

## *Rhodopseudomonas sphaeroides*에 의한 수소 생산 -Glucose 및 유기산의 영향-

김미선\* · 문광웅 · 이상근 · 김선창<sup>1</sup>

한국에너지기술연구소 대체에너지 연구부 바이오매스연구팀

<sup>1</sup>한국과학기술원 생물과학과

**Production of Hydrogen from Glucose by *Rhodopseudomonas sphaeroides*. Kim, Mi-Sun\*, Kwang-Woong Moon, Sang-Keun Lee, and Sun-Chang Kim<sup>1</sup>.** Korea Institute of Energy Research, 71-2 Jang-Dong, Yusung-Ku, Taejeon 305-345, Korea, <sup>1</sup>Korea Advanced Institute of Science and Technology, 373-1 Kusung-Dong, Yusung-Ku, Taejeon 305-345, Korea - *Rhodopseudomonas sphaeroides* K7 and E15-1 produced hydrogen from glucose rapidly for the first 24 hrs of culture under the anaerobic and photosynthetic conditions and then ceased the hydrogen production because of the accumulation of organic acids such as acetic acid and formic acid in the culture broth, decreasing the pH to 4.2-4.5. Only 43% and 73% of glucose in the culture were consumed even after 6 days of incubation by *R. sphaeroides* K7 and E15-1, respectively. The hydrogen production and glucose consumption, however, were substantially increased when the pH of the culture was adjusted to 6.8-7.0: Hydrogen production continues even after 10 days of culture and glucose was consumed completely after 2.5 and 4.5 days by *R. sphaeroides* K7 and E15-1, respectively. Furthermore, the bacteriochlorophyll contents in *R. sphaeroides* K7 and E15-1 were increased by 44 and 9 folds and the cell concentrations by 10 and 2.5 folds, respectively, after 7 days of culture. *R. sphaeroides* K7 and E15-1 also produced hydrogen from acetic, lactic, butyric and malic acids under the anaerobic and photosynthetic conditions even though the amounts of hydrogen produced were lower than that from glucose. The results of this experiment indicate that under the anaerobic and synthetic conditions, *R. sphaeroides* K7 and E15-1 might use the NADH oxidation mediated by ferredoxin and hydrogenase to evolve hydrogen from glucose for the first 24 hrs and then the organic acids produced were used as electron donors for the production of hydrogen in the nitrogen-limited condition.

**Key words:** biological hydrogen, *Rhodopseudomonas*, organic acids

1970년대의 에너지 위기 및 1990년대의 지구 온난화 현상에 대처할 수 있는 미래 청정 에너지의 개발에 대한 연구는 오래 전부터 관심을 끌고 있었다. 수소는 연료로써의 우수한 특성 뿐만 아니라 연소 후 CO<sub>2</sub> 및 SO<sub>x</sub>, NO<sub>x</sub> 등 지구 온난화 가스를 발생하지 않는 청정 연료로 각광을 받고 있다. 바이오매스 자원으로부터 생물학적인 방법으로 수소를 생산하는 기술은 환경처리 및 신 연료 기술로 높이 평가되어 일본 신에너지 산업기술 종합개발 기구(NEDO)의 환경 조화형 수소 기술 연구를 비롯한 선진 각국의 연구가 활발히 진행되고 있다[1, 12, 20, 22].

수소를 생산할 수 있는 미생물은 크게 광합성 세균 [10], 혐기성세균[5, 9], 조류[3] 등으로 구분되며, 이들의 수소 생성 기작, 사용가능 기질 및 수소 발생량은 상당한 차이가 있다. 광합성 세균 중 purple non-sulfur bacteria는 장파장의 빛을 이용하며 유기산을 전자 공여

체(환원제)로 하여, 혐기 조건에서 수소 생산이 우수하기 때문에 최근 많은 연구의 초점이 되고, 또한 하천 슬러지, molasses, 제당공장 폐수, 농산 폐기물 등의 바이오매스 자원으로부터 수소를 생산할 수 있어서 환경 처리를 겸한 연구가 활발히 진행되고 있다[4, 18, 19]. Purple non-sulfur bacteria 중에서도 *Rhodopseudomonas* 속의 광합성 세균은 자체의 bacteriochlorophyll(BChl)이 장파장의 빛을 받아 전자 전달 기작에 의해 질소 고정화를 한다. 질소고정화에 관여하는 최종 효소는 nitrogenase 이며, N<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 등의 질소원이 존재하지 않을 때는 H<sup>+</sup>을 H<sub>2</sub>로 환원하여 수소 가스를 발생한다[23]. 또한 *Rhodopseudomonas*의 배양은 대사적인 다양성을 나타내어 호지적 및 혐기적 암조건에서도 모두 성장할 수 있고, 또한 광합성을 할 수 있는 동시에 발효에 의해서도 배양이 가능하다고 알려져 있다. 이러한 다양성 때문에 기질의 이용 효율에 차이는 있지만 단당류, 이당류 및 각종 유기산을 모두 배양기질로 사용할 수 있다[14].

본 연구에서는 *Rhodopseudomonas* 속의 광합성 세균이

\*Corresponding author  
Tel. 82-42-860-3554, Fax. 82-42-860-3132  
E-mail: bmmskim@sun330.kier.re.kr

각종 유기산 및 glucose를 탄소원으로 이용하여 혐기 및 질소 제한 조건에서 생산하는 수소 발생을 관찰하고, 배양중 광합성 세균의 BChl 함량 변화 및 균체 표백 현상을 연구하였다. 본 연구는 또한 유기성 폐수 및 폐자원과 같은 복합기질로부터 최대의 수소 생산과 최적 균주 배양 조건 확립을 목적으로 하였다.

## 재료 및 방법

### 균주

*R. sphaeroides* K7과 E15-1은 이화여대 생물학과 배무박사 연구팀에서 분리한 균주를 분양받아 본 실험에 사용하였다[2].

### 배지 및 배양조건

사용된 배지는 modified Ormerod 배지[15]이며, 탄소원으로 첨가된 유기산(acetic, propionic, butyric, lactic, malic acids) 및 glucose는 30 mM을 멸균 후 따로 첨가하였다. 40 ml의 배지를 포함하는 50 ml 용량 serum 병에서 약 3-4일간 중 배양한 배양액을 원심분리하여 균체를 회수하고, 본 배양시 660 nm에서 흡광도가 0.1이 되도록 균을 첨가하였다. 중 배양에 사용된 serum 병은 고무마개와 알루미늄 덮개로 밀폐하였으며, 본 배양에서는 1 l 배양액을 약 1.5 l 용량 아크릴 반응기에 넣어 실리콘마개로 밀폐한 후, 아르곤 가스를 흘려서 혐기 조건을 만들었다. 중 배양은 백열등 5,000 lux를 조사하면서 30°C에서 정지 배양하였고, 24시간마다 균체와 배양액이 잘 섞이도록 흔들어주었다. 본 배양은 Fig. 1과 같이 30°C에서 백열등 10,000 lux 이상을 조사하면서 120 rpm으로 교반 배양하였다. pH 조절이 필요한 실험에서는 멸균된 2 N NaOH를 사용하여 pH 6.8-7.0을 유지하였다.

### 수소가스분석

배양 중 발생하는 전체 가스는 acetic acid buffer(pH 3)를 담은 삼각 플라스크에 포집하였으며(Fig. 1), 수소 함량은 발효조내 head space 가스를 gas-tight microsyringe로 100  $\mu$ l 채취하여 gas chromatography(Shimadzu 14-B)로 분석하였다. 사용된 column은 300 mm $\times$ 2 mm(길이 $\times$ 지름) glass로 molecular sieve 5A(Supelco Inc.)를 충전물질로 사용했으며, thermal conductivity detector(TCD)로 분석하였다. 발생가스 중 수소 가스 정량을 위한 GC의 조건은 column 온도 80°C, injector 온도 100°C, detector 온도 120°C이었으며, carrier 가스는 아르곤으로 flow rate 35 ml/min로 유지하였다.

### 유기산 분석

Acetic acid 분해 및 발효산물은 발효액을 일정시간 간

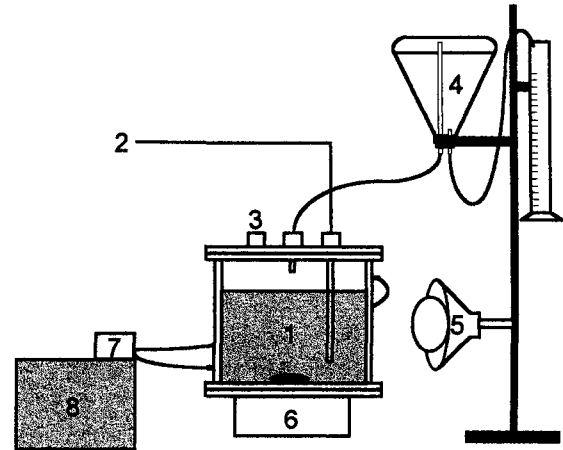


Fig. 1. Schematic diagram of the experimental apparatus for the hydrogen production.

1, 1.5 l reactor with a water jacket; 2, liquid sampling port; 3, gas sampling port; 4, gas collector; 5, incandescent lamp; 6, magnetic stirrer; 7, water circulating pump and temperature controller; 8, water bath.

격으로 채취하여, 균체와 상등액을 분리한 후 상등액 400  $\mu$ l을 5 N HCl 50  $\mu$ l로 산성화 한 후, internal standard 물질로 1% 1-propanol 40  $\mu$ l를 첨가하였다. Porapak QS(Supelco Inc.)를 충전 물질로 하는 300 mm $\times$ 2 mm(길이 $\times$ 지름) column을 이용해서 gas chromatography(Shimadzu 14-B)를 flame ionized detector(FID)와 연결하여 분석하였다. 분석조건은 column 온도 230°C, injector 온도 220°C, detector 온도 220°C이며, carrier gas는 질소를 flow rate 50 ml/min로 사용하였다.

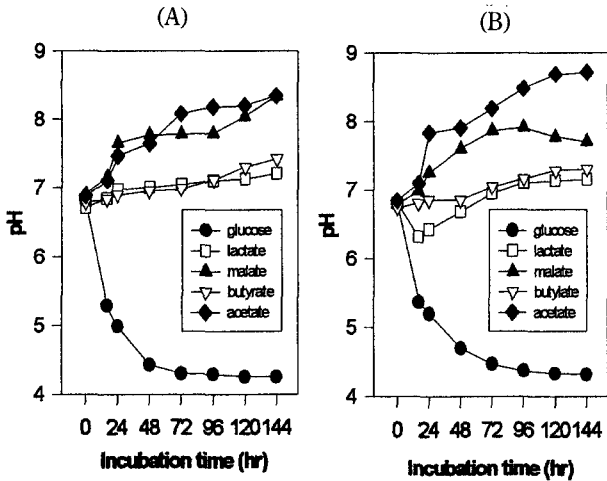
Malic 및 lactic acids 분해는 HPLC Beckmann Gold System에 유기산 분석용 column인 Aminex HPX-87H(Biorad), 300 mm $\times$ 7.8 mm(길이 $\times$ 지름)를 장착하여 실온에서 측정하였다. 각종 유기산 peak는 UV detector를 이용하여, 파장 210 nm에서 측정하였으며, 20  $\mu$ l 배양 상등액을 0.01 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>을 mobile phase로 하여 flow rate 0.6 ml/min로 용출하였다.

### 기타 분석

배양액 중의 glucose 농도는 dinitrosulfuric acid(DNS) 방법[11]으로 정량하였다. 배양액의 pH는 pH meter(Orion, model 420A)로 실온에서 측정하였다. 균체농도 및 BChl 함량은 일정 시간 간격으로 채취한 발효액을 UV-visible spectrophotometer(Hewlett Packard, 8452A Diode Array Spectrophotometer)로 파장 660 nm 및 파장 810 nm에서 각각 측정하였다[21].

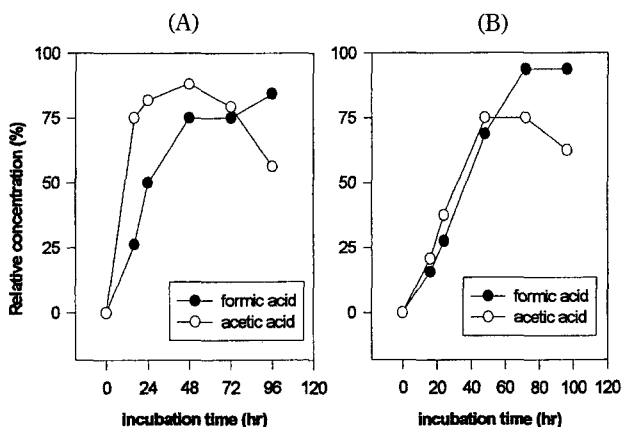
## 결과 및 고찰

### pH 변화 및 유기산 생성

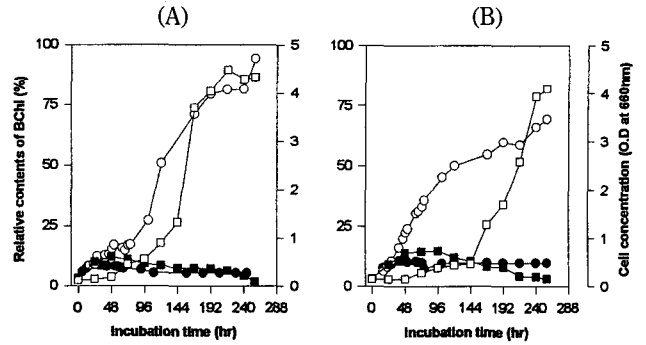


**Fig. 2.** pH profiles of *R. sphaeroides* K7(A) and E15-1(B) culture during the incubation with various carbon sources. Cultures were grown in a 1.5 l reactor containing 1 l Ormerod medium anaerobically at 10,000 lux illumination.

광합성 purple non-sulfur 박테리아인 *R. sphaeroides* K7 및 E15-1의 배양은 glucose를 기질로하고, pH 조절이 되지 않은 혐기 광합성 배양조건에서, 배양 16-24시간 후 배양액의 pH가 5 이하로 강하하였다(Fig. 2). 배양액의 유기산을 정량한 결과 각종 유기산 및 유기용매가 축적되었고 이중 특히 acetic acid 및 formic acid가 주로 축적 되었다(Fig. 3). 이러한 유기산의 축적은 배양액의 pH를 낮추어, *R. sphaeroides* K7 및 E15-1의 균체 성장과 BChl의 합성을 방해 하였다(Fig. 4). *R. sphaeroides* K7과 E15-1 균주사이에는 배양 중 큰 pH 변화 차이를 보이지 않았으나, 배양 초기(24시간)에 *R. sphaeroides* K7 균주에 의한 acetic acid 및 formic acid의 축적이 *R. sphaeroides* E15-1 보다 2배 가량 더 많았다. 이와 같은



**Fig. 3.** Production of formic and acetic acids by *R. sphaeroides* K7(A) and E15-1(B) using glucose as a carbon source. Cultures were grown in a 1.5 l reactor containing 1 l Ormerod medium anaerobically at 10,000 lux illumination.



**Fig. 4.** Changes of bacteriochlorophyll (BChl) contents and cell growth of *R. sphaeroides* K7 (A) and E15-1 (B) under the anaerobic/photosynthetic condition with glucose as a carbon source. ● : BChl, pH not controlled; ○ : BChl, pH controlled, ■ : cell, pH not controlled; □ : cell, pH controlled. Cultures were grown in a 1.5 l reactor containing 1 l Ormerod medium anaerobically at 10,000 lux illumination.

유기산 생성율의 차이는 배양액의 pH에 직접적으로 영향을 주어서 24시간 후 *R. sphaeroides* K7 배양액의 pH가 4.8인 반면 *R. sphaeroides* E15-1은 5.2로 나타났다. pH 저하에 의한 균체 성장 저해 현상 및 표백현상을 방지하기 위하여 본 실험에서는 동일한 배양조건에서 배양액 pH를 6.8-7.2로 유지한 결과, 균체의 성장과 BChl의 농도가 *R. sphaeroides* K7 및 E15-1 모두 배양시간 경과에 따라 계속 증가하였다(Fig. 4). *R. sphaeroides* K-7의 경우, 균체의 성장은 배양 48시간 후 pH를 조절하지 않았을 때에 비하여 약 3배의 증가를, *R. sphaeroides* E15-1은 약 2배의 증가를 보였다. 균체 증식에 대한 pH 조절 효과는 시간이 경과함에 따라 더욱 현저하여 두 균주 모두 배양 10일 이후는 약 10배 이상의 증가를 나타내었다. 실질적으로 pH 조절을 하지 않은 경우, 두 균주 모두 배양 48-96시간 이후 부터는 pH의 저하에 의해서 균체의 증식이 거의 일어나지 않았다. 배양중 pH의 중성 유지는 또한 BChl의 합성에도 균체의 증식과 유사한 효과를 나타내었다(Fig. 4). 즉, *R. sphaeroides* K-7은 배양 72시간 이후 균체의 증식과 비례하여 BChl의 농도가 증가하여 약 10일 까지 계속되었으며, pH를 조절하지 않았을 때의 최대치보다 약 2.5배가 증가하였다. 최근 Tramm-Werner 등[21]에 의해서도 태양광, 백열등, 텅스텐등을 이용할 경우 glucose로부터 *R. capsulata*에 의한 유기산 축적 및 이에 따른 균체 표백 현상이 배양 10시간 후부터 나타났고 red-filter를 사용하여 파장 500 nm 이하의 빛을 차단하였을 때, formic acid의 축적 완화로 균체 표백현상을 방지할 수 있다고 보고되었다.

Glucose를 기질로 사용하고 pH를 조절하지 않은 배양의 경우, 이미 균체의 성장과 함께 생성되었던 BChl이 분해되어 배양 3-4일째부터 두 균주 모두 표백 현상을 나타

내었다. 이와 같은 현상은 아직 그 정확한 원인이 밝혀지지 않았지만 단파장의 광원을 차단하고[21], pH를 중성으로 유지할 경우 위와 같은 현상을 방지할수 있었다. Glucose 및 유사한 당을 포함하는 실질 폐수로 부터 광합성 박테리아에 의한 수소생산은 대부분 pH 조절없이, 자연광이나 형광등, 할로겐광과 같은 단파장의 광원을 포함하는 광선을 이용하게 되는데, 이때 균체 표백현상을 방지하기 위하여 단파장 빛의 차단은 고려되어야 할 중요한 배양조건으로 여겨진다. Purple non-sulfur 박테리아는 대부분 800-825 nm에서 그 고유의 흡수 파장을 나타낸다고 보고되고 있으며, 본 실험에 사용된 *R. sphaeroides* K7 및 E15-1은 810 nm에서 BChl의 흡수 파장을 측정하였다.

동일한 배양 조건에서 *R. sphaeroides* K7 및 E15-1이 유기산(lactic, malic, butyric, acetic acid)을 이용할 때 배양액은 배양 6일 동안 중성 및 약 알칼리성으로 계속 유지되었다(Fig. 2). 또한 BChl의 탈색에 의한 배양액의 표백현상은 관찰되지 않았다.

**기질 이용**

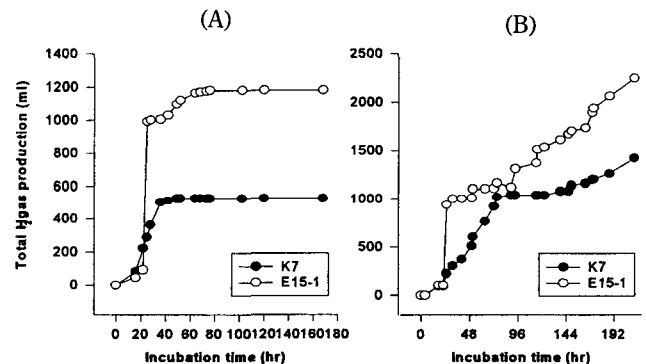
*R. sphaeroides* K7 및 E15-1에 의한 각종 유기산 및 glucose의 이용은 pH를 조절하지 않을 경우, 혐기 광합성 조건에서 유기산이 glucose에 비해 쉽게 이용되었으며, 유기산 중에서 malic acid가 가장 잘 이용되어 배양 3일만에 완전히 소비되었다(Table 1). Lactic acid는 치즈 및 유가공업체에서 배출되는 폐수에 다량 함유된 기질로서, 광합성 박테리아를 이용한 수소 생산에 가장 널리 연구되는 유기산이다[6, 20]. *R. sphaeroides* E15-1은 30 mM lactic acid를 5일 만에 모두 이용하였지만, K-7은 같은 배양기간 동안 약 67%만을 이용하였다. Acetic acid도 각각 *R. sphaeroides* K7과 E15-1 균주에 의해 6일 동안에 각각 약 83% 및 75%가 이용된 반면, propionic acid는 이 두균주에 의해서 이용되지 않았다.

Glucose는 배양 6일 동안에 약 43% 및 74%가 각각 *R. sphaeroides* K7과 E15-1에 의해 이용되었다. 이와 같

은 glucose의 지연된 이용은 24시간 이후 배양액의 pH가 4.8-5.2로 강하하여 균체가 성장하지 못했기 때문이라고 분석된다. 같은 배양조건에서 pH를 중성으로 유지하는 경우 *R. sphaeroides* K7 및 E15-1은 각각 2.5일과 4.5일 동안에 glucose를 모두 이용하였다.

**수소 생산**

*R. sphaeroides* E15-1은 혐기 광합성 배양 중 glucose를 이용한 초기 24시간 동안의 수소 생산이 1000 ml/day/l-배양액이고, 이때 기질 이용율은 13.3%이었다. 반면 acetic acid는 같은 실험 조건에서 배양 24시간 후 약 45-60 ml를 생산하였으며, malic acid, 및 lactic acid는 수소 생산이 거의 일어나지 않았다(Fig. 6). 총 수소 생산량을 비교해 보면 glucose는 pH를 조절 하지 않은 경우 배양 24시간 후에 최대 생산을 보이고 그후는 더 이상 증가되지 않았으며, pH를 조절할 경우 배양 10일 후에 2,500 ml/l-배양액까지 생산할수 있었다. 30 mM lactic acid를 기질로 이용할때 *R. sphaeroides* K7 및 E15-1 모두 배양 1일은 초기 수소생산이 없었으나, 그후 8일간 계속적으로 증가되어서 총 생산량은 glucose 이용시와 거

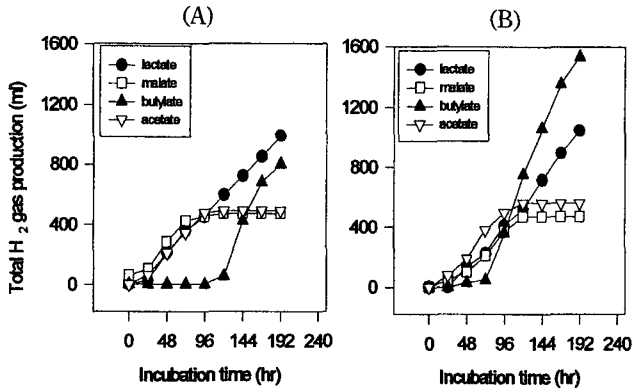


**Fig. 5. Hydrogen gas production of *R. sphaeroides* K7 and E15-1 with glucose as a carbon source**  
 A) pH not controlled; B) pH controlled.  
 Cultures were grown in a 1.5 l reactor containing 1 l Ormerod medium anaerobically at 10,000 lux illumination.

**Table 1. Degradation of various carbon sources by *R. sphaeroides* K7 and E15-1**

Incubation (days)	Degradation rate (%)							
	<i>R. sphaeroides</i> K7				<i>R. sphaeroides</i> E15-1			
	glucose	malate	lactate	acetate	glucose	malate	lactate	acetate
1	16.5	51.5	19.1	7.41	13.3	33.2	13.1	4.6
2	36.5	88.8	27.5	14.4	52.0	95.6	16.9	20.0
3	38.9	99.7	47.5	37.2	66.3	99.8	62.8	35.6
4	40.8	100	58.5	52.6	70.4	100	85.9	66.0
5	42.1	100	69.2	63.7	73.3	100	100	79.2
6	42.7	100	86.1	74.9	73.5	100	100	82.7

Cultures were grown in a 1.5 l reactor containing 1 l Ormerod medium anaerobically at 10,000 lux illumination without pH control.



**Fig. 6.** Hydrogen gas production from various organic acids by *R. sphaeroides* K7 (A) and E15-1 (B) without pH control. Cultures were grown in a 1.5 l reactor containing 1 l Ormerod medium anaerobically at 10,000 lux illumination.

의 일치하였다. *R. sphaeroides* K7 및 E15-1에 의한 기질 분해력은 30 mM malic acid가 가장 우수하였으나 (Table 1) 총 수소생산은 배양 6일 동안 1 l 배양액에서 450-500 ml를 측정하여 사용된 유기산 중에서 가장 수소 생산력이 낮았다(Fig. 6). 30 mM acetic acid를 기질로 이용할 경우, 배양 5일 동안 약 500 ml의 수소를 측정하였고, 기질의 분해도 배양 6일만에 *R. sphaeroides* K7의 경우 75%, E15-1은 83%이었다. 이와 같은 수소 생산량의 차이는 각 기질로부터 생산될 수 있는 수소의 분자수와 균주간의 특성에 의해서 좌우된다[6-8]. 광합성 박테리아에 의한 수소 가스 생산은 유기물질 및 물을 전자 공여체로 하여 광합성에 의해 발생하는 것으로 알려져 있다. 이론적인 수소 생성량은 glucose 한 분자로부터 12 분자의 수소가스가 생성되며, acetic acid, lactic acid, 및 butyric acid 각각 한 분자로부터 4, 6 및 7 분자의 수소가 생산된다. 그러나 purple non-sulfur 박테리아는 종 및 속에 따라서 차이는 있지만, *R. capsulata*의 경우, 기질의 전환율은 glucose의 경우 30-40%이고, lactic acid는 85-90%까지 가능하다고 알려져 있다[7]. 조류나 광합성 박테리아로부터 생산되는 생물학적 수소의 양은 또한 빛에너지를 이용할 수 있는 최대 양자 효율이 높을수록 많은 수소를 생산하는 것으로 알려져있는데, 이는 광화학적 parameter인 균주의 reaction center 수 및 안테나 크기 등에 비례한다. Miyake [13]등이 분리한 *Rhodobacter sphaeroides* RV균주는 현재 가장 널리 연구되는 균주로서, 본 실험에 사용된 *R. sphaeroides* K7 [2] 및 E15-1[16]가 acetic acid를 비교적 잘 이용하는데 비하여, *Rhodobacter sphaeroides* RV 균주는 acetic acid를 기질로 사용한 배지에서 수소가 전혀 생산되지 않고, acetic acid, propionic acid, 및 butyric acid를 혼합한 복합 기질을 이용할 때 우수한 수소 생산성을 나타내는 것으로 알려졌다. 한편 *R. sphaeroides* K7 및 E15-1 균주는 pro-

piotic acid를 기질로 이용해서 수소를 생산하지 못하였으며, butyric acid를 기질로 사용할 경우 가스생산이 타 균주들에 비해 3-4일간 지연되었으나, 8일 동안의 총 수소 생산량은 다른 유기산을 기질로 사용하였을때 보다 우수하였다(Fig. 6). *R. sphaeroides* K7 및 E15-1이 glucose와 유기산을 이용하여 혐기 광합성 배양중 생산하는 수소 가스 및 균체 성장은 앞에서 언급한 바와 같이 많은 차이점을 나타내었다. 이와 같은 현상은 *R. sphaeroides*가 혐기 광합성 배양 조건에서 glucose와 유기산을 이용하는 대사경로 차이 때문인 것으로 생각된다.

*R. sphaeroides* E15-1은 K7에 비해서 glucose 30 mM을 기질로 할때 BChl생성 및 균체 성장에서 우수하였으며(Fig. 4), 배지의 pH에 관계없이 가스 생산도 *R. sphaeroides* E15-1이 높았다(Fig. 5). 이러한 균주간의 차이는 균의 생리적 특성 및 적응성의 차이로 보여진다. Schultz 등[17]은 *Rhodospirillum rubrum*과 *capsulata*가 혐기 암조건에서 당으로부터 복합 유기산과 수소를 생산하는 복합산 발효를 한다고 보고하였으며, Tramm-Werner 등[21]은 *Rhodobacter capsulata*가 혐기 및 광합성 조건에서 glucose로부터 수소 생산은 우수하였으나, 10시간 후부터 균체의 표백 현상으로 광합성이 방해되었다고 보고하였다. 균체의 표백현상과 이에 따르는 수소 생산 정지 현상은 배양액을 중성 pH로 유지할 때 사라지고, 점차적으로 가스 생산 및 균체 증식이 일어났다(Fig. 4, 5).

동일한 실험 조건에서 glucose와 lactic acid를 혼합기질로 사용할 경우 *R. sphaeroides* K7 및 E15-1은 glucose를 먼저 사용하여 배양액 중의 *R. sphaeroides* pH가 낮아졌고 배양 1일 이후 glucose와 lactic acid의 분해가 더 이상 일어나지 않았으며 pH 저하에 따르는 균체 표백 현상이 나타났다. 배양액은 pH를 중성으로 유지함으로써 이와 같은 균체 표백현상을 방지하고 지속적인 lactic acid의 분해를 관찰할 수 있었으며, 수소 발생도 점차로 증가시킬 수 있었다. 본 실험의 결과로 미루어 *R. sphaeroides* K7 및 E15-1은 혐기 및 광합성 조건하에서 glucose로부터 우선적으로 산 발효에 의해 유기산, 특히 formic acid와 acetic acid를 주로 생산하고 2차적으로 발효액 중에 축적된 유기산을 전자 공여체로 하여 장파장의 빛을 이용하여 광합성이 일어났다. 이때 질소 제한 조건에서 nitrogenase에 의해 H<sup>+</sup>이 H<sub>2</sub>로 환원되었다고 분석된다. 혐기상태에서 광합성에 의한 수소 생산은 유기산 존재하에 광합성 세균인 *Rhodopseudomonas*속의 BChl이 장파장(>600 nm)의 빛을 흡수하여 방출한 전자가 인산화 반응을 거쳐 ATP를 생성하거나, 또는 ferredoxin에 전달되어 N<sub>2</sub>가 존재하지 않을 경우 양성자(H<sup>+</sup>)가 전자 수용체가 되어 nitrogenase에 의해 수소를 생성한다[17]. *R. sphaeroides*는 nitrogenase에 의한 수

소 생산과 더불어 일반적으로 hydrogenase도 동시에 존재하여 당으로부터 혐기 조건하에서 ferredoxin 중재 및 NADH 산화 반응과 hydrogenase에 의해서 수소 생성하는 것으로 분석된다.

## 요 약

*R. sphaeroides* K7 및 E15-1은 혐기적 광합성조건에서 glucose를 탄소원으로 하여 배양초기 24시간 동안은 수소가스를 계속 생산하였으나, 그 이후에는 배양액에 축적된 acetic acid 및 formic acid가 배양액의 pH를 4.2-4.8로 저하시켜 수소를 거의 생산하지 못하였다. 또한 배양 6일 후에도 *R. sphaeroides* K7 및 E15-1의 glucose의 이용율은 각각 43% 및 74%에 불과하였다. 그러나 배양액의 pH를 6.8-7.0으로 유지하면서 배양한 결과 *R. sphaeroides* K7 및 E15-1 두 균주 모두의 수소생산율과 glucose의 이용율이 증가되어, 수소생산은 배양 10일까지도 계속 증가되었으며, glucose도 두 균주 각각 배양후 2.5일 및 4.5일 후에 완전 소비하였다. 뿐만 아니라 균체 배양액의 pH를 중성으로 유지하면서 *R. sphaeroides* K7 및 E15-1을 배양할 경우 균체의 표백현상이 제거되어 배양 7일 후에는 각각 균체의 bacteriochlorophyll 함량이 약 44배 및 9배 증가 되었으며, 이때 균체의 농도는 각각 약 10배 및 2.4배 증가 되었다. *R. sphaeroides* K7 및 E15-1은 혐기적 광합성조건에서 acetic, lactic, butyric 및 malic acid로 부터도, 비록 그 양이 glucose로 부터보다는 적으나, 수소를 생산하였다. 본 실험 결과로 미루어 혐기적 광합성 조건에서 *R. sphaeroides* K7 및 E15-1은 glucose로부터 수소를 생성할 때 NADH 산화 및 hydrogenase가 관여한 대사가 우선적으로 일어나고, 2차적으로는 이때 생성된 유기산을 전자 공여체로 광합성 작용에 의해 질소원이 존재하지 않을 때 nitrogenase에 의해서 양성자(H<sup>+</sup>)가 환원되어 수소(H<sub>2</sub>)가 생성되는 것으로 생각된다.

## 감사의 말

이 논문은 통상산업부 대체에너지 기술개발 연구사업으로 수행된 내용의 일부인 바 정부의 연구비 지원에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Archer, D. B. and L. A. Thompson. 1987. Energy production through the treatment of wastes by microorganism. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Supp.* pp. 595-705.
2. Bae, M. and J. K. Lee. 1983. A study on physiological condition for hydrogen evolution by *Rhodospseudomonas sphaeroides* K-7. *Kor. J. Microbiol.* **21**(3): 109-114.
3. Benemann, J. R. and N. M. Weare. 1974. Hydrogen evolution by nitrogen-fixing *Anabaena cylindrica* cultures. *Science* **184**: 174-175.
4. D'Addario, E., E. Fascetti, and M. Valdiserri. 1996. Hydrogen production from organic waste by continuous culture of *Rhodobacter sphaeroides* RV. Hydrogen energy progress, Proc. 11th World Hydrogen Energy Conference. Stuttgart. Germany. **3**: 2577-2582.
5. Heyndrickx, M., A. Vansteenbeeck, and J. DeLeg. 1986. Hydrogen gas production from continuous fermentation of glucose in a minimal medium with *Clostridium butyricum*. *System. Appl. Microbiol.* **8**: 239-244.
6. Kim, J. S. K. Ito, and H. Takahashi. 1980. The relationship between nitrogenase activity and hydrogen evolution in *Rhodospseudomonas palustris*. *Agric. Biol. Chem.* **44** (4): 827-833.
7. Kim, J. S., K. Ito, and H. Takahashi. 1981. Production of molecular hydrogen by *Rhodospseudomonas* sp. *J. Ferment. Bioeng.* **59**(3): 185-190.
8. Kim, J. S., H. Yamauchi, and K. Ito. 1982. Selection of a photosynthetic bacterium suitable for hydrogen production in outdoor cultures among strains isolated in the Seoul, Taegu, Sendai and Bangkok areas. *Agri. Biol. Chem.* **46**(6): 1469-1474.
9. Kim, J. S., K. Ito, K. Izaki, and H. Takahashi. 1987. Production of molecular hydrogen by a continuous culture under laboratory condition. *Agri. Biol. Chem.* **51**(9): 2591-3593.
10. Klemme, J. H. 1968. Photosynthetic growth of new isolated non-sulfur purple bacteria at the expense of molecular hydrogen. *Arch. Microbiol.* **64**: 29-34.
11. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
12. Minami, M., T. Uechi, M. Kimura, T. Nishishiro, H. Kuriaki, K. Sano, and T. Kawasaki. 1996. Hydrogen production by photosynthetic bacteria using sewage sludge. Hydrogen energy progress, Proc. 11th World Hydrogen Energy Conference. Stuttgart. Germany. **3**: 2583-2589.
13. Miyake, J., X. Y. Mao, and S. Kawashima. 1984. Photosynthetic hydrogen from glucose by a co-culture of photosynthetic bacteria and *Clostridium butyricum*. *J. Ferment. Technol.* **62**: 531-535.
14. Odom, J. M. and J. D. Wall. 1983. Photoproduction of H<sub>2</sub> from cellulose by an anaerobic bacterial coculture. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**(4): 1300-1305.
15. Omerod, J. G. and H. Gest. 1962. Hydrogen photosynthesis and alternative metabolic pathways in photosynthetic bacteria. *Bacteriol. Rev.* **26**: 51-55.
16. Production of bio-hydrogen from waste materials. 1993. Korea Department of Energy and Resources Report 921C 40-364FGI. pp. 38-42.
17. Schultz, J. E. and P. F. Weaver. 1982. Fermentation and anaerobic respiration by *Rhodospirillum rubrum* and *Rho-*

- dopseudomonas capsulata*. *J. Bacteriol.* **149**(10): 181–190.
18. Sigh, S. P. and S. C. Srivastava. 1996. Agrowaste-based bacterial hydrogen production. Hydrogen energy progress, Proc. 11th World Hydrogen Energy Conference. Stuttgart. Germany. **3**: 2613–2618.
  19. Singh, S. P., S. C. Srivastava, and K. D. Pandey. 1994. Hydrogen production by *Rhodospseudomonas* at the expense of vegetable starch, sugarcane juice and whey. *Int. J. Hydrogen Energy*. **19**(5): 437–440.
  20. Thangaraj, A. and G. Kulandaivelu. 1994. Biological hydrogen production using dairy and sugarcane waters. *Bioresource Tech.* **48**: 9–12.
  21. Tramm-Werner, S., M. Hackethel, M. Weng, and W. Hartmeier. 1996. Photobiological hydrogen production using a new plate loop reactor. Hydrogen energy progress, Proc. 11th World Hydrogen Energy Conference. Stuttgart. Germany. **3**: 2407–2415.
  22. Ueno, Y., S. Otsuka, and M. Morimoto. 1996. Hydrogen production from industrial wastewater by anaerobic microflora in chemostart culture. *J. Ferment. Bioeng.* **82**(2): 194–197.
  23. Vagnias, P. M., A. Colbeau, J. C. William, and Y. Jouanneau. 1985. Hydrogenase, nitrogenase, and hydrogen metabolism in the photosynthetic bacteria. *Adv. Microbiol. Physiol.* **26**: 155–234.

(Received November 11, 1997)