

## ***Rhodopseudomonas palustris* P4에 의한 이 단계(Two-stage) 생물학적 수소생산**

윤영수\*, 인선경\*, 백진숙\*, 박성훈\*\*, 오유관\*\*, 김미선†\*

\*한국에너지기술연구원 바이오메스연구센터

\*\*부산대학교 화학공학과

## **Two-Stage Biological Hydrogen Production by *Rhodopseudomonas palustris* P4**

Young-Su Yun\*, Sun-Kyoung In\*, Jin-Sook Baek, Sung Hoon Park\*\*,  
You-Kwan Oh\*\*, Mi-Sun, Kim†\*

Biomass research center, Korea Institute of Energy Research, 71-2, Jang-dong, Yuseong-gu,  
Daejeon, 305-343 Korea, Department of Chemical and Biochemical Engineering, Pusan  
National University, Jangjeon-dong, Kumjung-gu, Pusan, Korea

### **ABSTRACT**

The integrated or the two-stage (dark anaerobic and photosynthetic) fermentation processes were compared for the hydrogen production using purple non-sulfur photosynthetic bacteria, *Rhodopseudomonas palustris* P4. Cell growth, pH changes and organic acids and bacteriochlorophyll contents were monitored during the processes. Culture broth of *Rps. palustris* P4 exhibited dark-red during the photosynthetic culture condition, while yellow under the anaerobic condition without light. *Rps. palustris* P4 grown at the photosynthetic condition evolved 0.38 and 1.33 ml H<sub>2</sub>/mg-dcw during the dark and the light fermentation, respectively, which were totally 1.71 ml H<sub>2</sub>/mg-dcw at the two-stage fermentation. The rate of hydrogen production using *Rps. palustris* P4 grown under the dark anaerobic condition was 2.76 ml H<sub>2</sub>/mg-dcw which consisted of 0.46 and 2.30 ml H<sub>2</sub>/mg-dcw from the dark and the photosynthetic fermentation processes, respectively. *Rps. palustris* P4 grown under dark anaerobic conditions produced H<sub>2</sub> 1.6 times higher than that of grown under the photosynthetic condition. However, total fermentation period of the former was 1.5 times slower than that of the latter, because the induced time of hydrogen production during the photosynthetic fermentation was 96 and 24 hours when the seed culture was the dark anaerobic and photosynthetic, respectively. The integrated fermentation process by *Rps. palustris* P4 produced 0.52 ml H<sub>2</sub>/mg-dcw(1.01 mol H<sub>2</sub>/mol glucose), which was 20% of the two-stage fermentation.

**주요기술용어:** purple non-sulfur photosynthetic bacteria (홍색 비유황 광합성 세균), hydrogen production (수소생산), anaerobic fermentation (혐기발효), and photosynthetic fermentation(광합성 발효)

† Corresponding author: bnm skim@kier.re.kr

## 1. 서 론

수소는 장기적인 화석연료의 사용으로 인한 지구 환경 문제를 해결할 수 있는 다양한 신 재생 에너지중의 하나로서 화석에너지를 대체할 이상적인 연료로 전망된다. 수소를 생산하는 기술은 현재 여러 가지가 알려져 있는데 미생물을 이용하는 방법은 빛에너지와 물 또는 유기물로부터 수소를 생산할 수 있는 이상적인 에너지 생산 기술로써, 자연계에 존재하는 다양한 미생물이 광합성 물분해, 광합성 발효, 혐기발효, 간접 물분해 등으로 수소생산과 소비에 관여한다.

혐기 발효에 의해 유기물로부터 수소와 유기산을 생산하는 방법은 유기물로부터 전환효율은 낮지만, 수소생산 속도가 빨라서 상용화에 빨리 근접할 기술로 전망하고 있다. 혐기 발효와는 달리 광합성 발효는 수소생산 속도는 느리지만 유기산으로부터 수소생산 효율이 높다. 이와 같은 혐기 발효와 광합성 발효를 단계적으로 적용하는 이 단계(two-stage) 수소생산 기술이 가장 효율적인 방법으로 알려져 있으며, 인공폐수와 각종 실질 유기성 폐기물과 폐수를 대상으로 이 단계 수소생산 연구가 수행되었다<sup>1-4)</sup>. 1단계 혐기발효에서는 *Clostridium* 이나 *Enterobacter* 속 등의 절대·통성 혐기세균이 유기물을 분해하여 수소와 유기산을 생산하고, 2 단계 광합성 발효에서는 홍색 비유황세균인 *Rhodospseudomonas* 속의 균주가 1 단계에서 발생한 유기산을 수소로 전환하였다. 이러한 이 단계 배양(two-stage)은 이론적으로 수소발효효율이 높지만, 두 종류 이상의 서로 다른 미생물을 상이한 배양조건에서 사용해야 하므로 기술이 복잡하고, 적용의 난이도가 높다. 따라서, 실질적으로 발생하는 수소량을 최대화하기 위해서 해결해야할 점이 많다.

광합성 발효에 수소를 발생하는 홍색 비유황세균은 장파장의 빛을 받아 전자전달 기작에 의해 균체성장과 동시에 질소고정화를 하며, 이에 관여하는 효소는 nitrogenase<sup>5)</sup>로  $N_2$ 를  $NH_4^+$

으로 환원하여 질소고정을 한다. 반면, 질소원이 존재하지 않을 때는, 배양액 중에 유기산으로부터 공급된 양성자( $H^+$ )와 광합성계를 통하여 전달된 전자( $e^-$ )가  $H_2$ 로 환원된다.

*Rhodospseudomonas palustris*는 홍색 비유황세균의 일종으로 균체성장과 수소생산에 여러 가지 대사(photo-autotrophic, photo-heterotrophic, chemo-autotrophic, chemo-heterotrophic)를 수행할 수 있다<sup>6)</sup>. 즉, 빛이 존재할 때, 광합성 발효를 할 수 있을 뿐만 아니라 빛이 없을 때도 유기물을 혐기 발효하여 수소를 생산하며, 호기 및 혐기 조건에서 모두 성장한다. 이러한 다양성 때문에 기질 이용 효율에 차이는 있지만, 단당류, 이당류 및 각종 유기산을 모두 이용하여 균체가 성장할 수 있다<sup>6)</sup>.

본 실험은 위와 같은 *Rps. palustris* P4의 배양 특징을 이용하여 혐기 발효와 광합성 발효를 수소 생산에 적용하기 위하여 이 단계(two-stage) 배양과 일 단계(one-stage) 동시배양을 비교하여 최적화 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 사용균주

실험에 사용된 *Rps. palustris* P4는 부산대학교 화학공학과 생물공학 연구실에서 분리 및 동정되었다<sup>7)</sup>.

### 2.2 배지 및 배양조건

혐기 발효는 180 mM phosphate buffer, 10 g/l glucose, 3 g/l yeast extract, 8.1 g/l ammonium chloride 가 첨가된 PFN mineral salt 배지<sup>7)</sup>를 이용하여 30°C에서 빛을 조사하지 않고 배양하였다. 혐기조건을 만들기 위하여 53 ml serum bottle에 20 ml 배양액을 첨가한 후 고무마개와 알루미늄 덮개로 밀폐하였고, 아르곤 가스로 배양액과 head space를 치환하였다. 광합성 발효는 GL 배지(70 mM lactate, 10 mM glutamate, 1.8 g sodium hydrogen carbonate)를 이용하였으

며<sup>8)</sup>, 할로젠등으로 배양기 표면광도를 7 klux로 조절하였다.

배양한 *Rps. palustris* P4를 종균으로 하여 1 단계 혐기발효와 2 단계 광합성 발효를 분리한 이 단계(two-stage)배양과 1 과 2 단계를 통합한 동시배양으로 일 단계(one-stage)배양을 실시하였다. 발효 중 수소생산량, 포도당 및 젖산 분해율, 균체량, 생성된 유기산을 일정시간 간격으로 측정하였다.

### 2.3 분석방법

수소 함량은 배양기내의 head space 가스를 gas-tight micro-syringe로 100  $\mu$ l를 채취하여 GC(Shimadzu 14-B)로 분석하였다. 사용한 column은 molecular sieve 5A(Supel. Inc)를 충전한 packed column이고, TCD로 수소를 검출하였다. 분석온도는 column 80 $^{\circ}$ C, injector 100 $^{\circ}$ C, detector 120 $^{\circ}$ C이었으며, flow rate는 35 ml/min로 아르곤을 carrier 가스로 사용하였다.

배양 중 발생한 에탄올을 측정하기 위해서 균체와 상등액을 분리한 후, 상등액을 5 N HCl 로 산성화하고, 1% 1-propanol을 첨가하였다. 전 처리한 배양액 3  $\mu$ l를 Porapak QS(Supelco Inc.) 컬럼을 이용해서 GC (Shimadzu 14-B)를 FID와 연결하여 분석하였다. 사용한 온도는 column 230 $^{\circ}$ C, injector 220 $^{\circ}$ C, detector 220 $^{\circ}$ C이었으며, 질소를 50 ml/min으로 흘리면서 분석하였다.

유기산은 균체와 상등액을 분리한 후 상등액 20  $\mu$ l를 유기산 분석용 column인 Aminex HPX-87H를 장착한 HPLC (Shimadzu LC-10AT)로 실온에서 분석하였으며, 각종 유기산 농도와 종류는 0.01 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 이동상으로 하여 flow rate 0.6 ml/min로 용출하여 UV detector의 파장 210 nm에서 측정하였다.

배양액 중의 포도당 농도는 dinitrosulfuric acid (DNS)방법으로 정량하였으며, 배양정도는 UV-visible spectrophotometer (Shimadzu UV-1601)와 IR 건조기(Precisa 310M)에서 측정하였다.

## 3. 결 과

### 3.1 균체 성장

*Rps. palustris* P4는 빛을 조사하는 광합성 조건에서 배양할 때와 빛을 조사하지 않은 혐기조건에서 서로 다른 균체 성장을 보였다(Fig. 1).

이 균주는 백열등이나 할로젠등과 같이 장파장을 함유하는 빛을 조사했을 때, 배양액은 균체가 성장함에 따라 짙은 붉은색을 띄었으며(Fig. 1, A), 흡광도 805 nm 와 865 nm에서 강한 흡수과정을 갖고 있었다. 반면, 빛을 조사하지 않은 혐기 또는 호기 배양할 때, 배양액이 노란색을 나타내었고(Fig. 1, B), 805 nm 와 865 nm에서 흡수과정을 갖지 않았으며, 균체의 성장속도는 빛이 없는 혐기 조건에서 배양할 때가 광합성 배양을 할 때보다 높았다. 본 실험에 사용한 *Rps. palustris* P4는 분류학적으로 홍색 비유황세균에 속하는 광합성세균이며, 일반적으로 이러한 세균은 빛의 유무에 관련없이 배양 중 붉은 색소의 bacteriochlorophyll(Bchl.)을 형성한다. 그러나, *Rps. palustris* P4는 figure 1과 같이 빛을 비추지 않은 혐기 배양조건에서는 붉은 색소의 Bchl. 을 형성하지 않았으며, LB 최소배지에 호기조건으로 배양할 경우에도 동일한 결과를 나타내었다. 이는

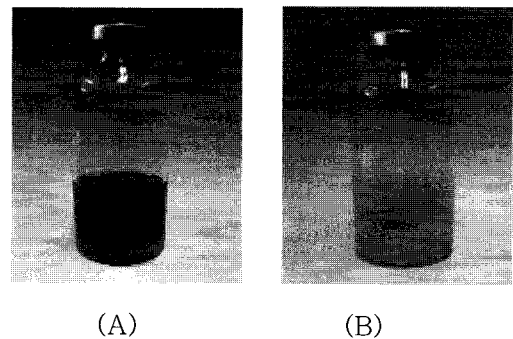


Fig. 1. *Rhodospseudomonas palustris* P4 grown under photo-fermentation(A) and dark anaerobic fermentation(B) culture condition.

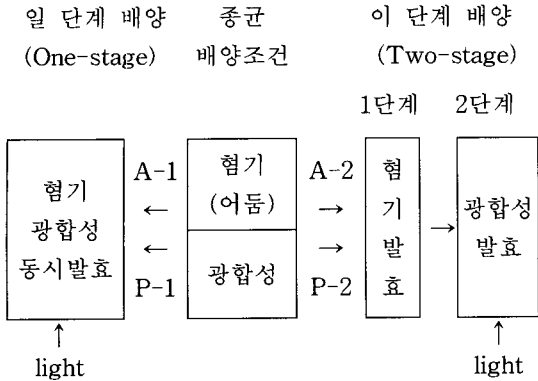


Fig. 2. Schematic diagram of experiments.

A : Anaerobically *Rps. palustris* P4 grown at dark  
 P : Photosynthetically *Rps. palustris* P4 grown at photosynthesis  
 1 : One stage, 2 : Two stage

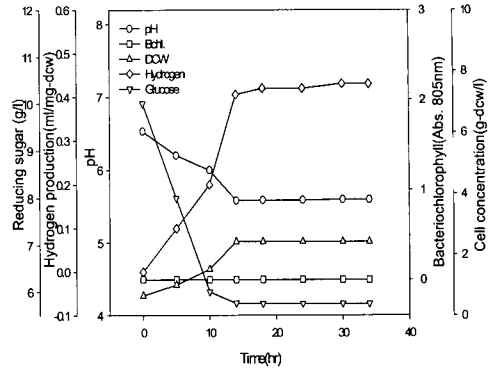
일부 광합성 세균이 호기조건에서 성장할 때, 색소가 형성되지 않거나, 최소량의 색소가 형성되는 보고<sup>9)</sup>와 일치하지만, 그 원인은 규명되지 않았다.

### 3.2. 이 단계(Two-stage) 수소 생산

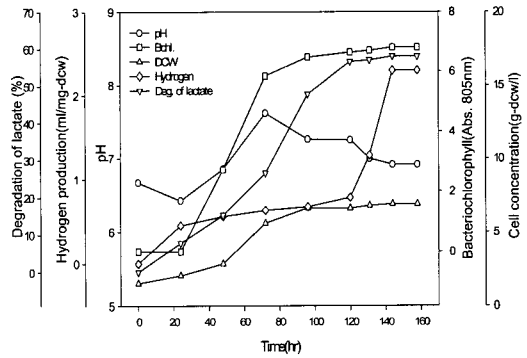
*Rps. palustris* P4는 혐기 발효 조건과 광합성 발효 조건에서 다르게 성장하기 때문에 종균배양 조건이 수소생산과 균체 성장에 미치는 영향을 이 단계(two-stage) 배양실험을 통하여 관찰하였다 (Fig. 2).

첫째, 종균을 혐기 배지(PFN)에서 배양한 후에 혐기 발효와 광합성 발효를 순차적으로 적용한 이 단계(two-stage) 배양을 하였다(Fig. 2, A-2). 혐기배양 12~14 시간에 균체 건조량(dry cell weight, dcw)은 약 2.424 g-dcw/l 이었으며(Fig. 3, A), 혐기발효 중에 생성된 수소량은 약 0.46 ml H<sub>2</sub>/mg-dcw 이었다. 배양액 중에 축적된 유기산 및 유기용매는 lactate, acetate, butyrate 및 ethanol 로, 농도는 각각 59.87, 21.93, 5.00, 16.51 mM 이었으며 (Table 1, A-2), 축적된 유기산 및 용매의 농도는 배양액 pH에 의해 영향을 받는 것으로 알려져 있다<sup>10)</sup>.

혐기 배양 중 배양액의 pH는 외부로부터 조절



(A)



(B)

Fig. 3. Hydrogen production from two-stage using *Rps. palustris* P4 grown under anaerobic conditions (A) Dark anaerobic fermentation (B) Photo-fermentation.

되지 않았고, 유기산이 생성되면서 초기 pH 6.5에서 발효가 진행됨에 따라 배양 14시간에 5.5로 낮아졌다. 일반적인 홍색 비유황세균이 나타내는 붉은색의 Bchl. 은 *Rps. palustris* P4 혐기발효 중에 외관상으로 관찰할 수 없었으며, 805 nm에서 흡수과장도 검출되지 않았다. 배양액 중에 첨가한 포도당 10 g/l 은 최대 50%가 분해 되었으며, pH가 저하하면서 균체의 성장이 정지하였고, 포도당도 더 이상 분해되지 않았다. 혐기발효 중에 포도당은 가수분해되어 이론적으로 2분자의 CO<sub>2</sub>와 acetate를 각각 생성하며 동시에 4분자의 H<sub>2</sub>를 발생하는데, 실제로는 대부분의 자연계 혐기세균이

Table 1. Organic acid production by *Rps. palustris* P4 under anaerobic fermentation.

	Ethanol (mM)	Lactate (mM)	Acetate (mM)	Propionate (mM)	Butyrate (mM)	Formate (mM)
A-2	16.51	59.87 ±0.81	21.93 ±0.44	3.73 ±0.51	5.00 ±2.56	7.04 ±0.18
P-2	26.00	70.90 ±4.50	22.61 ±0.28	2.18 ±0.36	0.00 ±0.00	5.80

A-2, Anaerobic fermentation of *Rp. palustris* P4 grown under dark anaerobic condition

P-2, Anaerobic fermentation of *Rp. palustris* P4 grown under photosynthetic condition

최대 1~2 분자 수소를 발생하며, 이는 약 25~50% 전환효율이다. 발효액에는 acetate 외에도 butyrate, formate, lactate와 acetone, ethanol 등이 동시에 축적하는 것으로 알려져 있다<sup>11)</sup>.

본 실험에서 발생한 수소의 양은 포도당으로부터 생성되는 이론적인 수소 생성량과 비교해보면 약 20% 수소 발생 전환효율이었다. 이와 같은 결과는 이미 발표된 혐기 발효세균에 의한 수소로의 전환효율과 비교할 때 낮다. 그러나 본 결과는 광합성 세균이 혐기발효 중에 생성되는 수소발생량이며, 계속적으로 2 단계 광합성 발효에 적용함으로써, 1 과 2 단계를 거치는 전체적인 수소발생효율은 증가할 것으로 예상된다. 이 단계(two-stage) 수소생산 배양 실험을 위해서 혐기 발효 14시간 후 균체를 회수하여 2 단계 광합성 발효의 종균으로 사용하였다.

2 단계 광합성 발효는 lactate를 탄소원과 전자공여체로 공급하고, 할로겐등(lamp)으로 7 klux 빛을 조사하면서 30℃에서 배양하였다(Fig. 3, B). 수소는 배양 144시간에 총 2.30 ml H<sub>2</sub>/mg-dcw가 생성되었고, 탄소원인 lactate는 58%가 분해되었다. 배양 중 발효액의 pH는 6.5~7.2로 유지되었으며, 배양액 중 ethanol은 검출되지 않았으나, butyrate와 formate는 소량 생성되었다. 혐기 발효하는 동안 흡광도 805 nm의 흡수파장을 나타내는 Bchl. 은 생성되지 않았다. 그러나 광합성 발

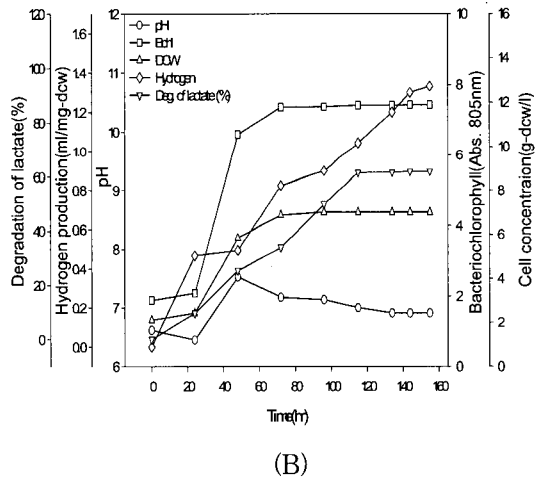
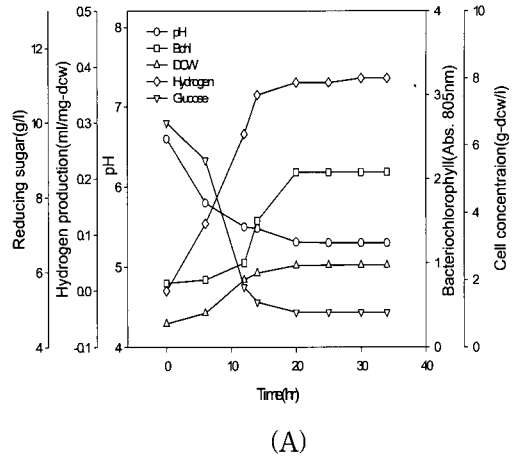


Fig. 4. Hydrogen production from two-stage using *Rps. palustris* P4 grown under photosynthetic conditions (A) Dark anaerobic fermentation (B) Photo-fermentation.

효가 진행됨에 따라 가시적으로 붉은색이 나타났고, 805 nm 흡수파장도 배양 24시간 이 후 서서히 증가하여 72 시간 배양 후에는 흡광도 6.00까지 증가하였다(Fig. 3, B).

균체성장은 약 3~4일 동안 지속되었으며, 수소는 균체 성장이 거의 정지한 4일 이후부터 발생하기 시작하였고, 최대 수소생산 속도는 0.04 ml H<sub>2</sub>/mg-dcw/hr 이었다. 탄소원으로 첨가된 lactate 1몰로부터 이론적으로 최대 7 몰 수소가 발생한다

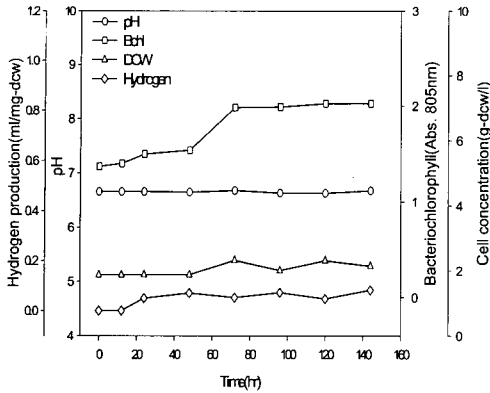


Fig. 5. Hydrogen production from two-stage without the medium exchange using *Rps. palustris* P4 grown under photosynthetic conditions

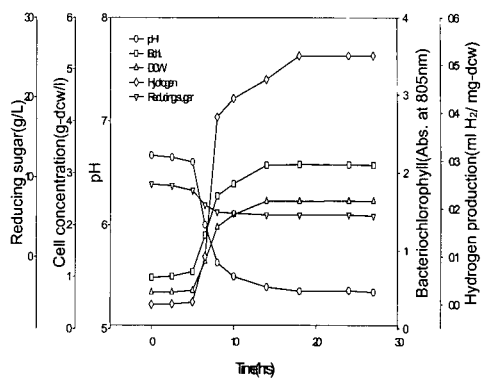


Fig. 6. Hydrogen production from one-stage using *Rps. palustris* P4 grown under photosynthetic conditions.

고 가정할 때, lactate로부터 발생한 수소 효율은 약 35% 이었다. 본 실험에서 수행한 이 단계 발효에 의해서는 총 3.25 M 수소가 발생하였다.

둘째, 광합성 조건에서 배양한 *Rps. palustris* P4를 종균으로 사용하여 이 단계 수소생산 실험을 위와 동일하게 실시하였다.

혐기 배양 14 시간 동안(Fig. 4, A) 0.38 ml H<sub>2</sub>/mg-dcw 수소가 생성되었다.

탄소원으로 첨가된 포도당은 약 50%가 분해되었으며, 배양액의 pH가 5.5 이상으로 유지될 때까지 효율적으로 이용되었다. 첨가한 포도당 1몰로부터 이론적으로 최대 4몰의 수소가 발생한다고 가정할 때, 혐기 발효의 수소발생효율은 약 19% 이었다. 생성된 유기산 및 유기용매는 lactate, acetate 및 ethanol 이었으며, 각각 70.90, 22.61, 26 mM 이었다(Table 1, P-2). 또한 805 nm에서 흡수파장은 초기 0.759에서 배양 14시간에 흡광도 1.5로 증가하였으며, 20시간 이후, 2.07까지 증가하였다.

2 단계 광합성 발효는 혐기 발효한 균체를 전량 회수한 후 원심 분리하여 광합성 배양 배지에 접종하여 7 klux로 빛을 조사하였다(Fig. 4, B). 수소는 배양 24시간에 발생하기 시작하여, 배양 144시간에 총 1.33 ml H<sub>2</sub>/mg-dcw 이 생성되었

다. 2 단계 광합성 발효의 수소발생효율은 약 19% 이다. 탄소원인 lactate는 첨가량의 62%가 분해 되었으며, acetate, formate, butyrate는 각각 3.28, 15.06, 17.27 mM이 생성되었지만, 유기용매 ethanol은 검출되지 않았다. 균체 농도는 초기 2.109 g-dcw/l에서 배양 44 시간에 5.85 g-dcw/l로 성장하였으며, 배양 72시간 이후 6.915 g-dcw/l로 높은 성장을 나타냈다. 805 nm에서 흡수파장은 초기 흡광도 2.21에서 배양 44시간에 6.60으로 증가하여, 높은 균체성장을 보인 배양 72시간에는 7.42로 흡수파장도 증가하였다.

이 단계(two-stage) 연속배양의 배지교환 및 균주 접종시간의 단축을 위해 광합성 조건에서 배양한 종균으로 혐기 발효를 거쳐 별도의 배지교환 없이 광합성 배양을 하였다. 1 단계 혐기 발효결과는 Fig. 4, A 와 같다. 이후 혐기 발효에서 생성된 유기산에 의해 낮아진 배양액의 pH를 6.5로 조정 한 후, 아르곤을 흘려 혐기조건으로 만들고, 7 klux로 빛을 조사하여 혐기 발효에서 생성된 lactate 74.13 mM을 기질로 광합성 발효 결과(Fig. 5), lactate는 약 18% 분해되었고, 수소는 0.29 ml H<sub>2</sub>/mg-dcw 가 생성되었으며, 수소발생 또는 생산효율은 14% 로 낮았다. 균체 농도는 초기 1.8 g-dcw/l에서 2.07 g-dcw/l로 낮은 성장

를 보였고, pH는 광합성 배양 144시간 동안 6.5로 유지되었다.

이 단계 연속배양은 혐기발효와 광합성발효 각각의 최적 배지를 적용하기 위해 균체를 1 단계에서 2 단계로 이동하는 번거로움이 있었다. 따라서, 이러한 과정을 없애기 위해 혐기발효와 광합성 발효를 통합한 일 단계(one-stage) 동시 배양을 실시하였다.

### 3.3. 일 단계(One stage) 동시배양

광합성 배양 조건으로 성장한 *Rps. palustris* P4(Fig. 1, A)를 종균으로 혐기 배지에서 광합성 발효 조건으로 수소를 생산하였다(Fig. 6).

*Rps. palustris* P4 균체의 지수성장기는 배양 14시간 까지 지속되었다. 수소는 지수성장기 초기인 8시간부터 생산되기 시작하였고, 배양 18시간에 0.52 ml H<sub>2</sub>/mg-dcw 의 수소를 생산하였으며, 이후 생성되지 않았다. 이 때, 이론값에 따른 수소 발생효율은 약 24% 이었다.

배양 초기 pH는 6.67 이었으며, 균체가 성장하면서 감소하기 시작하여 약 8시간~24시간 사이에는 5.35로 감소하였다. 생성된 수소는 혐기 배양 종균 *Rps. palustris* P4 로부터 이 단계 연속 배양으로 생성된 총 수소량의 약 0.20 배 낮은 수소생산량이다.

일 단계(one-stage) 동시배양으로 생성된 유기산 및 유기용매는 lactate, formate, acetate, propionate, butyrate와 ethanol 등이 생성되었다. 배양 28시간 동안 lactate와 propionate 는 각각 80.28 mM, 11.01 mM이 생성되었으며, 배양 18시간부터 배양 28시간 동안 64.88 mM과 5.84 mM로 감소되었다. 그러나 butyrate와 acetate는 배양 초기부터 배양 18시간까지 20.91 mM과 19.04 mM이 생성되었고, 이 후 생성과 감소는 나타나지 않았다.

## 4. 고 찰

일반적으로 광합성 세균의 일종인 홍색 비유황

세균은 pfenig 합성배지(12)에서 빛을 비추면서 혐기 배양할 때, 붉은 색소를 나타내며 이는 광합성 작용이 이 세균의 박테리오클로로필 색소와 관련 있다는 것을 나타낸다. 그리고 빛을 비추지 않고 혐기 배양을 할 때는 균체가 자라지 않는다. 이러한 일반적인 홍색 비유황세균의 성장과 달리 *Rps. palustris* P4는 빛을 비추지 않은 혐기 배양 조건에서도 균체가 성장했다. 그러나 붉은 색소 대신 노란색을 나타내었지만, 성장속도는 광합성 조건보다 24시간이 단축되었다. 이는 질소원이 풍부한 혐기 배지로부터 균체 성장이 촉진되었기 때문으로 판단된다.

*Rps. palustris*는 광합성(phototrophic)작용에 의해 성장이 가능하며, 동시에 화학합성(chemotrophic)도 할 수 있는 세균으로 대사적인 다양성을 갖는 것과, 다양한 환경조건에서도 성장이 가능한 것<sup>5)</sup>이 확인되었다.

PFN 배지에서 혐기 배양한 *Rps. palustris* P4를 혐기 발효와 광합성 발효를 순차적으로 적용한 이 단계(two-stage) 배양으로부터 생성된 수소는 광합성 발효 조건에서 배양한 종균으로 생성된 수소보다 약 1.6배 높았으며, 수소발생효율도 높았다.

혐기발효와 광합성 발효의 최적 배지의 선택, 최적 pH 적용과 균주 접종의 과정을 생략한 일 단계(one-stage) 동시배양은 질소원으로 첨가된 yeast extract가 균체의 성장을 촉진시키지만<sup>6)</sup>, 다량의 질소원이 존재하면, N<sub>2</sub>를 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>으로 환원하는 반응이 증가되는 반면, H<sup>+</sup>가 H<sub>2</sub>로 환원되지 못해 수소생성이 감소된 것으로 판단된다. 따라서, 광합성 배양에서 균체성장이 혐기배양보다 느리게 진행된다 할지라도 최소량의 질소를 함유한 배지를 이용하는 것이 일 단계 동시배양에 의한 수소생성 증가의 대사과정에 영향을 줄 것이라 판단되며, 앞으로 질소원의 함량에 따른 일 단계 동시배양의 수소생성 연구가 필요하다고 사료된다.

일 단계 동시배양으로 생성된 유기산중 acetate와 butyrate의 지속적인 생성과는 달리, lactate와

propionate의 일정시간 이후 감소하였다. 이와 같은 현상은 일반적으로 홍색 비유황세균에서 관찰되는 것으로 보고되었다<sup>1,13-16</sup>). Lactate의 수소생산 전환률이 acetate와 butyrate의 수소생산 전환률보다 우수하기 때문에 발생한 결과로 판단된다. 즉, lactate는 다른 유기산에 비해 용이하게 균체 성장에 필요한 탄소원으로 이용되며, 수소발생시에는 H<sup>+</sup>를 제공하지만, acetate는 비교적 잘 이용되지 않는 기질이다. 왜냐하면 acetate는 glyoxylate 경로를 통해서 분해되는데, 대부분의 홍색 비유황세균은 이 경로가 결여되어 있거나 균주에 따라서 대체할 수 있는 특이한 경로가 존재한다.

이 단계 연속 배양에 의한 수소생성 실험은 혐기 배양 조건으로 성장한 *Rps. palustris* P4를 종균으로 할 때, 수소생산량과 수소이용효율이 다른 방법의 수소생산보다 우수하였다.

## 5. 결 론

홍색 비유황세균 *Rps. palustris* P4를 이용한 수소생산 공정을 최적화하기 위하여 혐기 및 광합성 발효과정을 일 단계로 통합하거나, 이 단계(two-stage)로 구분하여 종균배양 조건에 따르는 수소생산, 균체성장, pH 변화, 유기산 농도 및 bacterio-chlorophyll 변화를 측정하였다.

*Rps. palustris* P4는 빛을 조사하여 혐기조건에서 배양할 때와 빛을 조사하지 않을 때에 서로 다른 균체 성장을 보였다. 할로젠등을 조사했을 때, 배양액은 균체가 성장함에 따라 짙은 붉은색을 띄었다. 반면, 빛을 조사하지 않을 때는 혐기 또는 호기 배양할 때, 배양액이 노란색을 나타내었고, 균체의 성장속도는 빛이 없는 혐기 조건에서 배양할 때 높았다.

광합성 조건으로 활성화된 *Rps. palustris* P4 종균은 혐기 발효에서 0.38 ml H<sub>2</sub>/mg-dcw와 광합성 발효에서 1.33 ml H<sub>2</sub>/mg-dcw 수소를 각각 생산하여 총 1.71 ml H<sub>2</sub>/mg-dcw의 수소가 생성되었다. 2 단계 광합성 발효의 수소발생 유도시간

은 24시간이었다.

반면, 혐기 배양 조건으로 배양한 종균 *Rps. palustris* P4로부터 이 단계 연속 배양 중 혐기 발효에서 0.46 ml H<sub>2</sub>/mg-dcw를 발생하였고, 광합성 발효에서 2.30 ml H<sub>2</sub>/mg-dcw를 발생하여 총 172시간 동안 수소는 총 2.76 ml H<sub>2</sub>/mg-dcw이 생성되었으며, 혐기 발효 후 광합성 배양의 수소발생 유도시간은 96시간이었다. 즉, 종균 성장조건이 혐기 배양일 때가 광합성 배양보다 수소생산성은 약 1.6 배 증가하였다. 그러나 총 배양시간은 전자가 후자보다 약 1.5 배 가량 지연되었다. 이와 같은 결과는 어둠에서 배양한 종균을 광합성 조건으로 전환할 때, 약 3~4일의 유도기간이 필요한 반면 그 반대는 약 24시간이 필요하기 때문이다. 또한 일 단계 동시 배양으로부터 0.52 ml H<sub>2</sub>/mg-dcw의 수소를 생산하였으며, 이는 1.01 mol H<sub>2</sub>/mol glucose의 수소생산수율이다. 혐기 배지로부터 활성화된 *Rps. palustris* P4에 의한 이 단계 수소생산량보다 5 배가량 낮았다.

## 후 기

이 연구(논문)은 과학기술부의 지원으로 수행하는 21세기 프론티어연구개발사업(수소에너지사업단)의 일환으로 수행되었습니다.

## 참 고 문 헌

- 1) Hillmer, P. and H. Gest. H<sub>2</sub> metabolism in the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas capsulata*: H<sub>2</sub> production by growing cultures. *J. Bacteriol.* Vol.129, 1977, pp. 724-731.
- 2) 김미선, 윤영수, 유기성 폐기물 및 폐수로부터 2단계 생물학적 수소생산 및 통합화 시스템. *Trans. of the Korea Hydrogen Energy Society.* Vol.13, No.1, 2002, pp. 52-64.
- 3) Segers, L., Berstrynghe, L., Berstraete, W., Product patterns of non-axenic sucrose fermentation as a function of pH.



- Biotechnol. Lett. Vol.3, No.11, 1981, pp. 635-640.
- 4) Nath K, Kumar A, Das. 2005 Hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* strain O.U.001 using spent media of *Enterobacter cloacae* strain DM11. *Appl Microbiol Biotechnol.* Jan 22.
  - 5) Frank W Larimer, Patrick Chain, Loren Hauser, Jane Lamerdin, Stephanie Malfatti, Long Do, Miriam L Land, Dale A Pelletier, J Thomas Beatty, Andrew S Lang, F Robert Tabita, Janet L Gibson, Thomas E Hanson, Cedric Bobst, Janelle L Torres y Torres, Caroline Peres, Faith H Harrison, Jane Gibson & Caroline S Harwood. Complete genome sequence of the metabolically versatile photosynthetic bacterium *Rhodopseudomonas palustris*. *Nature Biotechnology* Vol.22, 2003, pp. 55-61.
  - 6) 오유관, 김홍주, 김유진, 박성훈(2004) *Rhodopseudomonas palustris* P4를 이용한 일산화탄소 및 물로부터의 생물학적 수소 생산 : 혐기성 대사과정, 한국수소 및 신에너지학회추계학술대회. 2004, pp. 395-403.
  - 7) Jung GY, Jung HO, KimJR, Ahn Y, Park S. Isolation and characterization of *Rhodopseudomonas palustris* P4 which utilizes CO with the production of H<sub>2</sub>. *Biotechnol Lett* ; Vol. 21, 1999, pp. 525-529.
  - 8) Tatsuki Wakayama, Jun Miyake, Light shade bands for the improvement of solar hydrogen production efficiency by *Rhodobacter sphaeroides* RV, *Int. J. Hydrogen Energy*, Vol. 27, Issues 11-12, 2002, pp. 1495-1500.
  - 9) John Lindquist, 2005, *Bacteriology* 102 : Enrichment & Isolation of Purple Non-Sulfur Photosynthetic Bacteria, <http://www.splammo.net/bact102/102pnsb.html>
  - 10) 김미선, 광 생물학적 물 분해 및 CO<sub>2</sub> 고정화에 의한 수소생산. *Journal of the Korean Hydrogen Energy Society*, Vol.12, No.1, 2001, pp. 1-10.
  - 11) Das D, Veziro Qglu TN. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *Int. J. Hydrogen Energy* Vol. 26, 2001, pp. 13-28.
  - 12) Pfennig, N., H.G. Truper. 1991. The family Chromatiaceae, pp. 3200-3221. In A. Balows, H. G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, and K.H. Schleifer (ed.), *The prokaryotes*, Springer, Berlin.
  - 13) Sasaki C. Hydrogen and 5 - aminoevalinic acid production by photosynthetic bacteria in : Zaborsky, O.R.(Ed), *Biohydrogen*. Plenum Press, London, 1988, pp. 133-142.
  - 14) Zurrer, H., Bachofen, R., Hydrogen production by the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*, *Appl. Environ. Microbiol.* Vol.37, No.5, 1979, pp. 789-793.
  - 15) Kim, J.S., Ito, K., Takahashi, H. The relationship between nitrogenase activity and hydrogen evolution in *Rhodopseudomonas palustris* sp. *Agric. Biol. Chem.* Vol.44, No.4, 1980, pp. 827-833.
  - 16) Miyake J., X. Mao, and S. Kawamura. Photoproduction of hydrogen from glucose by co-culture of photosynthetic bacterium and *Clostridium butyricum*. *J. Ferment. Technol.* Vol. 62, No.6, 1984, pp. 531-535.