통한 대사 산물 저해현상의 제거와 수소 생성 수율 증가를 목적으로 하는 혼합 균주로서 *R. sphaeroides*을 선정하였다. K-7 균주가 *Cl. butyricum*의 대사 산물인 유기산을 이용하여 수소를 발생

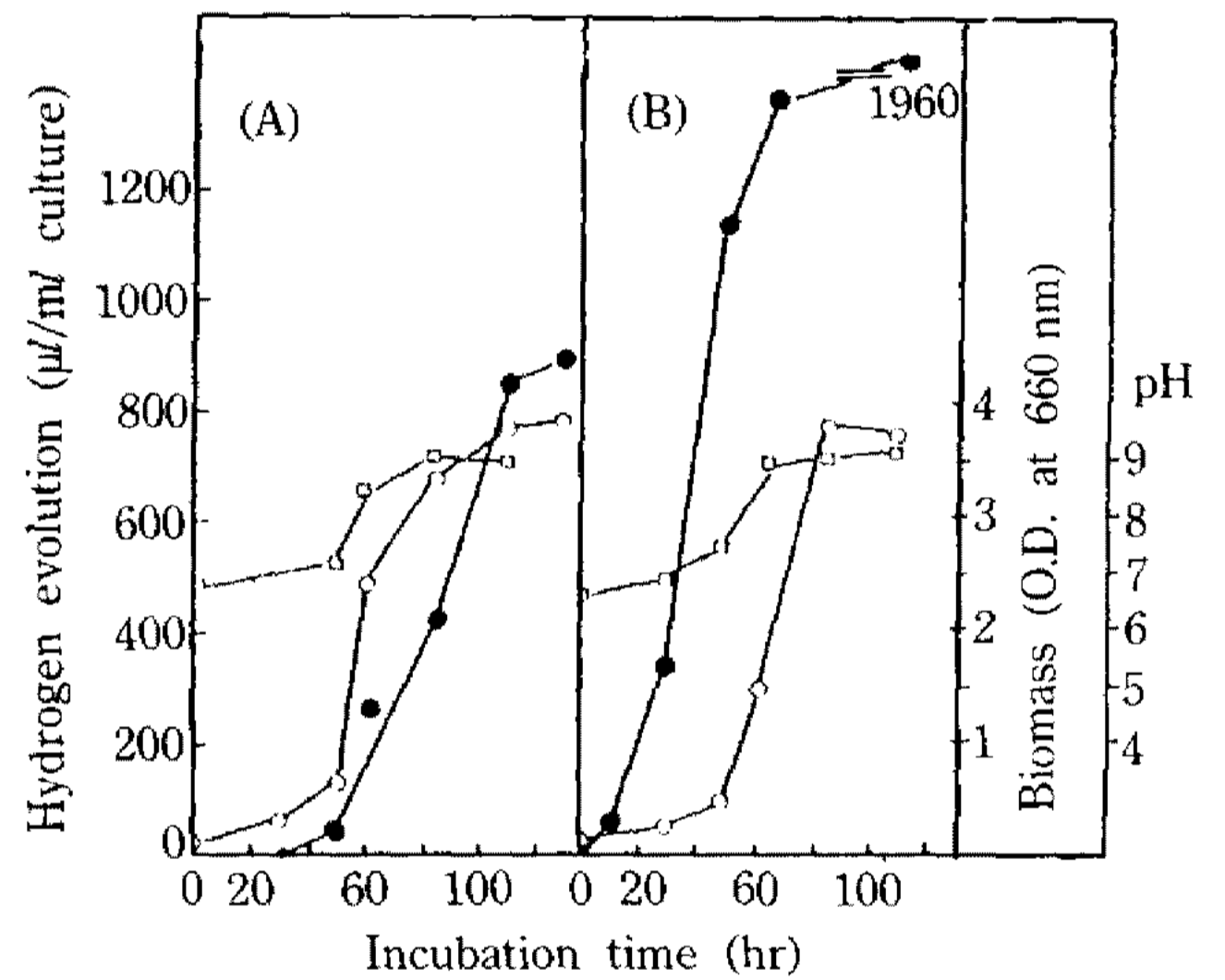


Fig. 2. Hydrogen evolution and utilization of acetate, butyrate (clostridial metabolites) as electron donors by *Rhodopseudomonas* sp. E15-1 (A) and *R. sphaeroides* K-7 (B).

*10 mM acetate and 15 mM butyrate were used as mixed electron donors.

●-●: H₂ evolution; □-□: pH; ○-○: biomass.

시키는 속도와 pH 변화를 Fig. 2에 나타내었다. *R. sphaeroides*는 당을 기질로 이용할 경우 유도기를 필요로 하여 증식 지체를 나타내므로, 혼합 배양시 acetate와 butyrate를 이용한 전배양을 통해 세포를 inoculum으로 사용하여 경쟁적인 기질 소비를 억제하고자 하였다.

혼합 배양을 통한 포도당 발효 양상의 비교

일차적으로 기질 이용성, 발효 산물로써의 수소 및 유기산 생성에 기초하여 선정된 *Cl. butyricum* NCIB 9756의 단독 배양 및 *R. sphaeroides* K-7과의 혼합 배양시 관찰되는 대사 전이 양상을 Fig. 3에 나타내

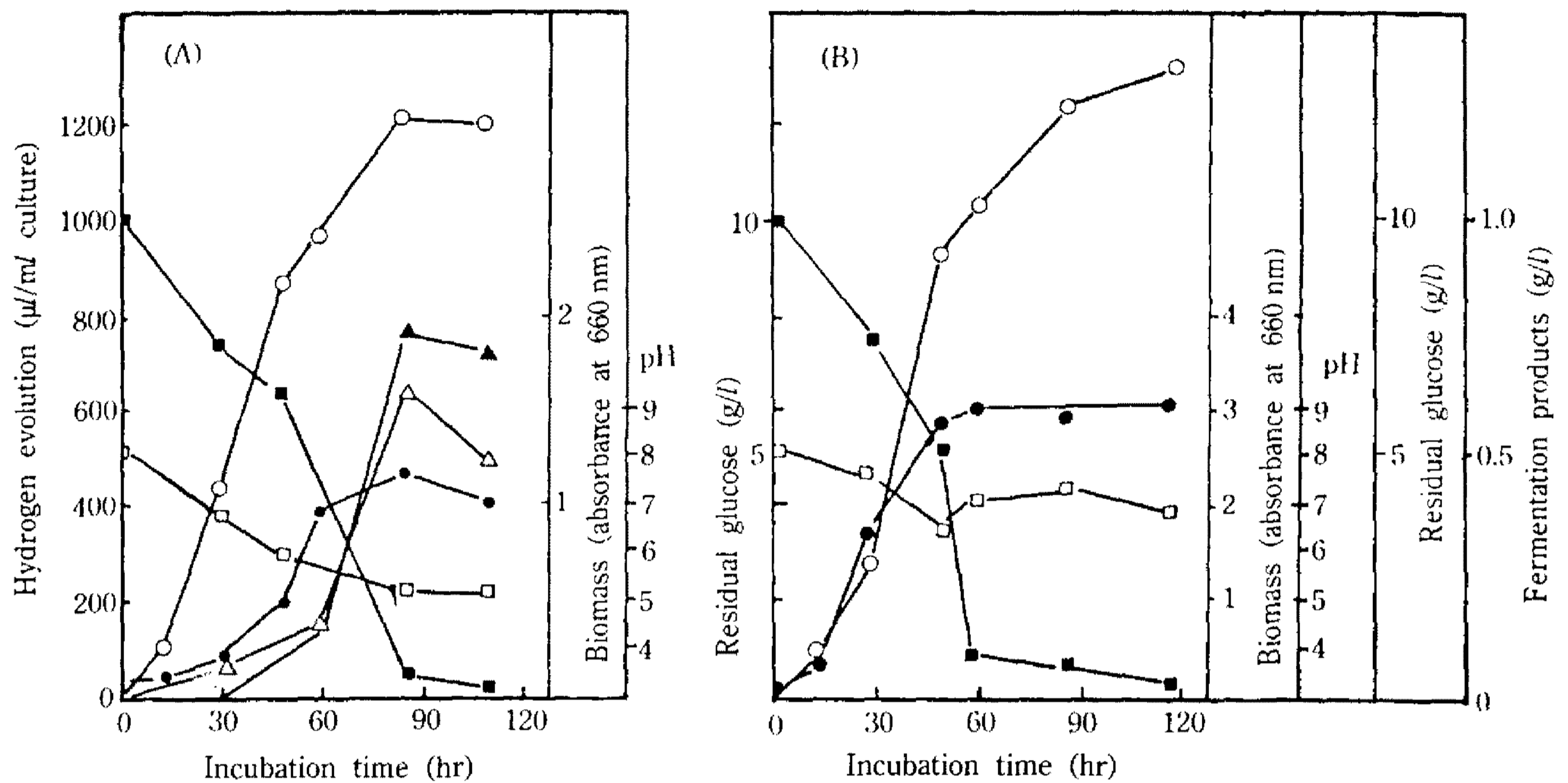


Fig. 3. Monoculture and mixed culture of *Clostridium butyricum* NCIB 9576 with *Rhodopseudomonas sphaeroides* K-7 in Modified Ormerod's medium containing 1% glucose (w/v).

Time course of hydrogen evolution (-○-), pH change (-□-), glucose consumption (-■-) and acid formation (-△-, acetate; -▲-, butyrate) by monoculture of *Cl. butyricum* (A), mixed culture of *Cl. butyricum* and *R. sphaeroides* K-7.

Table 3. Comparison of mono- and mixed cultures of *Clostridium butyricum* NCIB 9576 with *Rhodopseudomonas sphaeroides* K-7

	Monoculture (A)		Mixed culture (B)	
	<i>Cl. butyricum</i>		<i>Cl. butyricum</i> + <i>R. sphaeroides</i> K-7	
Relative H ₂ evolution(%)	100		135	
pH	5.0		6.3	
Biomass (A ₆₆₀)	1.0		2.8	
Soluble products (mg/l)				
acetate	480		ND*	
butyrate	720		ND*	
Residual glucose (g/l)	0.2		0.16	

ND* : not detected.

Biomass, pH and fermentation products were determined after 108 hr incubation.

었다. 일정시간 배양 후 두 배양조건을 비교한 결과 (Table 3), *Cl. butyricum*이 부산물로 생성한 유기산이 *R. sphaeroides* K-7에 의하여 60시간 이내에 전량 소모되어 동일 조건하에서 검출되지 않았음을 알 수 있다. 또한 두 균주의 혼합시 증식률이 증가하며 유도기가 단축되는 것을 관찰 할 수 있다. 따라서 혼합 배양시 광합성 세균이 활발하게 증식하여 *Cl. butyricum*이 생성하는 유기산을 이용함으로써 증가할 수 있는 이론적인 수율을 산출해 볼 수가 있다. 즉 혼합

배양시 A/B ratio가 1일 때 4.5배, 0.8일 때 약 6.4배의 수소 분자가 생성된다.

발효 부산물로서 수소의 생성 수율을 극대화하기 위한 발효조건 중 균체의 영향을 알아보기 위하여 두 균주의 혼합 비율과 혼합 시기, 혼합 균주의 총 세포농도가 수소 생성에 미치는 영향을 조사하였다. Fig. 4는 혼합 배양시 두 균주의 순차적인 접종에 의한 영향을 관찰하기 위하여 세포의 비율을 1:1로 고정하고 광합성 세균의 접종시기를 변화시키면서 수소

생성량을 측정된 결과이다. 결과적으로 *Cl. butyricum*의 대수 증식기에 광합성 세균을 배지에 첨가하는

경우 총 수소 생성량이 최대치를 나타내었다. 이는 급격한 pH 감소 초기와 광합성 세균의 증식이 활발해지는 시기를 일치시킴으로써 두 균주의 연계적 증식이 가능하고 경쟁적 기질 소모를 억제하여 안정된 혼합 배양계를 확립할 수 있음을 보여준다.

두 균주가 초기 배양액 내에 다른 비율로 존재하여

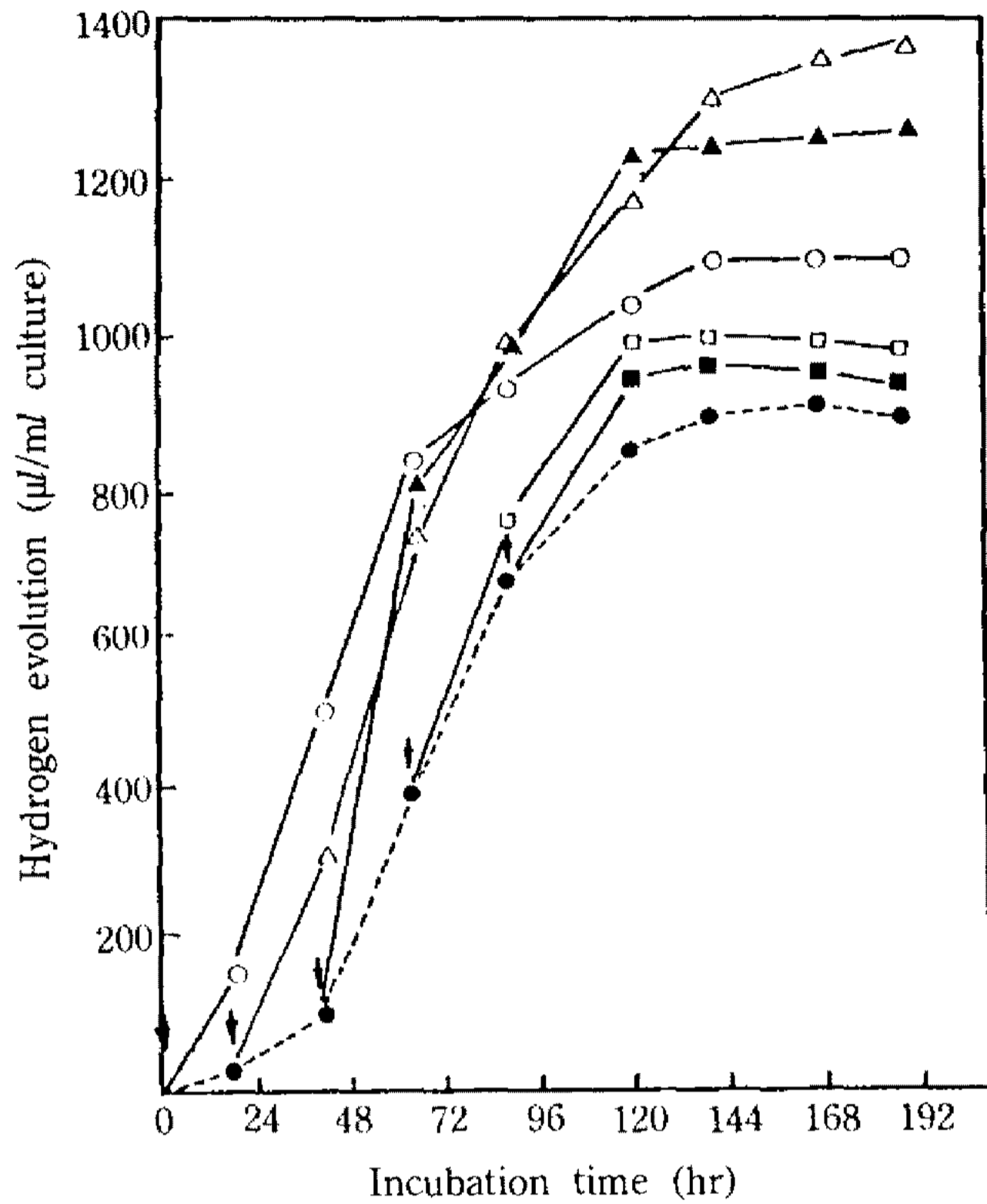


Fig. 4. Effects of mixing time of partner strain (*Rhodospseudomonas sphaeroides* K-7) on the hydrogen evolution in mixed culture.

Symbol ↓ Indicates inoculation of *R. sphaeroides* K-7.

- : not mixed with partner strain.
- : mixed at 0 hr & incubated
- △-△: mixed at 18 hr & incubated
- ▲-▲: mixed at 40 hr & incubated
- : mixed at 62 hr & incubated
- : mixed at 87 hr & incubated

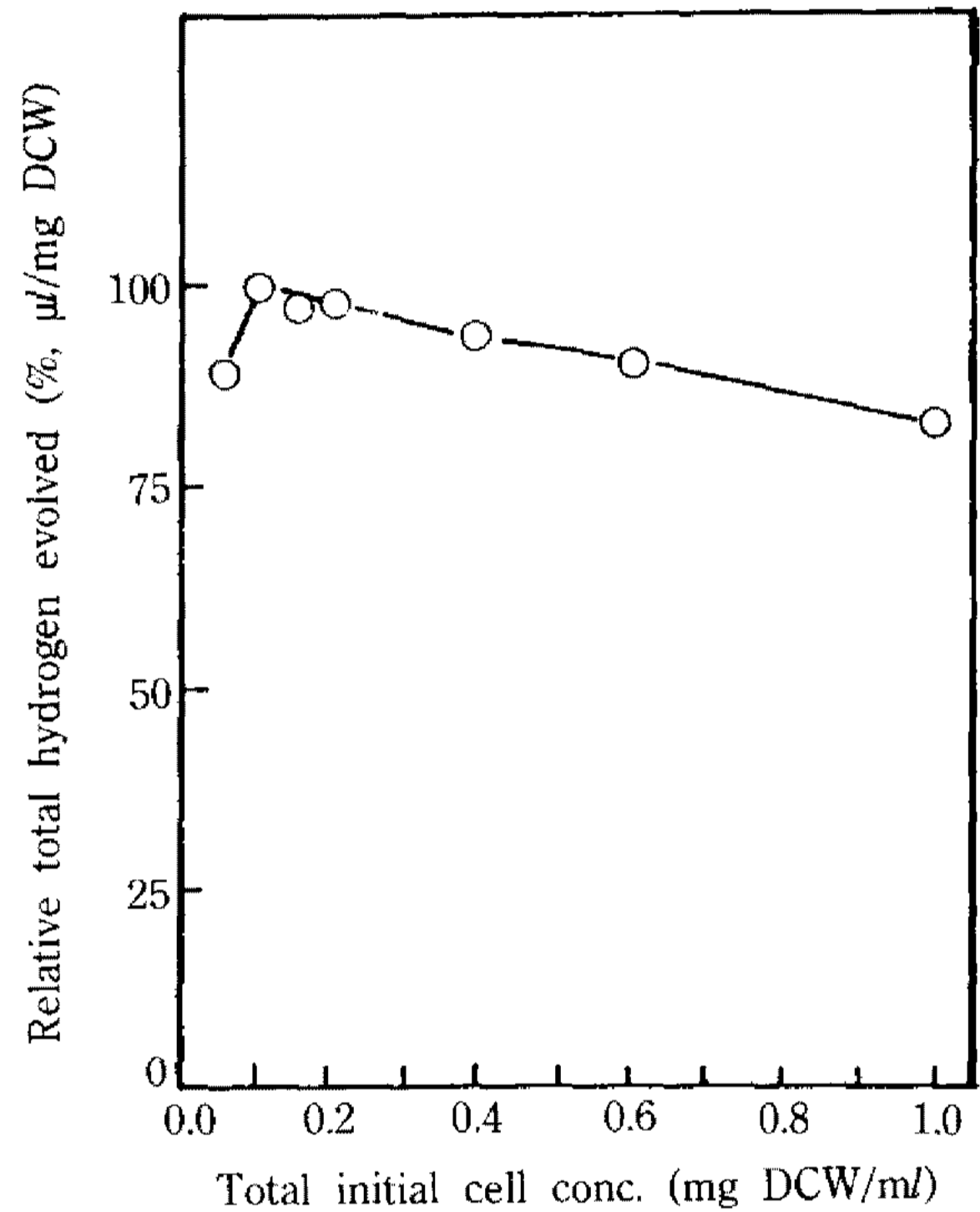


Fig. 5. Effect of inoculum level in mixed culture on H₂ evolution by *Cl. butyricum* NCIB 9576 and *Rhodospseudomonas sphaeroides* K-7.

Mixing ratio of two strains was 1 to 6. H₂ was determined after 72 hr incubation (1% glucose was used as substrate).

Table 4. Effect of cell ratio in mixed culture on hydrogen evolution

Mixed ratio of cell mass		H ₂ evolved (mmol/ml of culture)	Growth (g/l)	Glucose consumed (%)
<i>Cl. butyricum</i> :	<i>R. sphaeroides</i>			
1 :	0	31.9	0.87	98.7
6 :	1	33.4	0.80	94.6
4 :	1	37.0	0.77	97.0
1 :	1	43.0	1.24	75.3
1 :	4	44.6	1.22	60.4
1 :	6	45.3	1.16	60.2
0 :	1	40.4	1.23	51.4

^adetermined with protein analysis.

Initial total cell concentration was 0.12 mg/ml in the same condition.

Hydrogen evolved and growth were determined after 120 hr incubation

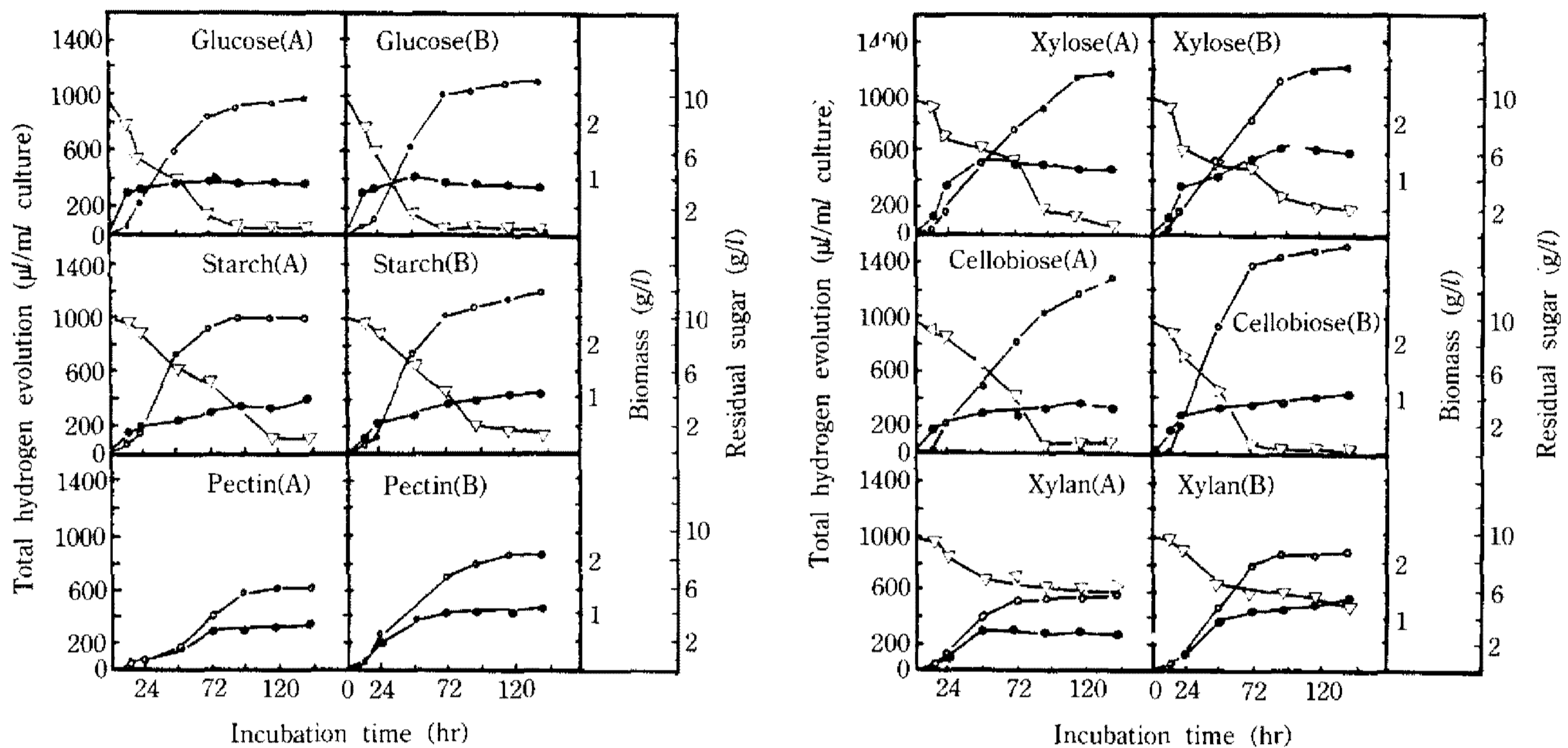


Fig. 6. Comparisons of sugar metabolism in *Clostridium butyricum* monoculture and mixed culture with *Rhodospseudomonas sphaeroides* K-7.

Time course of hydrogen evolution, sugar consumption and growth were shown. The experiments performed in 50 ml serum bottle that contained 10 ml minimal medium with 1% substrate and which were incubated in water bath under illumination (10,000~12,000 lux, 32~34°C).

A: monoculture, B: mixed culture with *R. sphaeroides* K-7. ○-○: total hydrogen evolved; ●-●: growth; △-△: residual substrate.

수소 생성량에 미치는 영향을 조사하기 위하여 총 세포농도를 고정하고(DCW, 0.12 mg/ml), 다양한 비율로 혼합된 세포를 동일한 조건하에서 배양하였다 (Table 4). 그 결과 *Cl. butyricum*과 *R. sphaeroides* K-7이 1:6일 때 최대 수소 생성량을 나타내었으며, 이는 중간 특이적인 catabolic enzyme의 조절과 활성의 특이성에 의하여 최종 산물로 생성되는 수소의 양이 변화된다는 사실로 설명된다. 따라서 성공적인 발효, 즉 목적하는 산물의 생성 수율을 극대화하기 위하여 혼합 균주의 초기 비율도 고려되어야 함을 나타낸다.

Fig. 5에서는 최적 혼합 비율로 나타난 1:6(*Cl. butyricum* : *R. sphaeroides*)의 비율로 혼합비를 고정하고 총 세포농도가 수소 생성량에 미치는 영향을 관찰하였다. 세포농도가 증가할수록 유도기가 단축되는 것은 Gomez의 결과(7)와 일치하며, 이는 접종 세포농도가 증식률과 발효산물의 수율에 영향을 미친다는 사실을 나타내고 있다.

본 실험의 주 목적은 biomass 구성 성분의 효율적 이용과 그로부터의 수소 생성에 있으므로 biomass의 주성분과 그로부터의 몇 가지 발효산물을 대상으로 혼합 배양에 의한 수소 생성을 경시적으로 관찰하였다

(Fig. 6). 동일한 배양 조건하에서 단독시 보다 혼합 배양시 약 20%에서 75%까지 총 수소 생성량의 증가를 나타내었다. 이는 이론적 수율에는 이르지 못하지만 각 기질에 대한 전환효율이 혼합 배양을 통하여 증가함을 알 수 있다.

요 약

수소 생성능이 있는 *Clostridium butyricum*과 이 균주의 대사산물을 이용하여 수소를 생성할 수 있는 광합성 세균의 혼합 배양에 의하여 수소 생성을 할 수 있는 양 균주의 혼합 배양 동력학적 연구를 수행하였다.

혐기성 Clostridia의 발효에서 생성되는 아세트산염과 부티르산염은 *Rhodospseudomonas sphaeroides*에 의해 이용되어 수소를 생성하게 되었고, 이들 양 균주를 혼합 배양한 결과 수소 생성을 저해하는 아세트산염과 부티르산염의 배지내 농도는 점차 감소하였다.

이들 두 균주의 혼합 배양에서의 균체의 혼합 비율, 혼합 시기, 접종량을 조사함으로써 단독 배양시와 비교하면서 최적 조건을 조사하였고, 혼합시 균체량의

비율 *Clostridium*속 세균 1부에 대하여 *Rhodopseudomonas*속 세균 6부의 비율로 혼합할 수 있음을 확인하였다.

감사의 말

본 연구는 1989년도 한국과학재단 목적기초연구비와 한국에너지 관리공단 1991년도 연구개발비 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 대하여 깊은 감사의 뜻을 표합니다.

참고문헌

1. Bae, M. and J.K. Lee. 1983. A study on physiological condition for hydrogen evolution by *Rhodopseudomonas sphaeroides* K-7. *Kor. J. Microbiol.* **21**(3): 109-114.
2. Bae, M. and S.H. Park. 1989. Hydrogen production by the immobilized cells of *Rhodopseudomonas* sp. E15-1. *Kor. J. Microbiol. Bioeng.* **17**(1): 74-80.
3. Bae, M. and H.J. Yi. 1990. Hydrogen evolution from biomass-derived carbohydrates by *Clostridia*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.* **18**(1): 6-11.
4. Molongoski, J.H. and M.J. Klug. 1976. Characterization of anaerobic heterotrophic bacteria isolated from fresh water sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* **31**(1): 83-90.
5. Ormerod, J.G. and H. Gest. 1961. Light-dependent utilization on organic compound and photoproduction of molecular hydrogen by photosynthetic bacteria. *Arch. Biochem. Biophys.* **94**: 449-463.
6. Koehler, L.H. 1952. Differentiation of carbohydrates by anthrone reaction rate and color intensity. *Anal. Chem.* **24**(10): 1576-1579.
7. Gomez, J. and Goma, G. 1986. Effect of different inoculum levels of heterogeneous mixed culture in acidogenic fermentation. *Biotechnol. Lett.* **8**(11): 833-836.

(Received April 9, 1992)