

## *Rhodopseudomonas sphaeroides*와 *Clostridium butyricum*의 혼합배양을 통한 수소생성의 연속발효계

고영현 · 배 무\*

이화여자대학교 생물과학과

**Hydrogen Evolution through Mixed Continuous Culture of *Rhodopseudomonas sphaeroides* and *Clostridium butyricum*. Go, Young-Hyun and Moo Bae\*.** Department of Biological Science, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea - The purpose of this study was to optimize the conditions of continuous mixed culture of *C. butyricum* and *R. sphaeroides* K-7, which were able to produce hydrogen using biomass-derived substrate. To investigate the possibility of continuous culture, semi-continuous culture was carried out for 20 days. In semi-continuous culture using the reactor system, the replacement rate of fresh medium was 30% of total medium volume for the highest hydrogen evolution. In continuous culture, the optimum dilution rate was determined to be 0.05 h<sup>-1</sup>. The continuous culture produced 3.1 times as compared with the hydrogen on batch culture. On the other hand, the continuous mixed culture produced 1.3~2.1 times as much as hydrogen of the continuous monoculture of *C. butyricum*. When 10 g of glucose in the media (1 l) was supplied as a carbon source on continuous culture, mixed culture of *C. butyricum* and *R. sphaeroides* K-7 increased hydrogen evolution rate. Because considerable amount of glutamate was contained in waste water of glutamate fermentation, utilization of glutamate was examined in mixed culture. As a result of examination, production of hydrogen was slightly inhibited by high concentration of glutamate, more than 20 mM, on continuous monoculture of *R. sphaeroides* K-7. On the other hand, both on continuous monoculture of *C. butyricum* and on mixed culture of *C. butyricum* and *R. sphaeroides* K-7, production of hydrogen was not inhibited by high concentration of glutamate such as 100 mM. Hence this suggests that high concentration of waste water can be used as good substrate for hydrogen production on monoculture of *C. butyricum* and mixed culture of *C. butyricum* and *R. sphaeroides* K-7.

**Key words:** hydrogen evolution, continuous culture, semi-continuous culture, dilution rate

산업화의 진전에 따라 심각한 대기오염과 화학연료의 고갈현상이 나타나게 되었다. 따라서, 최근 생물학적인 방법에 의한 대체에너지의 개발에 관한 연구가 활발히 진행중에 있으며, 이 중 수소는 열효율이 높은 energy carrier로서 연소 후 대기오염물질을 방출하지 않고, 미생물에 의해 폐기물로부터도 생산될 수 있는 청정에너지 원으로 주목받고 있다[4, 28, 30, 34].

자연계에서 수소를 생성하는 미생물로는 조류, 광합성 조류, 광합성 세균, 통성 혐기성 세균, 절대 혐기성 세균, 호기성 세균 등으로 넓게 분포되어 있다[18, 33]. 이러한 미생물에 의한 수소생성은 산소에 민감한 hydrogenase 및 nitrogenase에 의해 일어나므로 절대혐기상태를 유지해야 하며, 회분발효시 대사산물이 축적됨에 따라 균체 증식과 수소 생성속도가 감소되는 문제점이 따르므로[7, 29], 근래에 이를 해결하고자 수소생성 미생물의 고정화[11, 21], 혼합배양 및 연속배양에 의한 수소생성[23,

31], 유전자조작에 의한 수소생성 등의 연구[19]가 이루어지고 있다.

발효방식에는 회분발효, fed-batch식 발효, 연속발효가 있으며[2], 지금까지 *Clostridium* sp.과 같은 절대혐기성 균과 *Rhodopseudomonas* sp.과 같은 광합성 세균을 대상으로 한 연속배양계에 의한 수소생성에 관한 연구가 활발히 진행되어 왔다[12, 16, 17]. *Clostridium* sp.은 다효소계를 이용하여 유기물질로부터 높은 수율로 수소를 생성하는 절대 혐기성 화학 영양 세균으로 잘 알려져 있으나, 포도당으로부터 수소이외에 균체의 증식과 수소생성능을 감소시키는 유기산을 생성하는 단점이 있다[9]. 반면 광합성 세균은 증식속도가 느리고, 수소생성을 위해 광조사가 수반되는 에너지 소모가 높은 단점이 있으나, 광조사 조건하에서 유기산을 이용하여 수소를 생성할 수 있는 잇점이 있다[8, 30].

본 연구에서는 대체에너지 연구 개발의 일환으로 수소생성을 위하여 혐기성 세균인 *C. butyricum*과 광합성 세균인 *R. sphaeroides* K-7의 혼합배양을 통해 각 균주의

\*Corresponding author  
Tel. 82-2-360-2361, Fax. 82-2-360-2385

**Table 1. Composition of modified PYG medium**

Components	Concentration (/l)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.9 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.9 g
NaCl	0.9 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.9 g
*MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.09 g
*CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.09 g
Peptone	10.0 g
Yeast extract	5.0 g
Cystein · HCl	0.5 g
*Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> · 10H <sub>2</sub> O	4.0 g
ρ-Aminobenzoic acid	100.0 μg
Biotin	10.0 μg
Resazurin	100.0 μg
*Glucose	10.0 g
	(pH 7.0)

\*Separately autoclaved.

단점을 보완할 수 있도록 하였으며, 혼합배양시의 여러 기질 이용성을 조사하고, 수소의 대량생산에 의한 실용화 가능성과 효율적인 수소생성을 위하여 연속발효를 통한 수소 생성계를 확립하고자 하였다.

**재료 및 방법**

**시용균주 및 발효배지**

본 실험에서는 혐기성 세균 *Clostridium butyricum* NCIB 9576과 광합성 세균 *Rhodospseudomonas sphaeroides* K-7[1]을 사용하였고, *C. butyricum*의 수소 생성능 검토용 발효배지와 계대배양용 배지로는 PYG배지[24]를 변형하여 사용하였고, 그 조성은 Table 1과 같다. *R. sphaeroides*의 수소 생성능 검토용 발효배지와 계대배양용 배지로는 Ormerod 배지[27]를 변형하여 사용하였으며, 그 조성은 Table 2에 나타내었다. 두 균주의 혼합배양시, 수소생성능 검토용 배지는 Ormerod 배지를 변형하여 사용하였으며, 그 조성 역시 Table 2에 나타내었다.

**균주의 배양**

Hungate technique을 기초로 한 serum bottle modification technique[22]을 적용하였다. 균체의 접종시 세포의 농도와 상태를 일정히 유지하기 위하여 휴면 세포 현탁액을 만들어 사용하였다[13]. 대수증식기 말기까지 배양된 세포를 원심분리하여 회수하고, 멸균된 10 mM potassium phosphate 완충용액(*Clostridium*의 경우는 pH 7.0, *Rhodospseudomonas*의 경우는 pH 6.8)로 2회 세척한 후, 같은 완충용액에 다시 현탁하여 이 현탁액을 사용하기 전까지 4℃에서 냉장보관하였다. 수소생성 및 당 발효 검토시에는 배지 1 l를 포함한 1.6 l용량의 반응

**Table 2. Composition of modified Ormerod medium**

Basal salt solution <sup>1)</sup>	100 ml
*DL-Malate	30 mM
L-Glutamate	7 mM
Phosphate solution <sup>2)</sup>	15 mM
Vitamine solution <sup>3)</sup>	1 ml
monoculture : pH 6.8 mixed culture : pH 8.0	
*: Glucose 10.0g in mixed culture	
1) Basal salt solution	
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2 g
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.75 g
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.118 g
♣Trace element sol.	10 ml
D. W.	800 ml
EDTA	0.2 g
(in D. W. 190 ml, pH=6.8)	
♣Trace element solution	
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	2.1 g
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	2.8 g
Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 3H <sub>2</sub> O	40 mg
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	240 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	750 mg
2) Phosphate solution	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	40 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	60 g
3) Vitamine solution	
Thiamine	10 mg
ρ-aminobenzoic acid	20 mg
D. W.	10 ml

기에서 혐기적 정치배양을 하였으며, 온도 유지를 위해 30~37℃의 수조내에서 작동하였다. *R. sphaeroides*의 배양과 혼합배양의 경우는 백열등(200 w)으로 약 10,000~12,000 Lux가 되게 광 조사하여 주었다[6].

**Reactor System의 설계**

**회분발효** O<sub>2</sub>-free argon gas로 혐기적 조건을 갖춘 1 l의 배지가 든 1.6 l용량의 반응기(Pyrex)를 30~37℃의 수조내에서 광 조사하면서 배양하였다. 반응기내의 배양 배지의 채취를 용이하게 하기 위해 수조내에서도 작동이 가능한 magnetic stirrer를 이용해 교반해 주었다[26]. 배지의 채취는 peristaltic pump를 이용하였고, 생성된 가스의 포집은 water trap장치를 변형시켜 사용하였다[15].

**반연속발효** 위의 회분 발효의 경우와 모두 동일하며, 회분 발효의 방법으로 발효를 진행하다가 초기에 공급된 기질이 고갈되어 수소 생성 속도가 떨어지고 세포의 증식이 대수증식기 말기까지 도달할 때마다, 새 배지를 반연속적으로 공급하였다[26]. 배지의 치환은 peristaltic

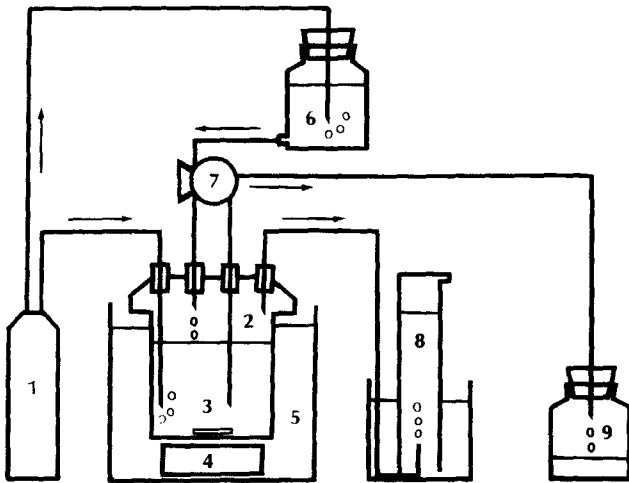


Fig. 1. Schematic diagram of reactor system for hydrogen evolution.

1. Argon gas tank (Medium was sparged with argon gas just for once in preparation of medium)
2. Reactor vessel
3. Culture medium
4. Magnetic stirrer
5. Water bath (30~37°C)
6. Fresh medium reservoir
7. Peristaltic pump
8. Gas collector
9. Spent medium reservoir

pump를 이용해 배양액의 부피를 일정하게 유지하였다.

연속발효 위의 회분발효의 경우와 모두 동일하며, 회분발효의 방법으로 발효를 진행하다가 기질이 고갈되어 수소생성속도가 떨어질 때부터 새 배지를 연속적으로 공급해 주었다[25].

이상의 reactor system의 모식도는 Fig. 1과 같다.

**혼합배양시 초기 건조균체량의 측정**

혼합배양시 초기의 각 균주의 접종비율을 결정하기 위하여 파장 660 nm에서 Spectrophotometer(Hitach U-2000)로 흡광도를 측정하고 이 흡광도와 건조 균체량(mg/ml)간의 관계를 구하였다. 흡광도를 건조균체량으로 환산하여 혼합배양시 초기 접종 비율을 결정하였다.

**수소 생성량의 측정**

협기적 상태에서 정지배양한 배양액으로부터 발생되는 기체상의 시료는 gas tight syringe로 0.3 ml 취하여 gas chromatography(Shimadzu, GC-14A)로 분석하였다. 수소의 양은 spectrum의 peak면적으로 환산하였으며, 순수한 수소로 표준 곡선을 작성하여 이에 준하여 정량하였다[14].

**유기산과 유기용매의 정량**

배양액내의 발효 산물인 유기산의 분석은 gas chromatography를 사용하였다. 배양액을 원심분리(12000 rpm, 10분)하여 균체가 제거된 상등액 1 ml을 취하여 5

N HCl 0.125 ml로 산성화하고, 내부 표준 물질로 0.1% n-propanol 1 ml을 첨가하여 분석하였다[5, 20, 26].

**수용성 환원당량의 정량**

배양액내의 수용성 환원당의 정량에는 DNS(Dinitro-salicylic acid)발색법을 사용하였다. 배양액을 12000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액 3 ml과 DNS시약 3 ml을 혼합한 후 5분간 끓이고 즉시 40% Rochelle salt solution 1 ml을 첨가한다. 이 혼합물을 냉각수로 냉각시킨 후 575 nm에서 흡광도를 측정하고 당 농도와 흡광도 간의 표준 곡선에 준하여 정량하였다.

**결과 및 고찰**

**C. butyricum NCIB 9576과 R. sphaeroides K-7의 회분배양에 의한 혼합배양**

혼합배양시 두 균주의 접종비율 혼합배양시 목적하는 산물의 생성 수율을 극대화하기 위하여 혼합균주의 초기접종비율이 중요한 것으로 생각되어 두 균주의 배양 초기 접종비율에 따른 수소 생성량을 조사하였다. 총 세포 농도를 0.2 mg/ml로 고정하고, 다양한 비율로 두 균주를 혼합하여 동일 조건하에서 배양하였다. C. butyricum과 R. sphaeroides의 건조균체량의 비율이 1:6일 때 최대의 수소 생성량을 나타내었으며(Table 3.), 이는 중간 특이적인 catabolic enzyme의 조절 성질과 활성의 고유 특징에 의해 최종 산물로 생성되는 수소의 양이 변화되는 것으로 알려져 있다.

혼합배양시 두 균주의 혼합시기 수소의 생성 증대를 위하여 혼합배양시 두 균주의 혼합시기에 의한 영향을 관찰하고자 두 균주 중 한 균주는 배양 최초에 접종하고

Table 3. Determination of initial cell ratio in batch mixed culture on hydrogen evolution

Initial ratio of DCW <i>C. butyricum</i> : <i>R. sphaeroides</i>	Hydrogen evolution ( $\mu$ l/ml of culture, $\times 1000$ )
10:0	0.619
9:1	0.603
4:1	0.648
6:1	0.721
3:2	0.629
1:1	0.513
2:3	0.602
<b>1:6</b>	<b>0.812</b>
1:4	0.809
1:9	0.493
0:10	0.653

Hydrogen evolution was determined after 120 hr incubation. Medium used was modified Ormerod medium and initial total cell concentration was 0.2 mg/ml of culture.

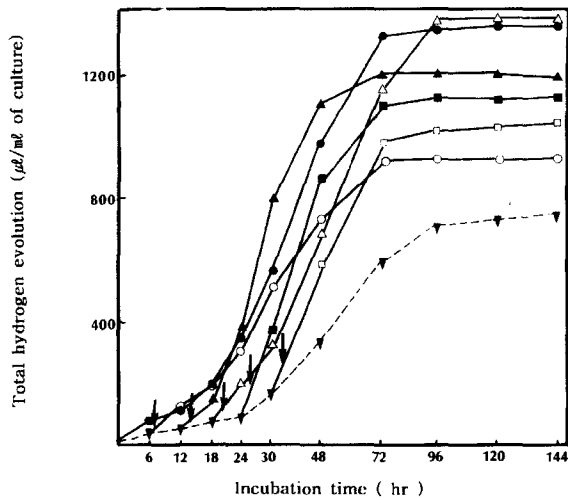


Fig. 2. Effect of mixing time of partner strain on hydrogen evolution in batch culture.

Arrows (↓) indicate inoculation of *R. sphaeroides* K-7.  
 ▼: not mixed, only *C. butyricum* NCIB 9576  
 ●: mixed after 0 hr incubation  
 ○: mixed after 6 hr incubation  
 ▲: mixed after 12 hr incubation  
 △: mixed after 18 hr incubation  
 ■: mixed after 24 hr incubation  
 □: mixed after 30 hr incubation

나머지 균주의 접종시기를 변화시키면서 수소 생성량을 비교하였다. 그 결과, *R. sphaeroides*를 먼저 접종하고 *C. butyricum*을 나중에 접종하는 경우 보다 *C. butyricum*을 배양초기에 먼저 접종하고, 대수 증식기에 이르러 *R. sphaeroides*를 접종하는 경우가 수소생성이 더 유리함을 알 수 있었다. 또한 Fig. 2에서와 같이 *C. butyricum*을 접종한 후, 18시간 후에 *R. sphaeroides*를 접종해 주는 것이 가장 우수한 수소 생성을 보여주는 것으로 나타났다. 이는 대수 증식기에 이른 *C. butyricum*이 균체증식 및 수소 생성에 불리한 유기산을 생산하게 되고, 이 때 *R. sphaeroides*를 혼합해 줌으로써 생산된 유기산을 소모할 수 있게 되어 급격하게 변하는 pH의 감소를 완화시켜 주고 경쟁적인 기질 소모를 억제하여 안정된 혼합 배양계를 확립할 수 있음을 보여 준다[10].

회분배양을 통한 단독·혼합배양의 기질별 수소생성

여러가지 당류로부터의 수소생성 혼합 배양의 경우는 단독 배양시보다 단당류와 다당류에 대한 이용성이 우수하였다. 특히, glucose, xylose, starch, mannitol에 대한 이용성이 뛰어났다. *C. butyricum*의 단독 배양시에는 이당류의 이용성이 우수함을 보여주었고, *R. sphaeroides*의 단독 배양에서는 단당류, 이당류, 다당류에서 모두 비교적 우수하였다. 혼합배양시는 단독배양시 보다 glucose와 starch의 이용성이 높은 점으로 미루어 식품 폐액에 대한 분해능이 뛰어날 것으로 예상할 수 있었다(Table 4).

Table 4. Effect of several carbohydrates on hydrogen evolution by monoculture and mixed culture of *C. butyricum* and *R. sphaeroides*

Carbohydrate (30 mM)	Hydrogen evolution (µl/ml of culture/g of supplied substrate)		
	Monoculture of <i>C. butyricum</i>	Monoculture of <i>R. sphaeroides</i>	Mixed culture
*Control	0	0	0
Glucose	98.9	186.4	230.7
Xylose	92.1	264.7	263.5
Fructose	90.0	276.3	166.6
Galactose	74.6	227.6	160.7
Lactose	131.0	55.0	75.1
Sucrose	124.3	136.6	90.9
Maltose	118.4	81.7	74.2
Starch (1%)	99.7	39.9	130.1
Mannitol	10.1	149.9	240.0
Sorbitol	101.4	277.6	209.7

In case of mixed culture and monoculture of *R. sphaeroides*, hydrogen evolution was determined after 5 days, in case of monoculture of *C. butyricum* after 4 days. \*Medium without substrate.

Table 5. Effect of several amino acids on hydrogen evolution by monoculture and mixed culture of *C. butyricum* and *R. sphaeroides*

Amino acid (7 mM)	Hydrogen evolution (µl/ml of culture/mM of supplied amino acids)		
	Monoculture of <i>C. butyricum</i>	Monoculture of <i>R. sphaeroides</i>	Mixed culture
*Control	159.2	164.1	110.6
Glutamate	195.3	180.4	181.5
Aspartate	163.5	79.6	145.8
Isoleucine	158.8	249.6	155.8
Valine	212.0	227.1	155.1
Alanine	139.9	106.5	165.1
Phenylalanine	238.7	104.7	125.8
Glycine	159.5	74.5	126.5
Proline	195.4	104.2	110.2
Arginine	66.2	116.8	119.4
Tyrosine	180.2	44.2	118.1
Histidine	110.4	24.8	105.1
Methionine	183.6	130.9	114.6
Glutamine	203.2	79.1	152.9
Serine	187.3	20.5	133.1
Tryptophan	161.6	64.8	118.4
Cysteine	15.9	144.1	73.0
Threonine	116.5	25.9	114.9
Asparagine	223.0	74.1	168.9

In case of mixed culture and monoculture of *R. sphaeroides*, hydrogen evolution was determined after 5 days, in case of monoculture of *C. butyricum* after 4 days. \*Medium without substrate.

여러가지 아미노산으로부터의 수소생성 혼합 배양의 경우는 glutamate의 이용성이 가장 우수하였는데, 대조구에 비해 약 1.64배의 수소생성을 나타내었다. 그 외에 alanine(1.49배), asparagine(1.53배)에서도 높은 수소생

**Table 6. Effect of several organic acids on hydrogen evolution by monoculture and mixed culture of *C. butyricum* and *R. sphaeroides***

Organic acid (30 mM)	Hydrogen evolution (μl/ml of culture)	
	Monoculture of <i>R. sphaeroides</i>	Mixed culture
*Control	0	0
Acetate	1126.4	1441.3
Formate	199.7	194.3
Fumarate	910.6	1552.3
Citrate	1113.2	1344.7
Lactate	1207.6	1399.2
Malate	90.9	19.4
Succinate	1466.7	1626.4

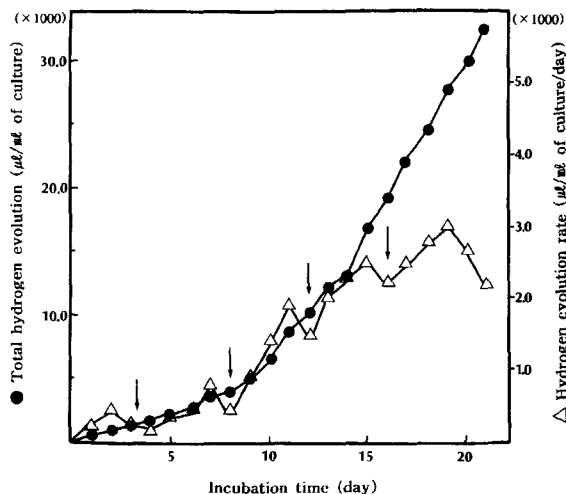
Hydrogen evolution was determined after 5 days.

\*Medium without substrate

성을 보여주었다. *R. sphaeroides*의 단독 배양에서는 glutamate(1.10배), isoleucine(1.52배), valine(1.38배)에서 대조구보다 우수한 수소 생성을 보였다. *C. butyricum*의 단독 배양에서는 valine(1.33배), phenylalanine(1.50배), asparagine(1.40배)에서 수소생성이 우수하였다 (Table 5).

여러가지 유기산으로부터의 수소생성 *R. sphaeroides*가 유기산을 이용할 수 있다는 점에 비추어 *R. sphaeroides*의 단독 배양 및 두 균주의 혼합 배양시의 유기산으로부터의 수소 생성을 조사하였다. 두 경우 모두 유기산에 대한 이용성이 좋았고, 특히 acetate, succinate의 이용성이 높았다(Table 6). 이를 통해 *C. butyricum*의 대사산물인 유기산의 이용 가능성을 확인할 수 있었다.

**혼합 배양의 반 연속배양계**



**Fig. 3. Hydrogen evolution on semi-continuous mixed culture.** Arrows (↓) indicate time of replacing fresh medium. Replacement rate : 50% of total medium volume.

**Table 7. Decision of replacement rate in semi-continuous mixed culture for hydrogen evolution**

Replacement rate (%)	Total hydrogen evolution (μl/ml of culture, ×1000)	Average hydrogen evolution rate (μl/ml of culture/day, ×1000)	Average residual glucose amount (g/l)
50	29.21	1.461	0.387
40	29.54	1.477	0.327
<b>30</b>	<b>31.97</b>	<b>1.600</b>	<b>0.221</b>
20	27.99	1.399	0.439

Total hydrogen evolution, average hydrogen evolution rate and average residual glucose amount were determined after incubation for 15 days. Glucose concentration was 10 g/l.

*C. butyricum*과 *R. sphaeroides*의 혼합 배양시, 연속적인 수소 생성의 가능성을 알아보기 위하여 그 전단계로 반연속배양을 실시하였다. 변형된 Ormerod배지 1l가 든 1.6 l용량의 반응기를 혐기적으로 반 연속배양 하면서 수소 생성속도가 감소할 때마다 배양액의 50%에 해당하는 양의 새로운 배지를 2 ml/min의 유속으로 치환하였다. 그 결과, 계속적인 수소 생성량의 증가가 조사한 20일 동안 관찰되었다(Fig. 3). 이는 *C. butyricum*과 *R. sphaeroides*의 혼합배양을 통한 연속배양이 가능함을 시사해 준다. 또한 반 연속배양시 수소생성을 최대로 하는 배지의 치환율을 결정하기 위해 치환율을 50, 40, 30, 20%의 수준으로 달리하여 조사한 결과, 치환율이 30%일때 가장 높은 수소생성을 보여 주었다(Table 7).

**혼합배양의 연속배양계**

배지의 희석률의 결정 연속배양에 있어서 가장 중요한 parameter는 희석률(dilution rate, 이하 D로 약함)로 이 D는 다음과 같이 나타낼 수 있다.

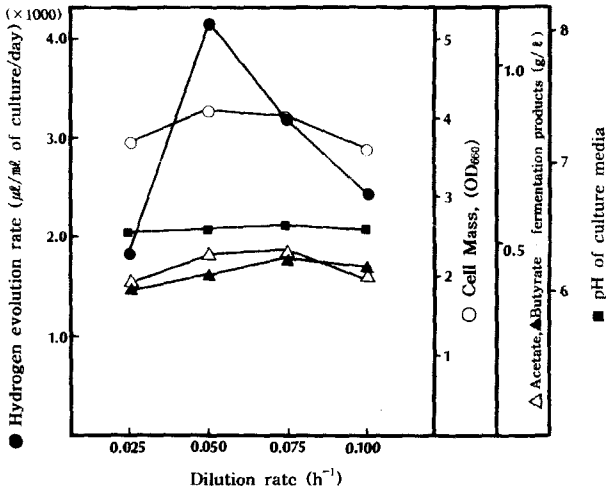
$$D = \frac{W}{V_0}$$

W; liquid의 flow rate(ml/hr)

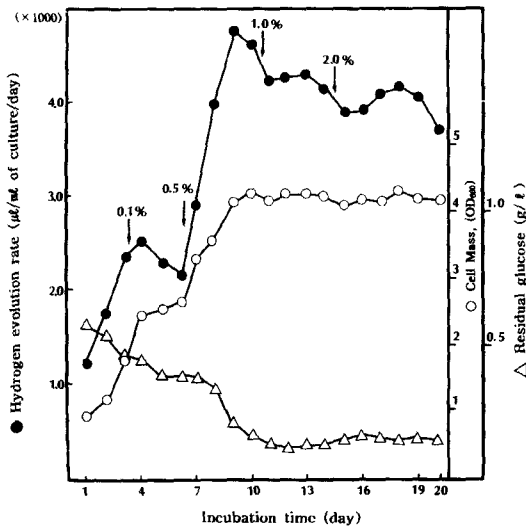
V<sub>0</sub>; 배양액의 부피(ml)

본 혼합배양의 연속배양계에서는 0.05 h<sup>-1</sup>일 때 수소생성이 가장 우수하였으며(Fig. 4), 회분배양과 연속배양의 결과를 비교해 보면 회분배양시의 수소 생성량이 1309.2 μl/ml인데 반해 연속배양시는 4010.9 μl/ml로 약 3.1배 가량의 수소를 얻을 수 있었다. 이와 같은 수소 생성속도의 증가는 배양액 내에 축적될 경우 세포의 증식 및 목적 대사산물의 생성능을 크게 감소시키는 butyrate, acetate 등의 대사산물이 연속배양시에는 계속적으로 반응기 내에서 제거되므로 회분배양시 보다 수소생성능이 더 향상되는 것으로 생각된다[3, 33].

**Yeast extract의 영향** 본 reactor system에서 yeast



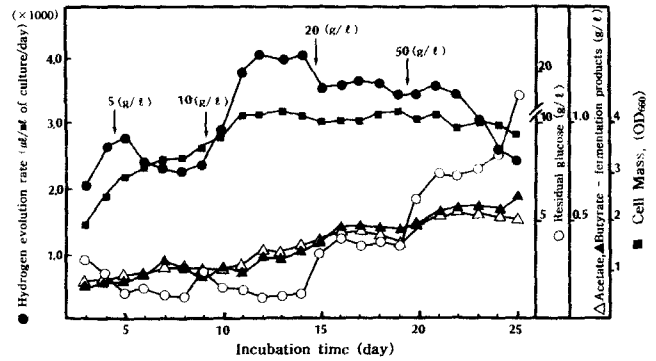
**Fig. 4. Determination of dilution rate in continuous mixed culture for hydrogen evolution.** Hydrogen evolution rate, optical density, fermentation products, and pH were determined after incubation for 20 days.



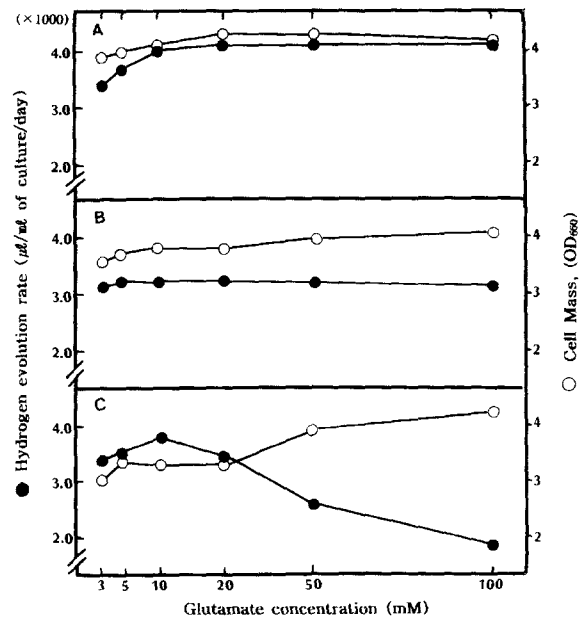
**Fig. 5. Effect of yeast extract concentration on hydrogen evolution in continuous mixed culture.**

extract는 균체증식에 중요한 성분이었으며, 균체증식 및 수소생성에 가장 용이한 농도는 0.5%일 때이며, 이 때의 수소 생성속도는 평균 635 μl/ml/day로 증가하였고, 균체증식에 있어서도 좋은 결과를 보여주었으며, 균체가 증가함에 따라 기질의 소모량도 증가하였다(Fig. 5).

**Glucose로부터의 수소생성** *C. butyricum*의 수소생성의 electron donor로 쓰이는 기질의 종류 및 배지내의 농도에 의해 발효산물의 종류 및 생성 비율이 크게 달라지므로[9, 32], glucose의 배지내 농도에 따른 연속배양에서의 수소생성 양상을 조사하였다. Glucose농도가 10 g/l일 때 수소 생성속도가 증가함을 보였으며, 이 때 glucose의 88.1%가 소모되는 양상을 나타내었다(Fig. 6).



**Fig. 6. Effect of glucose concentration on hydrogen evolution in continuous mixed culture.**



**Fig. 7. Utilization classified by concentration of glutamate as component of organic waste water in continuous culture for hydrogen evolution.**

A: Mixed culture  
B: Monoculture of *C. butyricum* NCIB 9576  
C: Monoculture of *R. sphaeroides* K-7

Glucose 5 g/l, 20 g/l, 50 g/l일 때는 수소 생성속도가 감소하는 추세를 보였다.

**Glutamate로부터의 수소생성** Glutamate는 비교적 값이 싸며, 유기 폐자원에 다량으로 포함되어 있는 점을 고려하여 L-glutamate농도에 따른 수소생성 양상을 살펴 봄으로써 실제 유기 폐액에서의 이용 가능성을 알아 보았다. *R. sphaeroides*의 경우는 glutamate를 10 mM 첨가하였을 때 가장 많은 수소생성을 보였고, glutamate의 농도가 높아질수록 수소생성이 저하되는 양상을 보였다(Fig. 7-C). 반면, *C. butyricum*의 경우(Fig. 7-B)와 두 균주의 혼합배양의 경우(Fig. 7-A)는 glutamate가 고농도로 존재하더라도 수소생성이 크게 저하되지 않는 현상

을 보여주었다. 또한, 혼합배양의 경우 *C. butyricum*의 단독배양에서 보다 더 많은 수소를 얻을 수 있었다.

## 요 약

본 연구의 목적은 혐기성세균 *C. butyricum*과 광합성세균 *R. sphaeroides*의 혼합배양을 통한 반 연속·연속발효계를 확립하여 수소생산의 효율을 높이고, 이를 통해 수소 대량생산의 실용화가가능성을 살펴보는 데 있다.

회분배양상에서의 혼합배양의 초기 접종비율은 *C. butyricum*:*R. sphaeroides*의 건조균체량이 1:6일 때가 가장 우수하였으며, 그 혼합시기는 *C. butyricum*이 대수증식기에 이르는 18시간 후에 *R. sphaeroides*를 접종한 경우가 가장 높은 수소생성을 보여주었다. 혼합배양에서의 연속배양의 전단계로서 반 연속배양을 실시하였으며, 약 20일 동안 반 연속배양이 가능함을 확인하고, 이를 통해 연속배양의 가능성을 볼 수 있었다. 그리고, 반 연속배양의 경우 배양액의 치환율이 30%일 때 수소생성속도가 높았으며, 기질인 glucose의 이용도도 높았다. 연속배양의 경우 역시 단독배양보다는 혼합배양이 1.3~2.1배 높은 수소생성을 보였고, 배지 희석률은 0.05 h<sup>-1</sup>일 때가 높은 수소생성을 보여주었다. Yeast extract는 대량배양의 경우 균체 증식에 필수적인 성분이었으며, 수소생성이 가장 용이한 농도는 0.5%였다. Glucose는 수소생성에 있어서 대표적인 기질이고, 보통 식품공장에서 배출되는 폐액 내에 존재할 가능성이 높은 기질이며, 10 g/l일 때의 수소 생성속도가 높았다. Glutamate는 질소원이기도 하며 역시 폐액 속에 다량 존재하는 기질이다. *R. sphaeroides*만 단독배양한 경우 glutamate의 농도가 높아질수록 수소생성속도가 떨어졌고, *C. butyricum*만 단독배양한 경우 농도에 큰 영향을 받지 않았다. 혼합배양의 경우 역시 glutamate의 농도에 크게 영향을 받지 않을 뿐더러 고농도의 glutamate에서도 수소생성이 뛰어났다. 즉, 유기 폐자원을 이용한 수소생성에 있어서도 단독배양 보다는 혼합배양이 더 유리하며, 회분배양보다는 연속배양이 대체에너지로서의 수소생성에 더 유리함을 보여준다.

## REFERENCES

1. Bae, M., S. W. Yang, and Y. H. Kho. 1982. Studies on hydrogen evolution by photosynthetic bacteria. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **10**: 27-32.
2. Bae, M. 1992. *Industrial Microbiology*, pp. 149-167. MinEumSa.
3. Ballonque, J., E. Masion, J. Amine, H. Petitdemange, and R. Gay. 1987. Inhibitor effect of products of metabolism on growth of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl.*

- Microbiol. Biotechnol.* **26**: 568-573.
4. Bollinger, R., H. Zurrer, and R. Bachofen. 1985. Photo-production of molecular hydrogen from waste water of a sugar refinery by photosynthetic bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 147-151.
5. Bricknell, K. S. and S. M. Finegold. 1973. A simple rapid methods to process and assay fatty acids and alcohols by gas chromatography. *Anal. Biochem.* **51**: 23-31.
6. Daniel, S. and L. U. Robert. 1982. Pyruvate dependent diauxic growth of *Rhodospirillum rubrum* in light. *J. Bacteriol.* **152**: 1175-1187.
7. Gray, C. T. and H. Gest. 1965. Biological formation of molecular hydrogen. *Science* **148**: 186-191.
8. Hillmer, P. and H. Gest. 1977. H<sub>2</sub> metabolism in the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas capsulata*; H<sub>2</sub> production by growing culture. *J. Bacteriol.* **129**: 724-731.
9. Jones, D. T. and D. R. Woods. 1986. Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiol. Rev.* **50**: 484-524.
10. Kamini, N. R. and P. Gunasekaran. 1987. Simultaneous ethanol production from lactose by *Kluyveromyces fragilis* and *Zymomonas mobilis*. *Curr. Microbiol.* **16**: 153-157.
11. Karube, I., S. Suzuki, T. Matsunaga, and H. Kayano. 1981. Photochemical fuel cell using immobilized chloroplast-*Clostridium butyricum*, pp. 389-394. In M. Y. Murray (ed.), *Advances in Biotechnology*, vol. 3. Pergamon Press, Toronto.
12. Karube, I., T. Matsunaga, S. Tsuru and S. Suzuki. 1976. Continuous hydrogen production by immobilized whole cells of *Clostridium butyricum*. *Biochem. Biophys. Acta.* **444**: 338-343.
13. Kelley, B. C., J. Meyer, and P. M. Vignais. 1978. Effect of light on nitrogenase function and synthesis in *Rhodospseudomonas palustris*. *J. Bacteriol.* **136**: 201-208.
14. Kim, J. S., K. Ito, and H. Takahashi. 1980. The relationship between nitrogenase activity and hydrogen evolution in *Rhodospseudomonas palustris*. *Agric. Biol. Chem.* **44**: 827-831.
15. Kim, J. S., K. Ito, and H. Takahashi. 1981. Production of molecular hydrogen by *Rhodospseudomonas* sp. *J. Ferment. Technol.* **59**: 185-190.
16. Kim, J. S., K. Ito, and H. Takahashi. 1987. Production of molecular hydrogen by a semi-continuous culture under laboratory conditions. *Agric. Biol. Chem.* **51**: 2591-2593.
17. Kim, J. S., K. 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.
18. Kondratieva, E. N. and I. N. Gogotov. 1983. Production of molecular hydrogen in microorganisms, pp. 139-191. In A. Fiechter (ed.), *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, vol. 28. Springer, Berlin.
19. Kosaric, N. and R. P. Lyng. 1988. Microbial production of hydrogen, pp. 103-134. In G. Reed (ed.), *Biotechno-*

- logy, vol. 8. VCH publishers, New York.
20. Martin, J. R., H. Petitdemange, J. Ballongue, and R. Gay. 1983. Effects of acetic and butyric acids on solvents production by *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnol. Lett.* **5**: 89–94.
  21. Matsunaga, T., I. Karube, and S. Suzuki. 1980. Some observation on immobilized hydrogen production bacteria: Behavior of hydrogen in gel membrane. *Biotechnol. Bioeng.* **22**: 2607–2615.
  22. Miller, T. L. and M. J. Wolin. 1974. A serum bottle modification of the Hungate technique for cultivating obligate anaerobes. *Appl. Microb.* **27**: 985–987.
  23. Miyake, J., X. Y. Mao, and S. Kawamura. 1984. Photoproduction of hydrogen from glucose by a co-culture of photosynthetic bacterium and *Clostridium butyricum*. *J. Ferment. Technol.* **62**: 531–535.
  24. Molongoski, J. H. and M. J. Klug. 1976. Characterization of anaerobic heterotrophic bacteria isolated from fresh-water lake sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **31**: 83–90.
  25. Monod, J. 1949. The growth of bacterial cultures, pp. 371–383. *Annual Review of Microbiology*, vol. 3. Annual reviews, Palo Alto.
  26. Monot, F., J. M. Engasser, and H. Petitdemange. 1983. Regulation of acetone butanol production in batch and continuous cultures of *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **13**: 207–216.
  27. Ormerod, J. G., K. S. Ormerod, and H. Gest. 1961. Light-dependent utilization of organic compounds and photoproduction of molecular hydrogen by photosynthetic bacteria: Relation with nitrogen metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* **94**: 449–463.
  28. Sawada, H. and P. L. Rogers. 1977. Photosynthetic bacteria in waste treatment: Pure culture studies. *J. Ferment. Technol.* **55**: 297–310.
  29. Schlegel, H. G. and K. Schneider. 1985. Microbial metabolism of hydrogen, pp. 439–457. In M. Y. Murray (ed.), *Comprehensive Biotechnology*, vol. 1. Pergamon Press, Oxford.
  30. Vignais, P. M., A. Colbeau, J. C. Wilson, and Y. Jouanneau. 1985. Hydrogenase, nitrogenase and hydrogen metabolism in the photosynthetic bacteria, pp. 155–234. *Advances in Microbial Physiology*, vol. 26. Academic Press.
  31. Winston, K. V., W. Y. Chen, and G. L. Foutch. 1985. Performance of cell recycling continuous fermentation system for the production of *n*-butanol by *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **15**: 472–478.
  32. Yerushalmi, L. and B. Volesky. 1987. Culture conditions for growth and solvent biosynthesis by a modified *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 513–520.
  33. Zajic, J. E., N. Kosaric, and J. D. Brosseau. 1978. Microbial production of hydrogen, pp. 57–109. In A. Fiechter (ed.), *Advances in Biochemical Engineering*, vol. 9. Springer-Verlag, Berlin.
  34. Zajic, J. E., A. Margaritis, and J. D. Brosseau. 1979. Microbial hydrogen production for replenishable resources. *Int. J. Hydrogen Energy* **4**: 385–402.

(Received September 19, 1998)