

Rhodopseudomonas sphaeroides 고정화균체의 자동조절 옥외 반연속배양에 의한 수소생산

김진상* · 배 무¹

부산수산대학교 미생물학과, ¹이화여자대학교 생물학과

Production of Molecular Hydrogen by Automatically Controlled Semi-continuous Outdoor Culture Using Immobilized Cells of *Rhodopseudomonas sphaeroides*

Kim, Jihn-Sang* and Moo Bae¹

Department of Microbiology, National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea

¹Department of Biology, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

Abstract — For the photoproduction of molecular hydrogen by photosynthetic bacteria in outdoor conditions, we constructed automatically controlled semi-continuous culture system. When the amount of hydrogen gas produced can be measured by a gas meter with a pulse generator, the same amount of substrate consumed for hydrogen production could be supplied by micropump related with timers. Using the apparatus, we examined hydrogen production with immobilized cells of *Rhodopseudomonas sphaeroides* B6 in outdoor conditions. In spite of severe fluctuation of weather and illumination, the culture was maintained under good control with regard to hydrogen productivity. It was possible to automate the semi-continuous outdoor culture of photosynthetic bacteria for hydrogen production.

광합성세균에 의한 광의존 수소생산은 1949년 Gest와 Kamen(1)에 의해 홍색비유황세균의 일종인 *Rhodospirillum rubrum*에 있어서 처음으로 발견된 이래, 생물학적 태양에너지 전환의 한 가지 방법으로서 많은 연구자들에 의해 발전되어 왔으며(2-4), 저자 등은 특히, 홍색비유황세균에 의한 수소생산에 흥미를 가지고 그 실용화를 위한 기초연구를 수행해 왔다. 광합성세균에 의한 실용적 수소생산은 결국 옥외조건에서 자연광을 이용하여 실시하게 될 것이며, 연구자 등은 열대산 광합성세균인 *Rhodopseudomonas sphaeroides* B5 또는 B6(5)를 이용한 옥외 회분배양(6) 및 옥외 반연속배양(7)을 통하여 태양광 이용조건에서 효율적인 수소생산의 가능성을 보였다. 한편, Zürrer와 Bachofen(8) 그리고 김 등(9)은 각기 *R. rubrum*과 *R. sphaeroides*를 이용하여 실험실 조건에서

연속배양에 의한 수소생산에 대하여 보고하였다. 그러나, 실내의 일정한 조건에서는 배양의 기계적인 자동조절이 용이하지만, 일조량과 기온 등이 항상 가변적인 옥외조건에서는 일반적인 연속 또는 반연속배양에 의한 수소생산의 자동조절이 곤란하다. Taga 등(10)은 섬유질분해성 혐기세균인 *Ruminococcus albus*의 배양에 있어서 생성가스를 조절 indicator로 한 자동조절 반연속배양에 대하여 보고한바 있으나, 광합성세균의 수소생산에 있어서는 아직 시험되지 않았다.

연구자 등은 *R. sphaeroides* B6의 agar gel 고정화균체를 이용하여 실험실내에서 옥외조건에 가까운 12시간 주기의 광조사조건으로 일정량의 수소생산시마다 그에 소비된 만큼의 기질(lactate)을 함유하는 기본배지를 주기적으로 공급하는 반연속 배양을 실시하여 제량의 수소가 지속적으로 생산됨을 확인했으며, 그에 의해 보다 효율적인 기질의 공급과 더불어 가변적인 태양광 이용조건에 대응되는 자동조절 배

Key words: Hydrogen production, automatic outdoor culture, immobilized *R. sphaeroides* cells.

*Corresponding author

양시스템의 구성이 가능함을 시사하였다(11). 본 연구에서는 간단히 측정할 수 있는 생산물인 수소가스를 조절 indicator로 하고, 배양조와 접속된 가스미터에 설치한 pulse 발진 sensor(수소 100 ml 생산당 1 pulse 발진)에 의해 타이머와 연결된 2대의 정량펌프가 교호연동되어 배양액의 배출과 신선한 배지의 공급이 이루어지는 자동조절 배양장치를 준비하여, 옥외조건에서 *R. sphaeroides* B6의 agar gel 고정화균체에 의한 수소생산 실험을 실시하였기에 그 결과를 보고코자 한다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

저자 등이 분리·동정한 열대산의 *Rhodospseudomonas sphaeroides* B6(5)를 본 실험에 사용하였고, Ormerod 등(12)의 최소배지를 전보(13)에서와 같이 수정하여 기본배지로 사용하였다.

배양장치 및 작동원리

옥외 실험용 배양장치로서 10 mm 두께의 투명한 아크릴 수지제로 제작한 5l 용량의 배양조(수광면: 40 cm×28 cm, 광투과 깊이: 5 cm)에 배지 주입구, 배양액 배출구, 가스출구, 시료 채취구, 배양조내압

측정용 manometer 및 유리냉각관을 설치하였다. 가스출구는 gas meter(wet type, model W-NK, Shinagawa Works Co., Ltd., Japan)와 접속하여 수소생산량을 측정하고, 일정량의 수소생산에 따른 기질의 기계적 자동공급을 위하여는 gas meter에 설치한 바늘의 회전을 감지하는 광전파 sensor(Sharp, model GP-450, Japan)와 timer 및 2대의 정량펌프(micro tube pump, model MP-3A, EYELA Tokyo Rikakikai Co. Ltd., Japan)를 이용하였다. 즉, 배양에 의해 생산되는 수소가 가스미터에 유입되면 메터의 바늘이 회전(1회전=100 ml)하게 된다. 바늘의 1회전 신호가 sensor에 의해 전자조절장치에 전달되면, timer완 연동하여 배양액 배출 펌프가 작동하며, 그 조작이 종료됨과 동시에 배지주입 펌프가 연동되어 배양액의 배출과 배지의 공급이 가능하게 하였다. 이 때 배양액의 배출량과 배지의 공급량은 펌프의 유속과 timer의 작동시간을 사전에 설정함에 의해 임의로 조절할 수 있다. Fig. 1은 상술한 수소생산 실험용 반연속배양 장치를 도시한 것이며, Fig. 2는 본 장치의 자동조절을 위한 전자회로도를 나타낸 것이다.

균체고정화 및 배양방법

10 mM의 ammonium sulfate와 30 mM의 sodium DL-lactate 함유 기본배지에 혐기-광조사(10 klux)

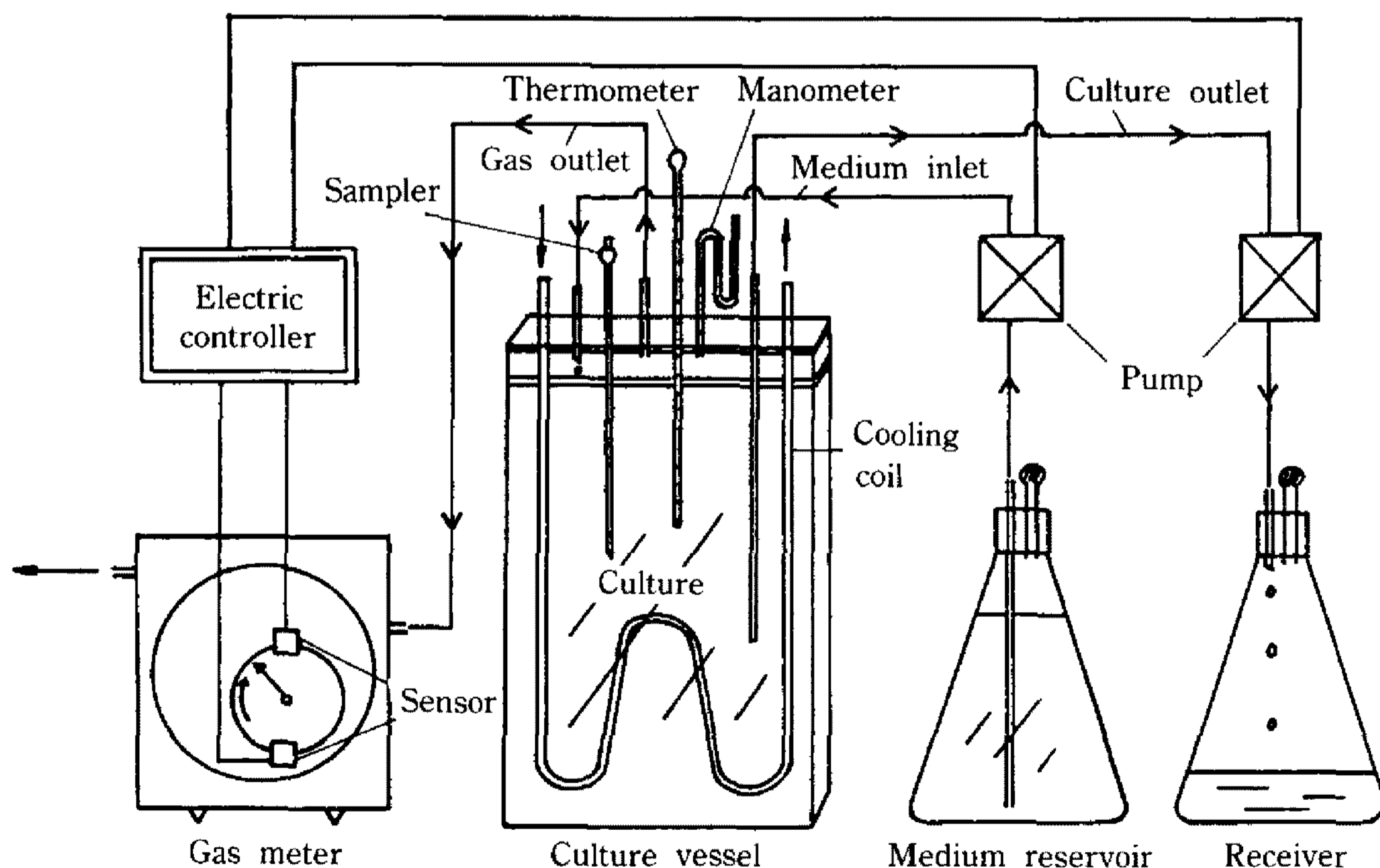


Fig. 1. Apparatus for hydrogen production by automatically controlled semi-continuous outdoor culture of *R. sphaeroides* B6.

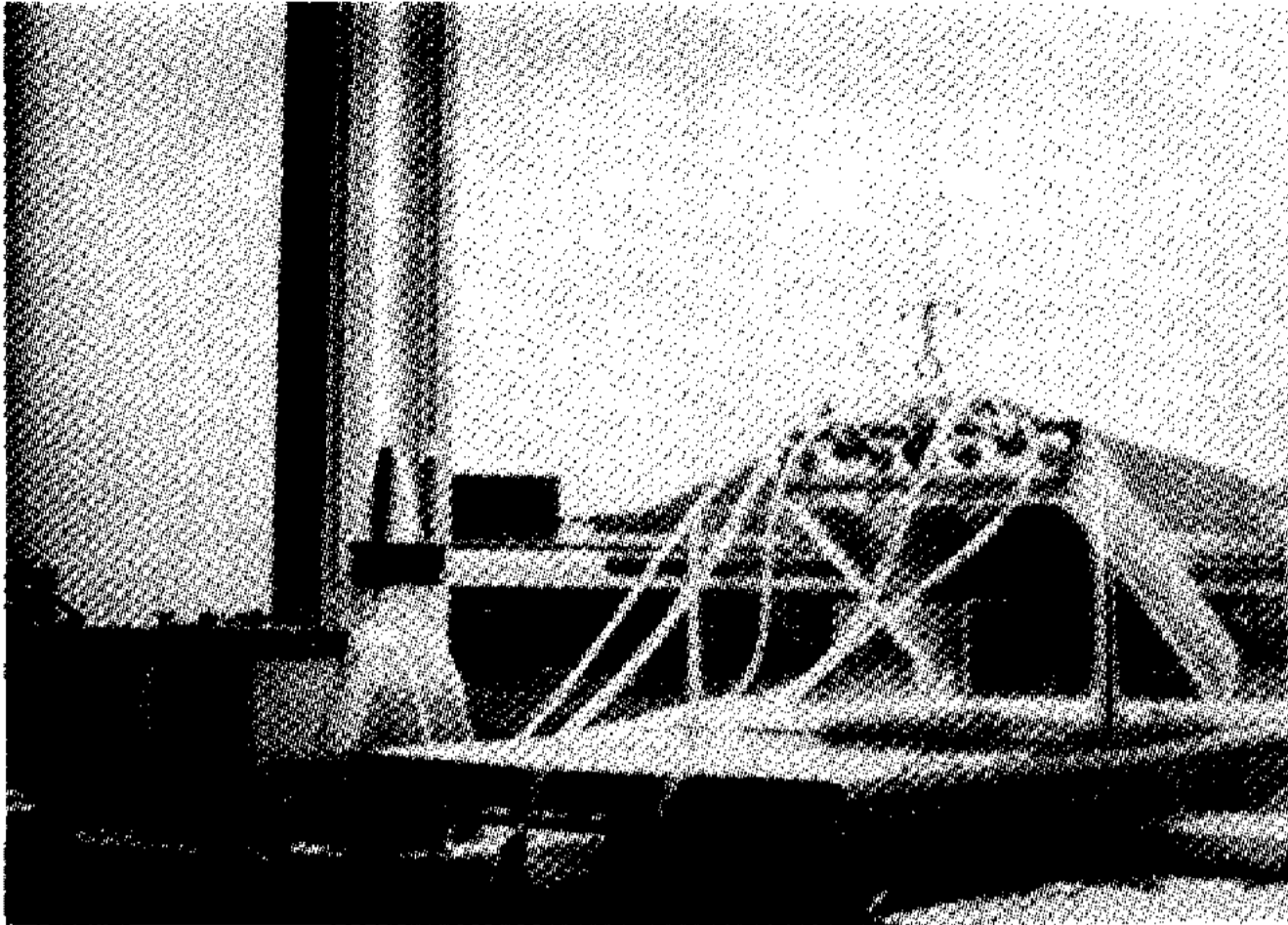


Fig. 3. Photograph of the outdoor culture on the 30th day of incubation.

Culture vessel inclined at 30°C to receive more sunlight.

0.93 mmole의 lactate가 필요하게 된다. 또, 질소원인 glutamate의 경우 *R. sphaeroides*의 수소생산을 위한 배지의 최적 C/N ratio를 5로 보면(13), 0.186 mmole이 필요하였다. 여기서 100 ml의 수소생산당 40 ml씩의 배지를 공급한 것은 실험실조건에서 1l의 수소생산당 400 ml의 배지를 공급한 조건(11)이 가장 적합하였기 때문이다.

Fig. 3은 배양 30일째(1989. 9. 23)에 촬영한 배양 풍경 사진이며, Fig. 4는 같은 날의 일조량, 배양온도 그리고 수소생산의 경시적 변화를 나타낸 것이다. 일조강도와 배양액온이 점차 높아짐에 따라 수소생산이 증가되어 배양온도가 약 40°C, 태양광의 강도가 최대(약 150 klux)에 달한 11.00시~12.00시 사이에 최고 387 ml/hr/1l gel(2.85 mg dry cells/ml gel)의 수소생산속도를 나타내었다. 그 후 수소생산속도는 일조량의 변화에 의존하여 증감되었고, 14.00시 이후 조도가 약화됨에 따라 급격히 감소되었다. 이날의 외기온이 최저 22°C~ 최고 34°C로 높았던 관계로 배양온도가 9.00시~19.00 사이의 낮 동안 30°C 이상 상승하였으며, 본 실험에 사용한 균주는 수소생산에 있어서 40°C까지 안정성을 나타내므로(5), 배양조에 설치한 냉각관에 의해 배양액온을 40°C 이내로 유지시켰다. *R. sphaeroides* B5의 옥외 회분배양에 있어서 수소생산이 광조사에 의존되고, 배양액은 또한 중요한 인자임을 밝힌 바 있다(6). 본 실험(Fig. 4)에서는 일조기간 동안 배양온도가 35°C~40°C의 최적온 범위로 유지되었으므로 수소생산이 광조사에만 의존되는 것으로 보이지만, 보다 낮은 온도에서는 온도의 영향을 배제할 수 없다고 본다.

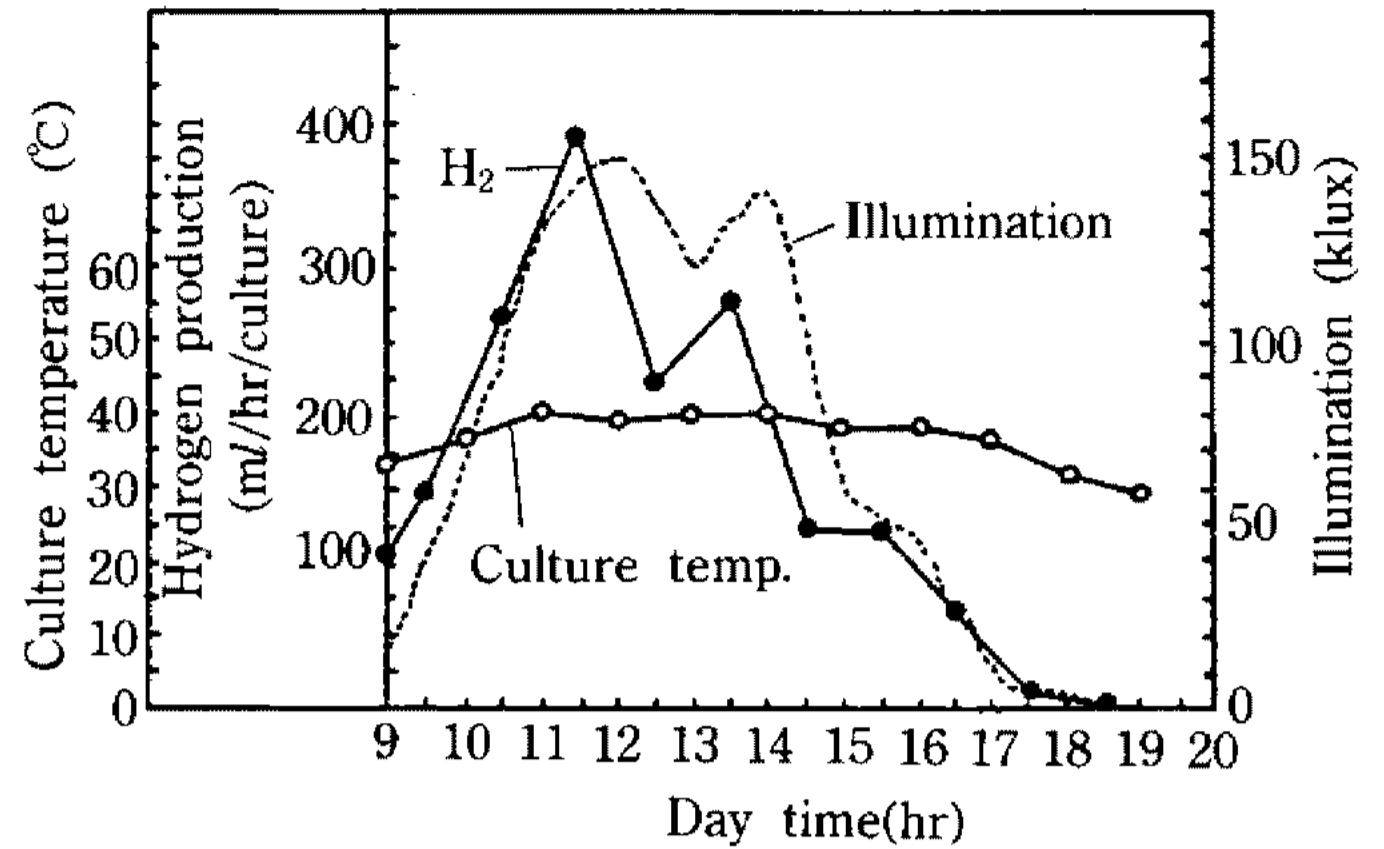


Fig. 4. Hydrogen production by outdoor culture at the 30th day of incubation (Sep. 23, 1989).

The amount of hydrogen production plotted at the middle of each hour.

Fig. 5는 전배양기간 동안의 수소생산량 및 일간의 수소생산량의 변화를 나타낸 것이다. 33일간의 배양 기간 동안 배양전기와 후기의 맑게 개인날(5일간)에는 1120~1840 ml/day/1l gel(2.85 mg dry cells/ml gel)의 속도로 최대량의 수소가 생산되었고, 중반기에는 흐리거나 비오는날(18일간)이 계속되어 약간의 수소(50~390 ml/day)만이 생산되었으며, 다소 흐린 날(10일간)에는 550~936 ml/day의 속도로 수소가 생산되었다. 긴 장마기를 거쳐 배양후기의 개인날에 이르러 수소생산이 거의 배양초기 수준으로 회복되었으므로(Fig. 5), 1989년 9월 26일에 배양을 정지하였다. 전배양기간 동안 gel을 침적한 배양액의 pH는 6.8~7.2의 범위로 거의 일정하게 유지되었고, 생산 가스 중의 수소농도는 75~85%였으며 나머지는 CO₂였다. 배양종료시까지 agar gel 평판은 거의 원형을 유지하였으나 생성된 기포의 탈기로 인한 부분적인 균열이 관찰되었다. 배양기간 동안 격심한 일조와 기상의 변동에도 불구하고 본 장치는 시종 잘 작동되어 총 156회의 pulse가 발진하였고, 전량 6.25l의 배지가 교체공급되었으며, 지속적으로 전량 15.6l의 수소가 생산되었다.

Table 1은 이상의 자동조절 옥외반연속 배양의 결과를 요약한 것이다. 1 mole의 lactate로부터 6 mole의 수소가 생산되는 이론식($\text{CH}_3\text{CHOHCOOH} + 3\text{H}_2\text{O} = 6\text{H}_2 + 3\text{CO}_2$)에 대한 공급 lactate의 수소에너지의 전환 효율은 66.3%였다. 이미 보고한 옥외반연속 액체배양(7)에 의한 맑게 개인날(16일간)의 평균 수소생산속도는 3.9l/day/6l culture 였으며, 이 값은 약 0.65l/day/1l culture에 해당한다. 본 실험에 있어서 33일

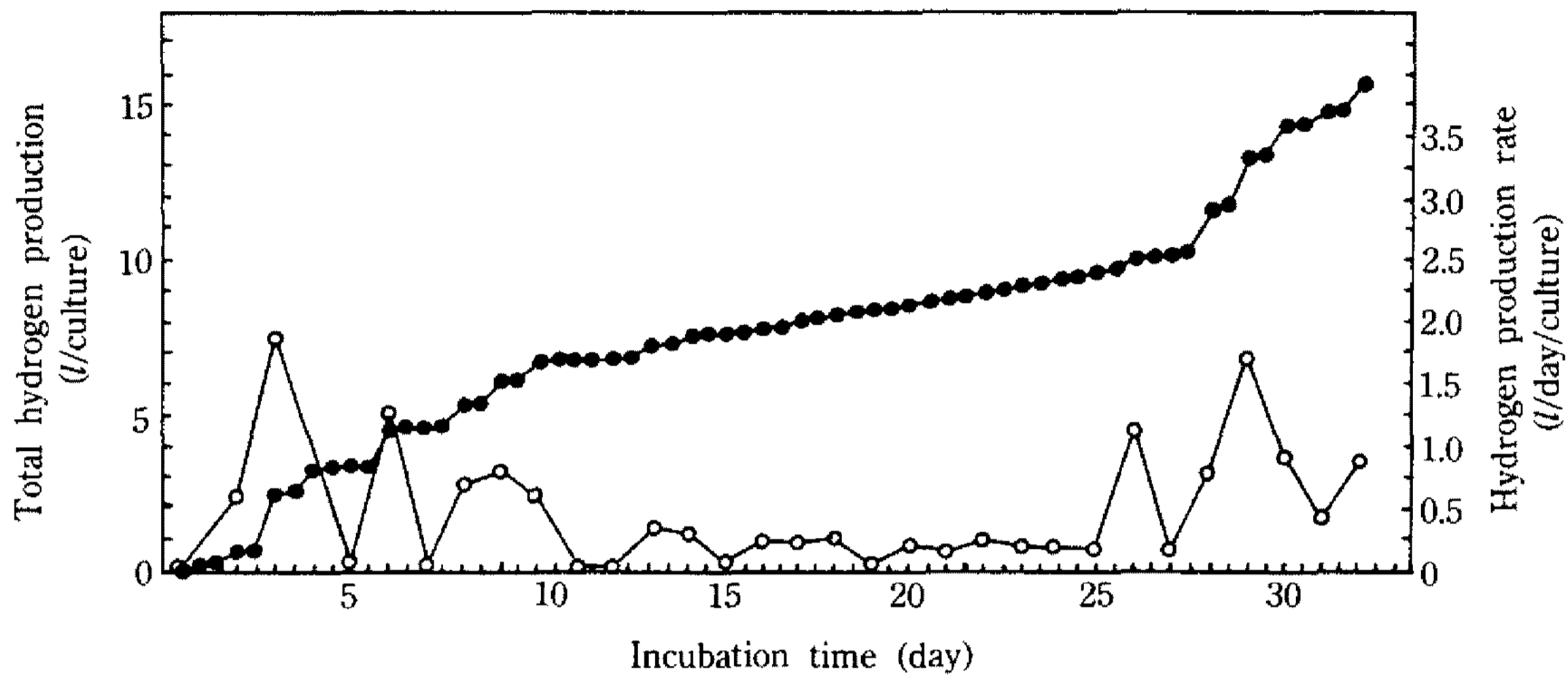


Fig. 5. Time courses of hydrogen production in outdoor culture.

Symbols: Total hydrogen production (●-●) and hydrogen production rate (○-○).

Table 1. Production of hydrogen by automatically controlled semi-continuous outdoor culture of immobilized cells of *R. sphaeroides* B6

Duration of culture (days)	Total amount of lactate supplied (mmoles)	Hydrogen evolved (liter)	Conversion efficiency (%)
33	170.08	15.60	66.30

The highest ambient temperature was about 35°C and the minimum about 21°C.

간의 배양기간 동안 청명한 날이 5일간이었고, 이때의 평균 수소생산속도는 1.48 l/day였으므로 보다 좋은 결과를 얻었다. 이들의 결과는 옥외의 태양광 이용조건에서 본 배양시스템에 의해 광합성세균의 수소생산을 위한 배양의 자동조절이 가능함을 나타내는 것이다.

요 약

광합성세균에 의한 광의존 수소생산에 있어서 상시 가변적인 태양광 이용조건에 대응되는 자동조절 반연속배양장치를 구성하였다. 이는 pulse 발생장치를 설비한 가스미터에 의해 일정의 수소생산량이 측정되면, 수소생산에 소비된 만큼의 기질이 timer와 연결된 정량펌프에 의해 공급될 수 있는 시스템이다. 이 배양장치를 이용하여, 옥외조건에서 *Rhodospseudomonas sphaeroides* B6의 agar gel 고정화균체에 의한 수소생산 실험을 시도하였다. 일조와 기후의 격심한 변동에도 불구하고 배양이 잘 조절되어 수소생산성이 유지되었다. 이는 광합성세균의 수소생산을 위한 옥외

반연속배양의 자동조절 가능성을 나타내는 것이다.

감사의 말

본 연구는 1986-1989년도 한국과학재단의 목적기초연구비 지원에 의해 수행된 것으로, 재단의 지원에 깊이 감사드립니다. 또한, 본 연구에 협력해주신 부산수산대학교 전자공학과 권태하 교수께 진심으로 감사드립니다.

참고문헌

- Gest, H. and D. Kamen. 1949. Photoproduction of molecular hydrogen by *Rhodospirillum rubrum*. *Science* **109**: 558-559.
- Weaver, P.F., S. Lien and M. Seibort. 1980. Photobiological production of hydrogen. *Solar Energy* **24**: 3-45.
- Zurrer, H., 1982. Hydrogen production by photosynthetic bacteria. *Experimentia*. **38**: 64-66.
- Mitsui, A., E.J. Phips, S. Kumazawa, K.J. Reddy, S. Ramchandran, T. Matsunaga, L. Haynes and H. Ikemoto. 1983. Progress in research toward outdoor biological hydrogen production: Using solar energy; sea water and marine photosynthetic microorganisms. *Ann. Rev. New York Acad. Sci.* **413**: 514-530.
- Watanabe, K., J.S. Kim, K. Ito, L. Buranakarl, T. Kampee and H. Takahashi. 1981. Thermostable nature of hydrogen production by non-sulfur purple photosynthetic bacteria isolated in thailand. *Agric. Biol. Chem.* **45**: 217-222.

6. Kim, J.S., K. Ito and H. Takahashi. 1981. Production of molecular hydrogen in outdoor batch cultures of *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *Agric. Biol. Chem.* **46**: 937-941.
7. Kim, J.S., Ito, K. Izaki and H. Takahashi. 1987. Production of molecular hydrogen by a semi-continuous outdoor culture of *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *Agric. Biol. Chem.* **51**: 1173-1174.
8. Zürrer, H. and R. Bachofen. 1979. Hydrogen production by the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Applied Environmental Microbiology* **37**: 789-793.
9. Kim, J.S., K. Ito, K. Izaki and H. Takahashi. 1987. Production of molecular hydrogen by a continuous culture under laboratory conditions. *Agric. Biol. Chem.* **51**: 2591-2593.
10. Taya, M., K. Ohmiya, T. Kobayashi and H. Shimizu. 1980. Monitoring and control of a cellulolytic anaerobe culture by using gas evolved as an indicator. *J. Ferment. Technol.* **58**: 463-469.
11. Kim, J.S., Y.K., Y.K. Hong, I.S. Sin, H.R. Cho and D.S. Chang. 1992. Effective supply of substrate for hydrogen production by immobilized cells of *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 79-84.
12. Ormerod, J.G., K.S. Ormerod and H. Gest. 1961. Light-dependent utilization of organic compounds and photoproduction of molecular hydrogen by photosynthetic bacteria: Relationships with nitrogen metabolism¹. *Arch. Biochem. Biophys.* **94**: 449-463.
13. Kim, J.S., Y.K. Hong, I.S. Sin, H.R. Cho and D.S. Chang. 1991. Optimum culture conditions for hydrogen production of *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 179-185.

(Received February 15, 1992)