

## 홍색 비유황 광합성 세균 *Rhodobacter sphaeroides* KD131의 수소생산에 미치는 빛 세기 및 질소원의 영향

전효진\*, 김미선†

\*한국에너지기술연구원 바이오에너지연구센터

## Effect of Light Intensity and Nitrogen Source on Hydrogen Production Using *Rhodobacter sphaeroides* KD131

HYOJIN JEON\*, MISUN KIM†

\*Bioenergy Research Center, Korea Institute of Energy Research, 71-2 Jang-dong,  
Yuseong-gu Daejeon 304-343, Korea

### ABSTRACT

Photobiological hydrogen production using *Rhodobacter sphaeroides* KD131 was studied on the effect of light intensities and nitrogen sources. Media containing malate and glutamate were shown higher hydrogen production rate than that containing succinate and  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  at the  $110 \text{ W/m}^2$  illumination by halogen lamp at  $30^\circ\text{C}$ . Media lacking glutamate as the nitrogen source exhibited higher hydrogen production than that containing glutamate. Initial cell concentration was optimized to 1.0 at the absorbance of 660 nm. Hydrogen production was increased by increasing the light intensity from 0 to  $216 \text{ W/m}^2$  but the increasing rate declined over  $108 \text{ W/m}^2$ .

**KEY WORDS :** Photosynthetic bacteria(광합성 세균), *Rhodobacter sphaeroides*, Purple non-sulfur bacteria (홍색 비유황 세균), Photo-fermentation(광합성 발효), H<sub>2</sub> production(수소 생산)

### 1. 서 론

미생물이 수소를 생산하는 메커니즘은 반응 효소에 따라 hydrogenase를 이용하거나 nitrogenase가 관여해서 수소를 발생하는 방법으로 분류할 수 있다. 일반적으로 녹조류나 혐기 세균 등은 여러 종류의 hydrogenase가 세포 내에 존재하면서 이를 이

용하여 수소를 생산한다. 그렇지만 홍색 비유황 세균(purple non-sulfur bacteria)은 질소원이 부족한 상태에서 nitrogenase를 이용해 수소 이온을 환원시켜 다음 식에서와 같이 수소를 생산한다.



이러한 광합성 발효는 광합성계 I(PS I)만을 이용하고 기질인 유기산이 탄소원인 동시에 전자공여체로 작용한다<sup>2-4)</sup>.

†Corresponding author : bmmskim@kier.re.kr

[ 접수일 : 2010.1.12 수정일 : 2010.2.5 게재확정일 : 2010.2.16 ]

# 홍색 비유황 광합성 세균 *Rhodobacter sphaeroides* KD131의 수소생산에 미치는 빛 세기 및 질소원의 영향

광합성 과정에 의해서 수소를 생산하는 홍색 세균은 홍색 유황 세균과 홍색 비유황 세균으로 나눌 수 있으며, 이들은 생리·생태학적 차이에 의해 뚜렷이 구별된다. 홍색 유황 세균은 주로 광합성 독립 영양대사를 하고 전자 공여체로  $H_2S$ 를 이용하며 절대혐기조건에서 자란다. 반면, 홍색 비유황세균은 주로 광합성 종속영양의 대사를 하고 일부의 균종을 제외하고는 비교적 낮은 농도의  $H_2S$ 에서도 생육이 저해된다.

홍색비유황세균 *Rhodobacter* 속의 광합성 세균은 bacteriochlorophyll(BChl)이 880nm에서 높은 흡광도를 나타내며, 이 장파장의 빛을 이용하여 전자 전달 기작에 의해 질소 고정을 수행한다<sup>5)</sup>. 이에 관여하는 효소는 nitrogenase인데 질소, 암모니아, 암모늄 이온( $NH_4^+$ ) 등의 질소원이 풍부할 경우에 균체의 성장과 질소 고정을 수행한다. 반면 질소원이 부족할 경우에는 양성자( $H^+$ )를 수소( $H_2$ )로 환원하여 수소가스를 발생한다. 이 과정에 의한 수소생산은 적절한 기질 공급, 초기 균체 농도, 질소원의 유무, 빛의 세기 등에 의해 최적화 될 수 있으며 이는 미생물에 따라 차이가 있다<sup>6)</sup>.

Nakada 등은 빛 세기, 스펙트럼의 변화가 빛에너지 전환 효율에 미치는 영향과 광배양기의 깊이에 따른 빛에너지의 변화 등 미생물의 수소생산에 빛에너지가 미치는 효과에 대하여 연구한 바 있다<sup>4)</sup>. R. Melnicki 등은 *Rhodobacter*속은 수소생산과 균체 성장이 항상 비례하지는 않지만 배양 중에 최대의 수소생산속도를 유지하기 위해서는 균체 성장이 필요하다고 보고하였다. 또한 배양액에 탄소원이 고갈되었을 때 수소생산이 멈추었고 다시 탄소원을 보충해주었을 때 수소생산이 일어남을 확인했다<sup>7)</sup>. 이처럼 광합성 미생물에 의한 수소생산의 효율을 높이기 위해서는 최적 조건 및 영향 인자에 대한 연구가 필수적이다.

국내 생태계에서 분리된 *R. sphaeroides* KD131은 홍색 비유황 세균으로서 이 균주에 대한 특성 연구가 필요하기 때문에, 본 연구에서는 수소 생산 최적화를 시키기 위한 조건으로서 질소원의 영향, 수소 발생을 위한 초기 균체 농도 및 빛의 세기에

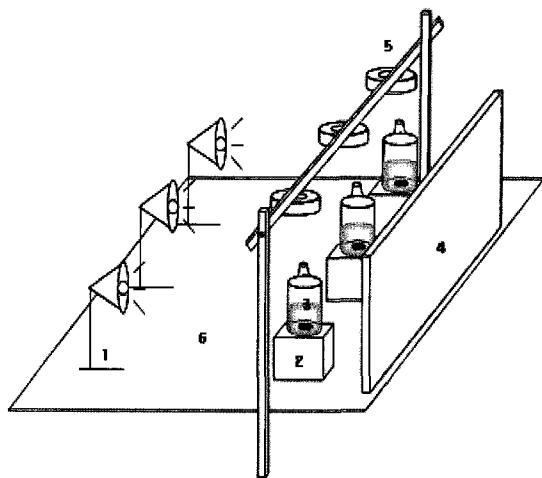


Fig. 1 Schematic diagram of experimental setup.  
1. halogen lamp    2. magnetic stirrer    3. serum bottle  
4. mirror            5. fan                        6. aluminum board

변화를 주어 수소생산성을 관찰하였다<sup>8)</sup>.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 균주 및 배양방법

사용한 균주는 홍색 비유황(purple-nonsulfur) 광합성 세균인 *R. sphaeroides* KD131이다. 150ml 세럼병에 50ml siström's 배지를 넣고 균을 접종한 다음 고무마개와 알루미늄 캡을 씌워 head space와 배지를 알곤 가스로 5 분간 치환하여 협기상태로 만들었다. 광학 측정용 pyranometer sensor가 장착된 light meter(LI-COR, LI-250A)를 이용해 할로겐램프를 108W/m<sup>2</sup>의 세기로 조사하였으며 항온기와 fan을 이용해 실험온도 30°C를 유지해주었다. 배양기 후면에 거울을 배치하였고 바닥에 알루미늄 판을 설치하여 반사광을 최대한 이용하였다. 또한 magnetic stirrer를 이용하여 80~100rpm으로 교반해주었다(Fig. 1).

배양용 배지는 두 종류가 사용되었는데 탄소원과 질소원이 각각 30mM succinic acid와 8mM ( $NH_4$ )<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>인 배지와, 30mM malic acid와 8mM glutamate가 함유된 배지를 사용하였다.

## 2.2 수소함량 분석

수소함량은 세럼병 head space의 gas  $100\mu\text{l}$ 를 gas-tight microsyringe로 채취하여 gas chromatography(shimazu 14B)로 분석하였다. Molecular sieve 5A(supelco)가 충진된 column을 사용하였으며 thermal conductivity detector(TCD)로 분석하였고 carrier gas (flow rate : 60ml/min)는 알곤 가스를 사용하였다. 분석 온도는 column 80°C, injector 100°C, detector 120°C이었다.

발생한 총 수소량은 일정시간마다 주사기를 이용하여 측정한 바이오 가스량과 세럼병 head space 부피, gas chromatography 분석을 통해 얻은 수소 분압을 이용하여 산출하였다.

## 2.3 균체량과 pH 측정

균체량은 배양기에서 일정량 샘플을 채취하고 UV-visible spectrophotometer(shimazu UV1)를 이용하여 660nm에서 흡광도를 측정하였다. pH는 pH meter HM-30G를 이용하여 상온에서 측정하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1 성장 및 수소생산

*R. sphaeroides* KD131을 30°C에서 할로겐램프로  $108\text{W}/\text{m}^2$ 를 조사하면서 탄소원과 질소원이 다른 두 종류의 배지에서 초기 균체농도 OD 0.1(Abs. 660nm)로 맞춰 배양하였을 때 Fig. 2와 같은 균체 성장과 수소생산을 보였다. 탄소원과 질소원이 각각 succinate와  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 인 배지에서 이 균주는 배양 8~43시간 사이에 지수성장기를 나타내 specific growth rate가  $0.08\text{hr}^{-1}$ 이었다. 반면 탄소원과 질소원이 각각 malate와 glutamate인 배지에서는 배양 8~48시간 사이에 지수성장기이고 specific growth rate가  $0.05\text{hr}^{-1}$ 이었다. 수소생산은 균체성장과 다른 형태를 보였는데 탄소원과 질소원이 각각 succinate와  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 인 배지에서는 지수성장기 중반부인 26시간에 수소생산이 시작되었다. 탄소원과 질소원이 malate와 glutamate인 배지에서는 지수성장기

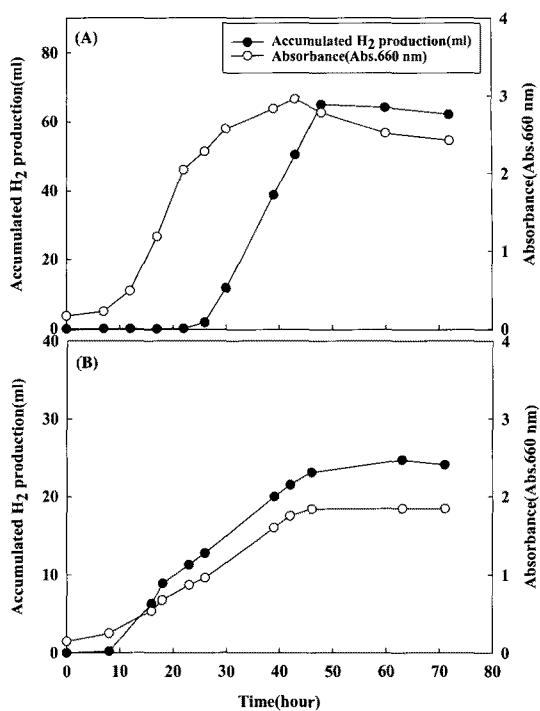


Fig. 2 Hydrogen production and cell growth of *Rhodobacter sphaeroides* KD131 using two different media.  
 (A) Succinate and  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  were used as carbon and nitrogen source, respectively  
 (B) malate and glutamate were used as carbon and nitrogen source, respectively

가 시작되는 8시간부터 수소생산이 시작되었다. *R. sphaeroides*의 수소생산은 다른 홍색 비유황 광합성 세균과 마찬가지로 질소고정 효소인 nitrogenase에 의해 매개된다. 질소원이 풍부할 때에는 균체의 성장과 질소고정에 관여하다가 질소원이 결핍되었을 때 수소를 생산한다.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 첨가한 경우, 암모늄 이온( $\text{NH}_4^+$ )이 모두 제거되는 대수균체성장기 중반부에서 수소생산이 시작되었다. 이것은  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 가 glutamate보다 해리되는 암모늄 이온의 수가 많기 때문에  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 사용한 배지에서의 수소생산이 glutamate를 사용한 배지에서보다 더 늦게 나타난다.

탄소원과 질소원이 각각 다른 두 배지에서 *R. sphaeroides* KD131의 색깔이 각각 다르게 보이는 것을 관찰할 수 있었다. Fig. 3은 초기 균체 농도를

홍색 비유황 광합성 세균 *Rhodobacter sphaeroides* KD131의 수소생산에 미치는  
빛 세기 및 질소원의 영향

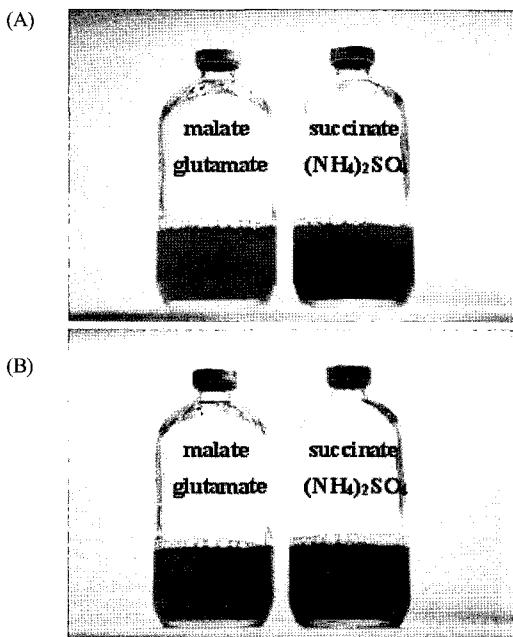


Fig. 3 Comparison of *R. sphaeroides* KD131 cultures on their colors during photofermentor under  $108 \text{ W/m}^2$  using halogen lamp at  $30^\circ\text{C}$ .  
(A) Observed under fluorescent lamp  
(B) Observed under halogen lamp

OD 1로 맞추고  $30^\circ\text{C}$ 에서  $108\text{W/m}^2$ 로 할로겐램프를 이용해 조사하여 배양 72시간 경과한 균주를 할

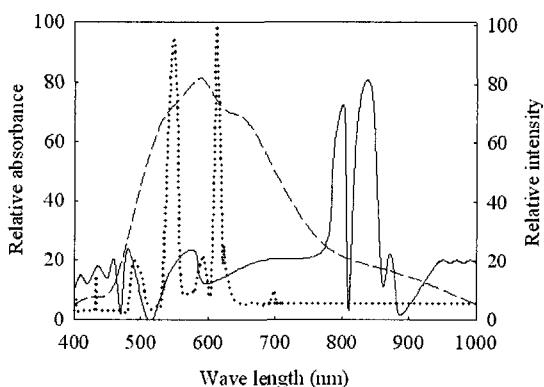


Fig. 4 The absorption spectrum of *Rhodobacter sphaeroides* KD131 and the light spectrum.

- (—) : Absorbance spectrum of *R. sphaeroides* KD131 using two different media
- (···) : Radiation spectrum of fluorescent lamp
- (--) : Radiation spectrum of halogen lamp

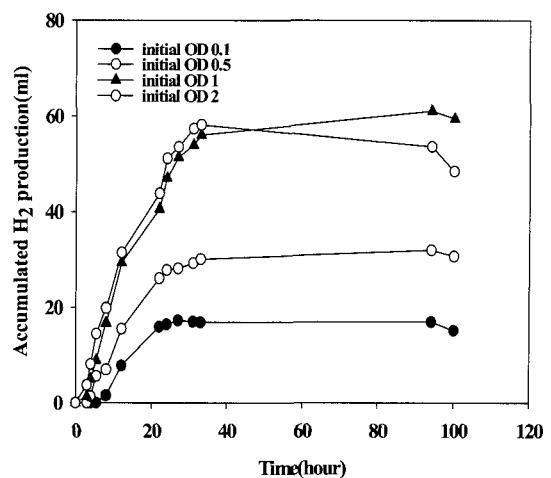


Fig. 5 Effect of initial cell concentration of *Rhodobacter sphaeroides* KD131 on hydrogen production using malate and glutamate as carbon and nitrogen source, respectively.

로겐램프와 형광등 밑에서 관찰한 것이다. 탄소원과 질소원이 malate와 glutamate인 배지에서 배양한 *R. sphaeroides* KD131은 할로겐램프와 형광등에서 모두 흡사하게 핑크빛을 나타내었다. 그러나 탄소원과 질소원이 각각 succinate와  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 인 배지에서 배양한 것은 할로겐램프에서는 붉은색으로 보이지만, 형광등에서 보면 녹색으로 보였다. *R. sphaeroides* KD131의 흡수 스펙트럼을 보면 bactriochlorophyll에 의해  $800\text{nm}$ 이상에서 높은 흡광도를 나타낸다. 또한 할로겐램프는 넓은 영역의 파장의 빛을 방출하지만 형광등은 푸른색의 비중이 높은 단파장의 빛스펙트럼이 많다. 따라서 두 광원에서 배양액의 색깔이 다르게 보이는 것으로 추측된다(Fig. 4). 하지만 탄소원과 질소원으로 malate와 glutamate가 사용된 배지에서는 이러한 현상이 나타나지 않았는데 두 배지에서 스펙트럼의 차이는 없는 것으로 보아 다른 요인에 의해 색깔의 차이가 나타나는 것으로 예상된다.

### 3.2 초기 균체 농도의 영향

탄소원과 질소원이 각각 malate와 glutamate인 배지에서 수소생산에 미치는 초기 균체 농도의 영

향을 알아보기 위해 *R. sphaerooides* KD131의 초기 OD값을 0.1, 0.5, 1, 2로 맞추어 주고 30°C에서 할로겐램프로 108W/m<sup>2</sup>를 조사하여 배양하였다. 그 결과 초기 OD가 증가할수록 수소생산량도 높아지는 경향을 보였으나 초기 OD 1과 2 실험에서는 수소 생산량의 차이가 거의 없었다. 균의 성장도 초기 OD값이 증가함에 따라 좋아졌지만 초기 OD 1과 2 실험에서는 차이가 없었다. 따라서 초기 균체 농도가 OD 0.1, 0.5, 1, 2인 것들 중에서는 초기 OD 1이 가장 수소생산에 효율적이라고 생각되어진다. 이후의 실험은 수소생산의 최대화를 위해 초기 OD 값을 1로 설정하였다.

### 3.3 glutamate의 영향

*R. sphaerooides* KD131의 수소생성을 매개하는 nitrogenase는 질소, 암모니아, 암모늄 이온(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)과 같은 질소원이 풍부할 경우 균체의 성장과 질소고정을 수행한다, 반면에 질소원이 결핍된 경우 양성자를 환원시킴으로서 2H<sup>+</sup>+2e<sup>-</sup> ⇌ H<sub>2</sub> 반응을 촉진시킨다<sup>[36]</sup>. Nitrogenase의 수소생성 반응을 더욱 촉진시키기 위해 탄소원과 질소원이 각각 malate와 glutamate인 배지에서 질소원인 glutamate를 제거하여 glutamate가 수소생산에 미치는 영향을 알아보았다.

대조군으로서 탄소원과 질소원으로 malate와 glutamate가 함유된 배지가 사용되었다. 실험군으로 malate가 동일하게 탄소원으로 사용되고 질소원인 glutamate를 넣어주지 않은 배지가 사용되었다. 할로겐램프를 108W/m<sup>2</sup>의 세기로 조사하였으며 초기 균체농도를 OD 1로 맞추고 30°C에서 배양하였다. 그 결과 Fig. 6과 같이 배양 약 70시간까지는 glutamate가 질소원으로 함유된 배지에서의 균체성장이 최대 약 2배 이상 좋고 수소생산량도 조금 더 많아보였다. 하지만 이 배지에서는 배양 70시간 이후 더 이상 수소가 생산되지 않았다. 반면에 glutamate가 함유되지 않은 배지에서는 질소원이 결여되었기 때문에 균체 성장이 낮았지만 30mM malate를 전자공여체로 공급해 주었기 때문에 본 실험조건에서 약 140시간까지 최대 7.7×10<sup>-1</sup> ml H<sub>2</sub>/hr 수소가 생산되

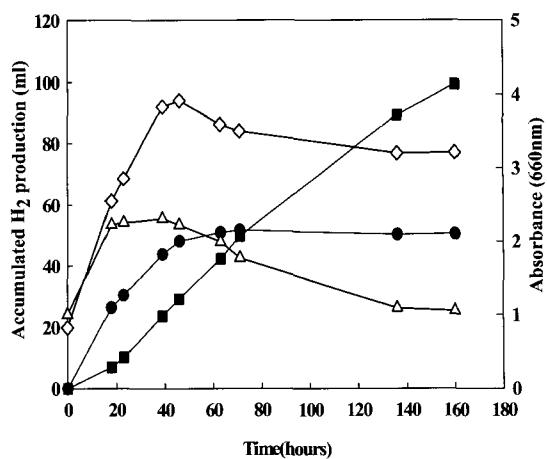


Fig. 6 Effect of glutamate on hydrogen production using malate and glutamate as carbon and nitrogen source, respectively  
50 ml culture broth in 150 ml serum bottle was anaerobically incubated under 108 W/m<sup>2</sup> illuminance using halogen lamp at 30°C.

(■) : Accumulated H<sub>2</sub> production, lacking glutamate  
(●) : Accumulated H<sub>2</sub> production, containing glutamate  
(△) : Absorbance, lacking glutamate  
(◇) : Absorbance, containing glutamate

었다. 배양 70시간 이후에도 꾸준히 수소생산량이 증가하였고 Fig. 6에는 나타내지 않았으나 약 200시간 이후까지도 수소생산이 지속되었다.

### 3.4 빛 세기의 영향

*R. sphaerooides* KD131은 수소를 생산하는 광합성 세균이기 때문에 빛은 수소생산에 영향을 미치는 주요 인자로 작용한다. 빛의 세기가 *R. sphaerooides* KD131의 수소생산에 미치는 영향을 알아보았다. 초기 균체 농도를 OD 1(Abs. 660nm)로 맞추고 탄소원과 질소원으로 각각 30mM malate와 8mM glutamate를 공급해주었으며 30°C에서 할로겐램프를 이용하여 빛의 세기를 0, 54, 108, 162, 216W/m<sup>2</sup>로 맞추어 조사하였다. Fig. 7의 (A)는 각각의 빛의 세기에서 균체 농도가 OD 2.4였을 때의 누적 수소 생산량을 나타낸 것이다. 즉, 균체량을 비롯한 모든 조건을 동일하게 하고 빛의 세기만을 다르게 하여 누적 수소 생산량을 알아보았다. 실험 결과, 빛이 주어지지 않은 조건에서는 수소생산이 전혀 일어나지 않았

## 홍색 비유황 광합성 세균 *Rhodobacter sphaeroides* KD131의 수소생산에 미치는 빛 세기 및 질소원의 영향

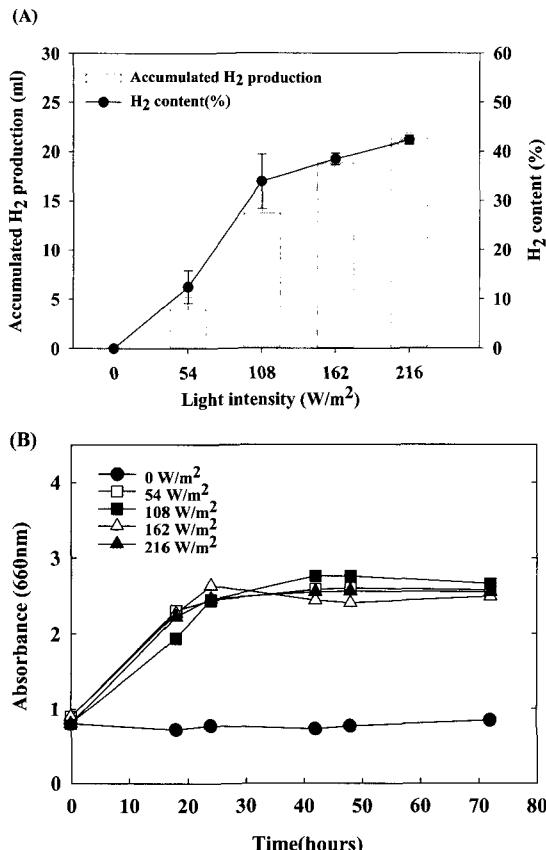


Fig. 7 Effect of light intensity during photo-fermentating *Rhodobacter sphaeroides* KD131 for 48 hours at 30°C.  
 (A) Accumulated  $\text{H}_2$  production of *Rhodobacter sphaeroides* KD131 using different light intensity, when optical density is 2.4  
 (B) Absorbance of *Rhodobacter sphaeroides* KD131 using different light intensity

다. 나머지 빛의 세기에서는 그 세기가 증가할수록 누적 수소 생산량도 증가하는 경향을 나타냈다. 하지만 108 $\text{W/m}^2$ 와 216 $\text{W/m}^2$ 에서 빛의 세기는 2배가 늘어났음에도 불구하고 수소생산량은 1.5배정도 밖에 늘어나지 않았다. 따라서 108 $\text{W/m}^2$ 가 수소 생산 측면에서 가장 에너지 효율적인 빛의 세기임을 알 수 있었다.

Fig. 7의 (B)는 OD 값의 변화를 나타낸 것인데, 빛을 주지 않았을 때를 제외한 나머지 빛의 세기에서는 차이가 없었다. 이로 보아 빛의 세기가 약해도 균체의 성장에는 큰 문제가 없지만 수소생산을 위

해서는 빛 세기가 중요한 요인이라는 것을 알 수 있었다.

이 실험에서 빛 세기를 최대 216 $\text{W/m}^2$ 까지 주고 관찰하였으나 빛 세기 증가에 의한 균체성장 저해 현상은 확인하지 못했다. 그러나 태양광이나 높은 조도에서는 균체가 가지는 bacteriochlorophyll이 파괴되어 백색으로 변한다는 연구 보고가 있는 것으로 미루어 보아 태양광을 이용하는 옥외배양의 경우 광합성 배양기의 제작에 고려할 인자이다<sup>9)</sup>.

## 4. 결 론

- 1) 홍색 비유황 광합성 세균인 *R. sphaeroides* KD131은  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 질소원으로 첨가한 배지에서 균체성장은 배양 8시간부터 43시간까지 증가하였지만 수소생산은 지수성장기 중간인 28시간부터 생활되기 시작하였다.
- 2) 탄소원 및 전자공여체로 malate를 사용하고 질소원으로 glutamate를 첨가한 실험에서 *R. sphaeroides* KD131의 수소생산은 배양 초기인 5시간부터 유도되었다.
- 3) *R. sphaeroides* KD131은 초기 균체 농도가 증가할수록 수소발생량이 증가하는 경향을 보였으나 Abs. 660nm에서의 초기 균체흡광도 1.0을 기점으로 더 이상 증가하지 않았다.
- 4) 빛 세기가 증가할수록 수소생산량이 증가하는 경향을 보였는데 빛 세기가 54 $\text{W/m}^2$ 에서 108 $\text{W/m}^2$ 로 증가했을 때 수소생산량이 약 3.4배 증가했으나 108 $\text{W/m}^2$  이상에서는 그 증가율이 감소하였다.

## 후 기

이 연구(논문)는 교육과학기술부의 지원으로 수행하는 21세기 프론티어연구개발사업(수소에너지 사업단)의 일환으로 수행되었습니다.

## 참 고 문 헌

- 1) Harun Koku, Inci Eroglu, Ufuk Gunduz, Meral Yucel, Lemi Turker : "Aspect of the metabolism

- of hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides*”, International Journal of Hydrogen Energy, Vol. 27, 2002, pp. 1315-1329.
- 2) Eui-Jin Kim, Ju-Sim Kim, Mi-Sun Kim, Jeong K. Lee : “Effect of changes in the level of light harvesting complexes of *Rhodobacter sphaeroides* on the photoheterotrophic production of hydrogen”, International Journal of Hydrogen Energy, Vol. 31, 2006, pp. 531-538.
- 3) Benemann J. : “Hydrogen biotechnology ; Progress and prospects”, Natural publishing group(UK), New York, 1996, pp. 1101-1103.
- 4) Nan-Qi Ren, Bing-Reng Liu, Guo-Xiang Zheng, De-Reng Xing, Xin Qiao, Wan-Qian Guo, Jie Ding : “Strategy for enhancing photo-hydrogen production yield by repeated fed-batch cultures”, International Journal of hydrogen energy, Vol. 34, 2009, pp. 7579-7584.
- 5) Basar Uyar, Inci Eroglu, Meral Yucel, Ufuk Gunduz, Lemi Turker : “Effect of light intensity, wavelength and illumination protocol on hydrogen production in photobioreactors”, International Journal of Hydrogen Energy, Vol. 32, 2007, pp. 4670-4677.
- 6) 김미선, 문광웅, 이상근, 김선창 : “*Rhodopseudomonas sphaeroides*에 의한 수소 생산”, Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol. 26, No. 2, 1998, pp. 89-95.
- 7) Matthew R. Melnicki, Lucia Bianchi, Roberto De Philippis, Anastasios Melis : “Hydrogen production during stationary phase in purple photosynthetic bacteria”, International Journal of Hydrogen Energy, Vol. 33, 2008, pp. 6525-6534.
- 8) 신종환, 박태현 : “생물학적 수소생산 공정”, Korean Chem. Eng. Res., Vol. 44, No. 1, 2006, pp. 16-22.
- 9) Mi-Sun Kim, Jin-Sook Baek, Jeong K. Lee : “Comparison of H<sub>2</sub> accumulation by *Rhodobacter sphaeroides* KD131 and its uptake hydrogenase and PHB synthase deficient mutant”, International Journal of Hydrogen Energy, Vol. 31, 2009, pp. 121-127.