

미생물에 의한 수소생산: Dark Anaerobic Fermentation and Photo-biological Process

† 김 미 선 · 백 진 숙

한국에너지기술연구원 바이오매스연구센터
(접수 : 2005. 11. 12., 게재승인 : 2005. 11. 30.)

Microbial hydrogen production: Dark Anaerobic Fermentation and Photo-biological Process

Mi-Sun Kim† and Jin-Sook Baek

Biomass Research Center, Korea Institute of Energy Research, Yuseong-gu, Daejeon 305-343, Korea

(Received : 2005. 11. 12., Accepted : 2005. 11. 30.)

Hydrogen (H₂) as a clean, and renewable energy carrier will be served an important role in the future energy economy. Several biological H₂ production processes are known and currently under development, ranging from direct bio-photolysis of water by green algae, indirect bio-photolysis by cyanobacteria including the separated two stage photolysis using the combination of green algae and photosynthetic microorganisms or green algae alone, dark anaerobic fermentation by fermentative bacteria, photo-fermentation by purple bacteria, and water gas shift reaction by photosynthetic or fermentative bacteria. In this paper, biological H₂ production processes, that are being explored in fundamental and applied research, are reviewed.

Key Words : Hydrogen, biological hydrogen production, bio-photolysis, dark fermentation, and photo-fermentation

서 론

화석연료가 갖는 환경 문제와 원유 생산국의 지역적인 불균형으로 초래되는 국가적 긴장 때문에 신재생 에너지의 개발은 모든 산업 국가가 가지는 시급한 문제이다. 이제 새로운 에너지 개념은 “환경 친화적이며, 무한한 지구상의 자원을 이용할 수 있는 기술에 의한 에너지의 확보”라는 목표를 가지고 그 방향을 전환하고 있다.

물, 유기성 폐기물, 바이오매스로부터 태양에너지와 미생물을 이용하여 수소를 생산할 수 있는 생물기술은 환경 친화적 에너지 생산 기술로 주목 받고 있다. 광합성 또는 혐기 수소생산 미생물 분리와 개선 연구가 1940년 대 후반부터 진행되었으나 연구 규모가 실험실적 규모에 오랫동안 머물러 있었다(1-5). 1970년대 에너지 위기 이후 화석 연료를 대체할 수 있는 에너지로써 수소생산 연구가 초점을 받기 시작했으며, 이 시기에 생물학적 수소생산 연구도

활성화되었다(6-11). 1980년대 원유가격 안정으로 적극적인 개발이 미루어지다가, 지구 온난화 현상을 비롯한 ‘지구환경 위기’를 겪으면서 1990년대에는 환경 문제를 근본적으로 해결할 수 있는 청정에너지 생산기술로써 생물학적 수소생산 연구는 다시 활성화되고 있다. 일본 NEDO의 環境調和形水素製造技術開發 (1991년-1999년)은 25백만불을 투자한 대형 연구사업으로 일본은 생물학적 수소생산 기술 전 분야에 선진 연구를 수행하고 있다(12). 미국 DOE를 비롯한 유럽각국과 IEA Annex-10, 15, 21 (1995년-2010년)(13)은 국제공동 연구를 추진하고 있으며, 일부기술은 기초 연구 단계를 벗어나 대규모 수소생산과 관련사업을 구체화하고 있다.

미생물에 의한 수소생산 기술은 청정에너지 생산과 아울러, 동시에 산소 발생, 공기 중 이산화탄소 고정, 식품공장 폐수 및 음식쓰레기와 같은 유기성 폐기물 처리 등 환경에 이로운 방향으로 진행될 뿐만 아니라, 미생물 자체가 갖는 생물 산업성도 높아서 비타민류, 천연색소, 피부암 치료제 등의 고부가가치 의약품 생산도 활성화된다. 미생물이 분자상의 수소를 발생하거나 흡수하는 성질은 일부 광합성 미생물과 혐기세균들에 의해 관찰되었으며, 빛이 있는 조건에서 이산화탄소를 고정할 때 분자상의 수소를 전자공여체로 이용한다는 것이 홍색유황세균, *Chromatium vinosum*에서 최초로

† Corresponding Author : Biomass Research Center, Korea Institute of Energy Research, 71-2, Jang-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-343, Korea

Tel : +82-42-860-3554, Fax : +82-42-860-3739

E-mail : bmmskim@kier.re.kr

밝혀졌다. 이후 *Chromatium* 속과 *Rhodospirillum rubrum* 균주가 빛이 없는 조건에서 formate를 수소와 이산화탄소로 분해하여 수소를 발생하고, 빛이 존재할 때도 질소 및 암모니아 이온이 제한된 배양조건에서 양성자를 분자 상 수소로 환원하여 수소가스를 발생한다고 보고 되었다(1, 14). 미생물이 갖는 수소생산 기작은 광원의 유무에 따라 수소생산 발생경로가 다를 뿐만 아니라, 기질의 종류 및 미생물 고유의 효소계에 의해 수소생산 기작이 달라진다.

본 총설에서는 미생물에 의해서 발생하는 수소생산 종류를 크게 네 가지로 구분하여 각 기술에 관련된 미생물의 수소발생 메카니즘, 수소발생 효율 등을 설명하고, 각 기술의 특징과 기술개발에 극복해야 할 면 등 실질적인 응용에 관련한 면도 기술하였다.

기술의 종류 및 범위

수소를 생산하는 미생물은 크게 광합성 세균 (photosynthetic bacteria)(15), 혐기성세균 (non-photosynthetic anaerobic bacteria)(3,16), 조류 (algae)(1) 등으로 구분된다. 광합성세균은 *Rhodospirillaceae*(17), *Chromatiaceae* 및 *Chlorobiaceae*로 구분되며, 이는 각각 홍색 비유황세균 (purple non-sulfur bacteria), 홍색 유황세균 (purple sulfur bacteria), 녹색 유황세균 (green sulfur bacteria)으로 통칭된다. 혐기성 세균은 절대혐기 (strict anaerobes)와 통성 혐기 (facultative anaerobes) 세균으로 구분된다. 조류는 녹조류 (green algae)와 남조류 (blue-green algae)로 구분되며 남조류는 통칭 cyanobacteria라고 불리고, 대표적 수소생산 균주로는 *Anabaena* 속이 있다(18).

생물학적 수소 생산 방법은 물, 유기물, 가스를 출발 물질

로 미생물의 다양한 메카니즘에 따라 여러 가지 기술이 알려져 있으며 아직도 새로운 기술 및 다양한 수소 생산 미생물에 대한 연구가 왕성하다. 이 중에서도 ① 녹조류 (green algae)가 광합성 메카니즘에 의해 물로부터 양성자와 전자를 공급받아 수소를 생산하는 직접 물 분해 수소생산 기술(direct bio-photolysis) ② 광합성 작용에 의해 물을 분해하여 산소를 발생하고, 동시에 공기 중 이산화탄소를 고정하여 고분자 저장물질로 균체 내에 합성한 후 혐기 발효 또는 광합성 발효에 의해 수소를 발생하는 간접 물 분해 수소생산 기술(indirect bio-photolysis or two stage photolysis) ③ 유기물을 기질로 이용하여 빛이 존재하는 혐기상태 배양 조건에서 홍색 세균에 의한 광합성 발효(photo-fermentation) 또는 ④ 광이 존재하지 않는 조건에서 혐기 미생물에 의해 유기물이 발효하여 수소와 유기산을 내는 혐기 발효 (dark fermentation) ⑤ 광합성에 관여하는 엽록체 및 미생물 효소를 추출하여, 물 또는 유기물로부터 수소를 발생하는 균체 외 (in vitro) 수소 발생 ⑥ 광합성 미생물의 일산화탄소 가스 전환 반응 (microbial gas shift reaction)에 의한 수소 생산 기술로 구분할 수 있다(Fig. 1).

광합성에 의한 직접 물 분해 수소생산 (direct bio-photolysis)

미생물에 의한 수소 발생 연구는 이미 1800년대 말부터 미생물학자들에 의해서 시작되었으며, 조류 (algae)와 세균 (bacteria)을 이용하여 기초연구가 수행되고 있었다. 시금치에서 추출한 엽록체와 미생물에서 분리한 수소생산 효소와 전자 전달체에 빛을 주어서 수소가 생산되는 in vitro (균체

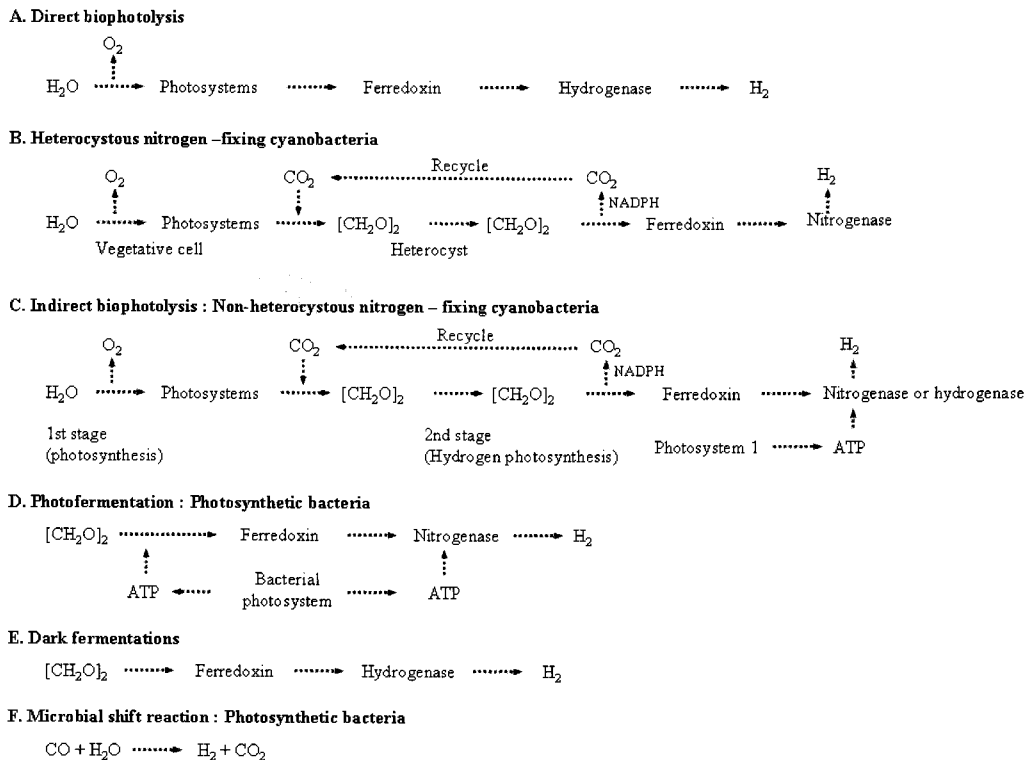


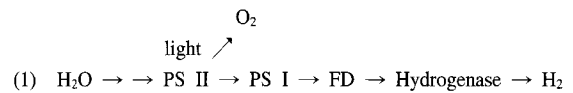
Figure 1. 생물학적 공정에 의한 수소생산.

외) 수소 발생(19)과 아울러 1886년 Jackson과 Ellems (20)가 호수에 생긴 녹색이끼로부터 *Anabaena cylindrica*를 분리하였고, 이로부터 수소가 생성하는 것을 실험한 후 물로부터 광합성 미생물에 의해 수소가 발생이 알려지게 되었다. Gaffron & Rubin(21)은 1942년 녹조류의 일종인 *Scenedesmus obliquus*로부터 광합성에 의해 수소 발생을 최초로 보고하였다. 녹조류 (green algae)는 *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella fusca*, *Scenedesmus obliquus*, *Ulva lactuca*가 남조류 (blue green algae, cyanobacteria)는 *Anabaena cylindrica*, *A. variabilis*, *Synechococcus elongatus*, *Synechocystis* sp., *Nostoc muscorum*가 수소를 생산한다.

식물이나 조류는 자체내의 광합성 작용에 의해서 대사 중에 산소와 환원체를 만드는데, 이때 산소는 물로부터 발생하며, 식물은 공기 중의 이산화탄소를 탄수화물로 환원하여 식물체내에 축적하지만, 수소생산을 촉매하는 효소인 hydrogenase가 존재하지 않으므로 양성자 (H⁺)을 수소로 환원하지는 않는다. 그러나 조류는 이산화탄소를 고정함과 동시에 양성자를 수소로 환원할 수도 있다(1). 물을 직접 생물학적으로 광분해 하는 반응(Fig. 2)에서 전자는 물로부터 photosystem (PS) II와 PS I을 차례로 거치면서 전자 전달체인 ferredoxin (FD)을 통하여 수소발생 효소인 hydrogenase로 흐른다. 그리고 조류 및 cyanobacteria에 존재하는 수소생산 효소에는 i) 가역적 (reversible) 또는 classical hydrogenase, ii) uptake hydrogenase iii) nitrogenase가 있으며 균주에 따라 위 효소 모두가 존재하거나 일부가 수소생산에 관여한다. 이 효소들은 금속이온을 함유하는 고분자 물질로 Ni, Fe, Mo, V 또는 Fe의 함량에 따라 여러 형태가 있으며, 효소 작용에도 큰 영향을 준다. 이 세 효소 중에서도 cyanobacteria에만 존재하는 nitrogenase에 대한 연구는 수소생산과 관련하여 가장 많이 연구되고 있는데, 일반적으로 질소를 암모니아로 환원하는 역할을 하지만 질소가 존재하지 않는 조건에서는 양성자를 수소로 환원하여 수소가스를 발생한다. 이 메커니즘은 비가역적이며, 수소 한 분자당 4 ATP를 사용하는 에너지 소비가 높은 반응이다.

이것은 가역적인 hydrogenase의 대사에너지와 비교하여 거의 2배 이상 소비하는 비효율적인 형태이며, 효소자체가 크고, 반응이 느리며, 외부조건에 민감하다. Uptake hydrogenase는 발생된 수소를 소비하는 효소로서, 수소생산을 최대화하기 위해서는 이 효소를 제거하거나, 그 활성을 최소화하는 방향으로 수소생산을 유도하고 있다.

Reversible hydrogenase는 조류 및 cyanobacteria를 적용하는 수소생산 기술에 가장 적합한 효소로서 직접, 간접적 수소생산 연구가 추진되고 있다.



(1)식에서와 같이 물로부터 수소를 직접적으로 조류의 광합성 기작에 의해 발생하는 현상은 일시적이고, 실험실 조건에서 관찰된다. 즉 대부분의 조류는 광합성 조건에서 성장한 후에 암·혐기 조건에서 일정시간 적응시키면 hydrogenase가 합성되며, 일정기간 동안 활성화되어 수소가 발생하는데, 이러한 현상은 광합성 동안에 축적된 유기물의 분해 작용에 의한 것이다. 그러나 다시 정상적인 광합성 작용이 생기면 이산화탄소를 고정하고, 이 과정 중에서 물로부터 산소가 발생하여 수소생산은 정지한다. 이와 같이 광합성 분해에 의한 직접적인 물 분해 수소생산은 광합성 작용에 의해 발생하는 산소에 의해 저해작용을 받는다. 즉 이 반응에 관여하는 hydrogenase와 반응 자체가 동시에 발생하는 산소에 매우 민감하여 수소 발생을 방해하기 때문이다. 이러한 과민반응을 극복하기 위하여 실험실적으로는 산소가 발생 되는대로 반응기 내에서 없애버리는 기술을 시도하였으나 대량 생산시설에서는 실질적인 처리 방법이 되지 못하고 있다. 또한 분자생물학적인 해결방법으로 Ghirardi 등(22)은 산소에 민감하지 않은 hydrogenase 연구와 아울러 Greenbaum 등(23)은 광합성 시스템 I (photo-system I, PS I) 반응센터가 결여된 *Chlamydomonas reinhardtii* B4 변이주를 개발하였다. Melis 등(24)은 녹조류의 광합성 시스템을 황결핍 조건을 만들어 시간적으로 차이를 두어 배양함으로써 수소생산이 가능하도록 시도하였다. 이는 연속적인 두개의 다른 광합성 작용인 PS II와 PS I의 다른 화학적 특징 즉, PS II는 물 분해와 산소 발생에 관여하고, PS I은 이산화탄소 환원에 관여하는 환원체를 생산하거나 수소를 발생하는데 주로 관여하는 기술이다. 1단계에서는 *C. reinhardtii*가 공기 중에서 광합성 작용으로 이산화탄소를 저장물질로 만들고, 2단계에서는 혐기조건에서 광합성을 함으로써 수소를 발생한다. 즉 황결핍 조건에서는 황 함유 아미노산인 시스테인과 메티오닌 합성이 이루어지지 않고, 또한 단백질 합성도 방해를 받아서 PS II가 작용을 하지 못하므로 산소 발생

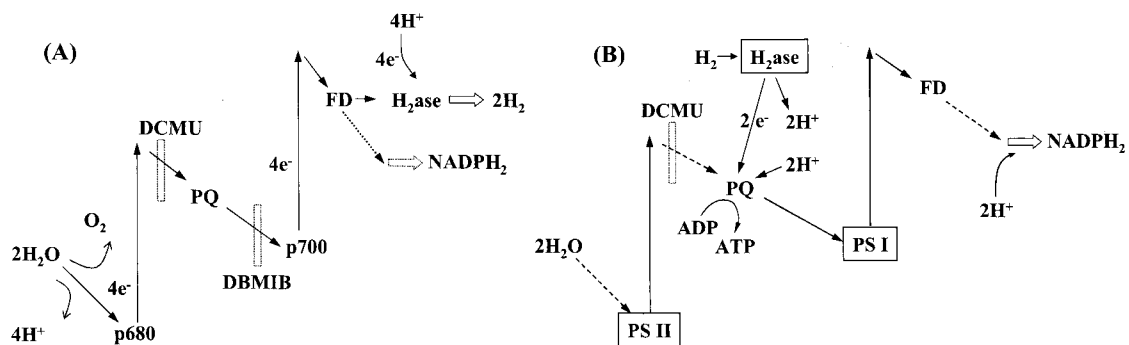


Figure 2. Green algae에 의한 광합성 수소생산 (A) 및 소비 (B) 과정.

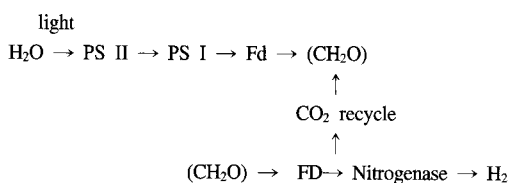
이 정지된다. 이와 같은 산소발생 정지로 hydrogenase는 활성을 유지하며, 일시적으로 PS II를 방해 받은 조류는 1단계로 순환한다.

이와 같이 물을 광합성 미생물이 광분해 (photolysis)하여 직접 산소와 수소를 발생하는 기술은 성공적으로 개발된다면 물과 태양에너지만으로 무한정의 수소를 생산할 수 있는 이상적인 방법이지만 현재 기술로는 아직 해결해야 할 많은 도전이 있다. 즉 미생물 자체가 태양광을 최대 효율로 변환할 수 있는 환원력과 아울러 수소생산 효소인 hydrogenase까지 효율적으로 전달될 수 있는 미생물기술이 개발되어야 한다. 또한 저렴한 생물반응시설에 의해 물과 태양광으로부터 효율적인 생물 수소생산 반응을 제공하고 동시에 생성된 수소를 최대 효율로 모을 수 있는 기술적인 개발이 필요하다. 이외에도 미생물의 광합성 효율은 수소로의 변환에 직접 영향을 주기 때문에 미생물의 광합성에 의한 태양광 변환 효율은 수소생산에서 고려해야 할 중요한 인자이다. 실험실 최적 조건에서 조류와 같은 광합성 미생물은 가시광선이 가지는 에너지의 약 22%를 화학에너지로 저장 변환할 수 있는데 이는 태양에너지의 약 10%를 변환할 수 있는 것으로 계산된다. 그러나 실질적으로는 나무나 곡식의 태양에너지 변환효율은 경작과 추수 중에 잃는 유실을 고려할 때 약 1% 이내로 추정한다(이와 같은 생물학적 수소생산을 바이오매스 생산과 비교할 때, 실질적으로 좀더 높은 광합성 변환효율을 얻을 수 있다고 추정된다). 식물이나 조류에서 발견되는 광합성 효율은 지구상에서 받는 최대 태양에너지의 10-20% 이상이 적용될 때에는 광에너지를 증가하여도 비례적으로 증가하지 않는 비효율적인 작동을 한다. 이 현상은 빛을 흡수하는 색소 (antenna)가 빛을 이용하는 클로로필 (reaction center)보다 지나치게 많아서 빛의 흡수가 지나치게 높기 때문이다. 특히 태양광을 옥외에서 받을 경우, 흡수한 빛을 대부분 이용하지 못하고 잃게 된다. 이러한 빛 포화 현상을 극복하기 위하여 광합성 미생물 내의 빛을 흡수하는 antenna의 수를 줄인다거나 민감한 reaction center를 갖는 미생물로의 개선이 이론적인 광이용 효율에 근접하는 유전공학적 연구가 될 것이다.

광합성에 의한 간접 물 분해 수소생산 (indirect bio-photolysis or two stage photolysis)

1단계 간접 광합성 수소생산

직접적인 광합성 수소생산과는 달리 간접적 광합성 수소생산은 이산화탄소를 중간 전자 전달체로 이용하여 광합성과 수소생산 반응을 분리하는 기술이며, 미생물 분류학적으로 heterocyst를 갖는 질소고정 cyanobacteria에 의해 수소가 발생한다.



이 분류에 속하는 cyanobacteria는 산소를 발생하고 이산화탄소를 고정하는 세포내의 vegetative cell과 질소 고정 (또는 질소가 없는 경우는 수소발생)을 하는 heterocysts가 두꺼운 세포벽에 의해 각각 구분되어있다. 수소 생산은 위 식에서 보는 것과 같이 nitrogenase와 산소가 heterocyst에 의해 구분되기 때문에 직접 광분해 수소생산 경우와 같이 hydrogenase의 산소 민감성에 대한 우려는 없다. 그리고 nitrogenase는 전자를 광합성 중에 vegetative cell에서 이산화탄소를 고정하여 생성된 유기물로부터 공급받으며, ferredoxin (FD)이 전자 전달체로 작용한다. 수소생산은 이산화탄소 고정으로 생산되는 유기물의 양에 의해 수소생산의 속도가 영향을 받으며, nitrogenase는 수소생산 메카니즘에서 대사 에너지를 대량 소비하는 효소로 효율이 타 효소보다 낮은 것이 단점이다.

2단계 간접 광합성 수소생산

이 기술은 다시 두 가지로 구분된다. 첫째, 조류나 cyanobacteria와 같은 광합성 미생물 한 종류를 두개의 배양 조건에 적용시킴으로써 수소를 발생하게 하는 것과 둘째, 광합성 세균을 포함한 두 가지 이상의 미생물을 이용하는 2단계 기술로 구분된다. 첫째 방법은 1단계에서 개발된 연못형 배양기 (open pond)에서 조류를 배양하여 공기 중 이산화탄소 고정으로 탄수화물을 축적하고, 2단계에서 암·혐기조건의 발효조에서 hydrogenase를 유도시켜 수소를 발생하는 방법이다. 수소생산 후에 조류는 다시 1단계로 순환하면서 다시 빛 에너지를 공급하여 광합성에 의해 탄수화물을 축적한다. 앞 절에서 설명한 황 결핍 환경에서의 수소생산도 이에 해당하는 기술이다.

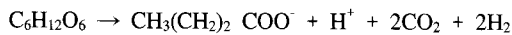
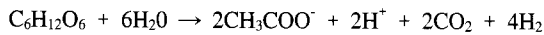
1, 2단계에 모두 조류를 적용하는 위의 방법과는 달리, 1단계에서는 조류를 키워서 이산화탄소 고정과 함께 유기물을 축적하며, 2단계에서는 홍색 비유황 세균과 같은 광합성 세균을 적용하는 기술은 수소생산 효율이 높은 기술로 검토되고 있다. 이 과정에서는 조류가 광합성을 통해 수소생산을 위한 고분자 기질을 생산하고, 광합성 세균은 2단계에서 수소를 발생시킨다. 광합성 세균에 의한 수소생산은 다음 절에서 자세히 기술하였다.

혐기발효에 의한 수소생산

유기물로부터 생물학적으로 수소를 생산하는 미생물은 빛을 필요로 하는 (photosynthetic) 광합성 미생물과 빛을 필요로 하지 않는 (non-photosynthetic) 미생물로 분리되며, 광합성을 하지 않으며 혐기 조건에서 유기물로부터 수소를 생산하는 혐기 발효미생물은 *Escherichia coli*, *Porphyridium curenium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Alcaligins eutrophus*, *Desulfovibrio vulgaris*, *Clostridium butyricum*, *Cl. pasteurianum*, *Methanobacterium sp.*, *Rhizobium leguminosarum*, *Azotobacter vineladdii*, *Enterobacter aerogenes*이 있는데 이 균주들은 혐기배양 중 수소와 동시에 각종 유기산을 생산하며, 다양한 기질 이용성을 갖고 있어 전분계 탄수화물 및 xylan, pectin, mannitol, sorbitol, glycerol, cellobiose, sucrose 등을 분해한다. *Clostridium butyricum*, *Cl. pasteurianum*, *Cl. aceticum*, *Cl. kluveri* 및 *Enterobacter aerogenes*는 가장 잘 알려진 혐기

발효 수소생성 박테리아로서, 현재 이들을 이용한 수소생산에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(5~7).

Clostridium 속 균주는 Embden Meyerhoff 경로 (EMP)로 탄수화물로부터 acetate, lactate, butyrate, propionate, succinate를 생산하며, 질소원이 풍부한 조건에서는 유기산과 동시에 알콜류 (butanol, isopropanol) 및 용매 (acetone)도 생성할 수 있는 발효 경로를 갖는다(Fig. 3). 발효 중에 생산되는 대사산물의 비는 pH, 온도, 무기물, 초기 기질 등의 배양조건에 따라 달라질 수 있다. 발효에 의한 수소생성 경로는 *Clostridium*속과 같은 절대 혐기성세균과 *Enterobacter*, *E. coli*, *Bacillus*속과 같은 통성 혐기성세균의 경우가 다르다. 절대혐기성 세균은 중간 대사물질인 pyruvate로부터 ferredoxin이 매개하는 NAD(P)H 산화반응과 hydrogenase에 의해 수소가 발생한다고 알려진 반면, 통성혐기성 세균은 pyruvate에서 formate를 거쳐 cytochrome c와 hydrogenase에 의해 수소가 발생하는 것으로 추측된다. 포도당으로부터 수소와 같이 acetate 및 butyrate가 생성될 경우를 각각 반응식으로 표시하면 다음과 같다.



즉 혐기발효에 의한 수소생산은 2 mol acetic acid와 동시에 최대 4 mol 수소를 생산한다. 이는 포도당 1 mol로부터 생산할 수 있는 12 mol 수소 중 약 33%의 전환에 불과

하며, 실질적으로 가장 잘 알려진 *Clostridium*이나 *Enterobacter* 속은 약 1-2 mol 수소가 발생하는 것으로 보고되었다(Table 1). 그러나 이 기술은 수소 생산 속도가 빠르기 때문에 가장 상용화에 빨리 갈수 있는 기술로 전망된다.

Table 1. 미생물에 의한 수소생성

Microorganism	H ₂ yield (mol H ₂ /ml glucose)
<i>Clostridium butyricum</i> SC-E1	1.3~2.2
<i>Bacillus licheniformis</i>	1.5
<i>Enterobacter aerogenes</i> HU-101	0.5~0.65
<i>Enterobacter aerogenes</i> AY-2	1.1
<i>Enterobacter aerogenes</i> HO-39	0.9
Microflora (<i>Clostridium</i> sp.)	1.52
Microflora (<i>Clostridium</i> sp.)	0.85

수소발생을 할 수 있는 혐기 미생물은 공기가 존재하지 않는 상태에서 유기물을 이용하여 약 30°C-55°C에서 수소를 발생하며 동시에 유기산도 발생한다. 한분자의 포도당으로부터 생산할 수 있는 수소와 유기산은 미생물 종류에 따라 다르지만, 보통 acetic, butyric, succinic acids를 내면서 이론적으로 약 2-4분자의 수소를 생산한다. 이러한 수소생산은 미생물이 갖는 고유의 생화학적 특성으로 외부에서는 온도, 용존산소, 배양액 산도를 조절할 수 있으며, 최근 연구는 유전공학적으로 수소를 대량 축적할 수 있는 효소의 개선을 통한 미생물 변형을 시도하고 있다. 혐기세균은

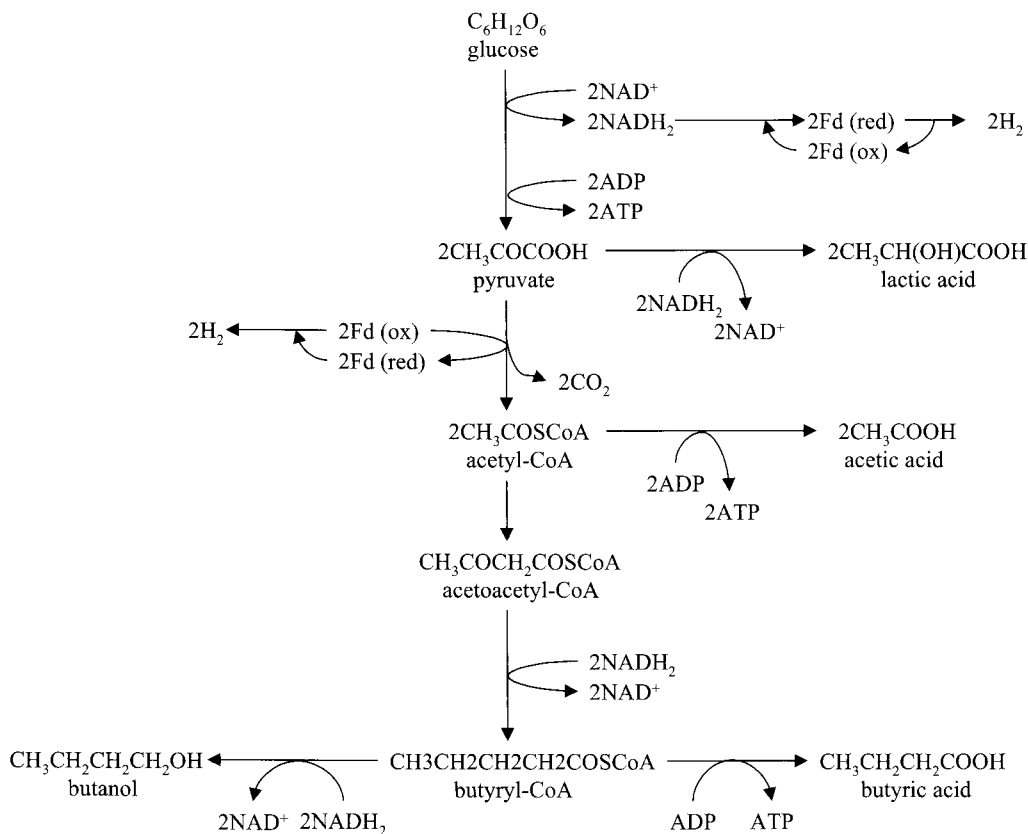


Figure 3. *Clostridium butyricum*의 혐기 대사 경로 및 생성물.

광합성 세균과는 달리 빛이 없는 조건에서도 발효가 일어나므로 유기물을 기질로 하여 밤·낮 구별 없이 수소를 생산할 수 있으며 균체 성장속도가 빨라 연속 배양이나 대형 시설 등의 유지에 편리하다.

혐기 세균은 국내에서 생산되는 유기물 함량이 높은 폐자원을 기질로 사용하여 환경처리 효과와 아울러 수소를 생산하는 기술의 효율을 높이고 있다. 그러나 식품산업 및 농·수·축산분야의 고농도 유기폐수는 그 성상 자체가 복잡할 뿐만 아니라 공정이나 배출 계절에 따른 특성차이도 크기 때문에 폐수별 균종별 기질반응 특성에 관한 보다 심도 있는 기초연구가 필요하다.

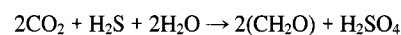
광합성 발효에 의한 수소생산 (photo-fermentation)

미생물이 분자상의 수소를 발생하거나 흡수하는 성질은 자연계에서 그리 흔한 현상은 아니다. 이는 오직 일부의 광합성 미생물들에 의해서 관찰되었으며(25), 초기에 이러한 것을 밝힌 것은 홍색 유황세균 *Chromatium vinosum*이 빛이 있는 조건에서 이산화탄소를 고정하고 분자 상의 수소를 electron donor로 이용했다는 것이다.

1935년 광합성 세균 홍색/비유황 세균, *Chromatium* 속 및 *Rhodospirillum rubrum*가 암조건 발효 상태에서 formate를 수소와 이산화탄소로 분해하여 수소를 발생하였고, 또한 빛이 존재할 때도 수소를 발생하였는데 이는 질소 가스 및 암모니아 이온이 존재하지 않을 경우 nitrogenase가 양성자를 분자상 수소로 환원시켜 수소를 발생하였다고 보고하였다. Gest & Kamen(26)도 1949년 홍색 비유황세균이 광합성 조건에서도 수소를 발생하는 것을 밝혔다. 이후 미생물이 갖는 수소생산 기작은 광합성 미생물이라도 광이 있는 조건과 광이 없는 조건에서 발생하는 수소생산 경로가 다를 뿐만 아니라 기질의 종류에도 영향을 받으며, 기질의 종류 및 미생물 고유의 효소계에 의해서도 수소생산 기작은 달라진다는 것에 중점을 두고 연구가 계속되었다.

대표적인 수소생산 광합성 세균은 *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodopseudomonas sphaeroides*, *Chromatium okenii*, *Thiocystis violacea*, *Thiosarcina rosea*, *Thiospirillum sanguineum*, *Thiocapsa roseoperisicina*, *Lamprocystis roseoperisicina*, *Thiodictyon elegans*, *Thiopedia rosea*, *Amobobacter pendens*, *Ectothiorhodospira mobilis*, *Chlorobium limicola*, *Prosthecochloris aestuariac*, *Pelodictyon clathratiforme*, *Chathrochloris sulfurica* 등이 있으며 이는 Rhodospirillaceae, Chromatiaceae, Chlorobiaceae의 3과 (family)로 분류된다. 이 중 Rhodospirillaceae과는 통칭 purple non-sulfur bacteria (홍색 비유황세균)라고 불리며, bacteriochlorophyll (BChl)이 장파장의 빛을 받아 전자 전달 기작에 의해 질소 고정화를 한다. 질소고정화에 관여하는 최종 효소는 nitrogenase이며, 질소, 암모니아, 암모늄 이온 (NH_4^+) 등의 질소원이 존재하지 않을 때는 양성자 (H^+)을 수소 (H_2)로 환원하여 수소가스를 발생하는데 양성자와 전자 (e^-)는 유기물이나 환원 황화합물, 분자상의 수소로부터 온다. 이 과정에 의한 수소생산은 혐기, 적절한 광도, 제한된 질소원의 공급 및 효율적인 기질의 공급으로 최대 수소생산율을 나타내는데, 미생물에 따라 그 최적 조건의 차이를 나타낸다. 유기물질 중에서도 유기

산은 탄소원 및 전자공여체로 높은 효율의 수소생산성을 나타내는 기질이며, glutamate는 이상적인 질소원으로 사용된다. 홍색 비유황세균중 가장 많이 연구된 *Rhodopseudomonas capsulatus*는 lactate와 succinate로부터 얻을 수 있는 최대 수소 생산성의 72%를 수소로 전환시켰으며, 유기물질 중에서도 당은 수소로의 전환율이 약 10-20%로 비교적 낮다(27). 홍색세균은 자연계에서 홍색을 띄는 광합성세균으로 세포막에서 광합성 기작이 일어나며, 이때 존재하는 bacteriochlorophyll (BChl) a 또는 b에 의해 빛을 흡수하고 광합성 작용I을 수행한다. 흡수과장 중 일부는 약 800 nm 이상에서 높은 흡광도를 나타내어 녹조류 및 고등식물과 대조를 이룬다. 홍색세균은 비교적 작은 분류군으로 약 30여 균종으로 구성되어 있으며, 대부분 단세포이며, 출아에 의해 증식하는 소수의 예외적인 것을 제외하고는 분열 (fission)에 의해 증식한다. 대부분의 균종은 편모에 의한 운동성을 나타낸다. 그러나 이들은 DNA의 GC함량에서 46-73%의 광범위한 분포를 나타내는 소수의 균종으로 구성된 작은 분류군임에도 불구하고 유전적으로는 다양한 유연성을 가지는 균종으로 구성되어 있다. 일반적으로 홍색세균은 홍색유황세균과 홍색비유황세균으로 구성되며, 이들은 상호간에 생리학적 내지는 생태학적인 차이점에 의해 뚜렷이 구별될 수 있다. 홍색유황세균은 주로 광합성 독립영양의 대사형태로서 전자공여체로 H_2S 를 이용하며 절대혐기성인 것에 반해, 홍색비유황세균은 주로 광합성 종속영양의 대사형태를 가지는 것이 일반적이다. 따라서 홍색비유황세균은 H_2S 에 감수성을 보이며, 일부의 균종은 혐기조건에서 미량의 H_2S 를 환원제로 산화·이용이 가능하지만 대부분의 균종은 비교적 낮은 H_2S 에서도 그 생육이 저해된다. 홍색유황세균의 특징적인 광합성 대사 작용은 공기 중 이산화탄소를 동화하여 탄수화물 등 고분자 물질을 합성하고, 순환적인 광합성인산화과정에서의 ATP 생산과 아울러 H_2S 가 혐기적 조건에서 분자상의 유황을 거쳐 황산염으로 산화되는 과정 중 환원력을 공급한다. 이들의 대사작용은 다음의 일반적인 반응식으로 표시될 수 있다.



일부의 홍색유황세균은 H_2S 이외에도 환원된 형태의 무기유황화합물과 수소를 환원제로 이용할 수 있다. 그러나 홍색유황세균에 의한 유황화합물 산화에 관련한 생체내 화학반응은 대단히 복잡하며, 아직도 불분명한 점은 많지만 호기적 화학합성 독립영양세균과 유사할 것으로 추측된다. 분열에 의하지 않고 출아에 의한 세포증식을 나타내는 유일한 홍색비유황세균은 *Rhodomicrobium* 속과 일부의 *Rhodobacter* 속에 포함되는 균종을 들 수 있다. 대부분의 홍색유황세균이 절대광합성 독립영양적인 것에 반해 다수의 홍색비유황세균은 암소에서 호기적으로도 잘 생육할 수 있다. 이와 같은 균주는 산화적인 전자전달계를 갖추고 있어서 호기적인 광합성을 할 수 있지만 소수의 균종은 pyruvate 혹은 당의 발효에 의해 무산소 상태에서에서도 생육이 가능하다. 따라서 홍색비유황세균은 일반적으로 유기화합물이 함유되어 있으면서 H_2S 가 존재하지 않거나 미량 존재하는 담수의 호수나 연못에서 서식한다. 그러나 홍색유황세균은 황산염환원세균의 활동에 의해 H_2S 가 발생하는 환경에서 서식한다. 이들은 모두 혐기 상태에서는 질소고정이

가능하지만 호기적인 상태에서는 질소고정을 할 수 없다.

조류 및 식물이 PS I과 II를 모두 광합성에 이용하는 것과는 달리 광합성 세균은 PS I만을 이용하여 광합성과 수소생산을 한다(Fig. 4). 즉 cytochrome-associated (photosystem I, PS I) photoreaction pigment 복합체인 reaction center라고 불리는 것을 가지고 있다. 이 reaction center의 역할은 빛 에너지를 bacteriochlorophyll과 carotenoid 등의 색소로 흡수하며 reaction center 복합체의 양면의 전위 차로 전환하며, 이러한 전위차는 cyclic 전자 전달계를 생기게 하고, 이것은 다시 ATP등의 고 에너지 화합물을 만들게 된다. 이때 기질이 공급하는 전자가 nitrogenase 효소계의 전자 전달체 (Fd)를 환원하며, 이 환원력과 ATP를 이용하여 nitrogenase가 질소원이 없는 조건에서 분자 상의 수소를 발생한다.

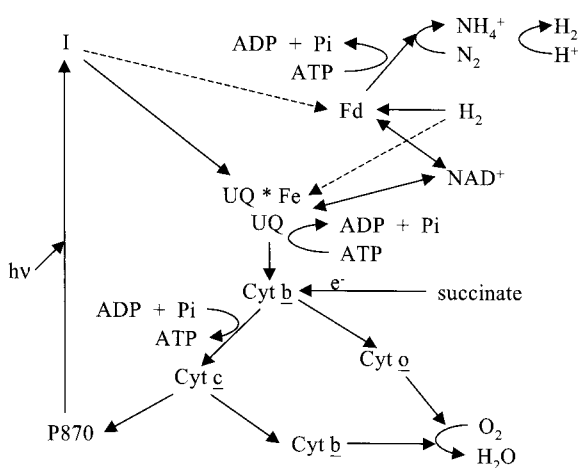


Figure 4. 광합성 세균의 전자 전달경로와 수소 생산 및 질소고정 (P870 (reaction center of bacterio-chlorophyll), I (excited state of bacterio-chlorophyll), UQ (a pool of ubiquinone), cyt (cytochrome), Fd (Ferredoxin), UQ · Fe (an iron-quinone moiety)).

광합성 박테리아가 nitrogenase에 의해 수소를 생성하기 위해서는 환원형 ferredoxin의 산화환원 전위를 $E_m, n = -420$ mV 이하로 내려야 한다고 보고되었다. 이는 다음과 같은 이론 ① Ferredoxin이 직접 광반응에 의해서 ② 간접적으로 ATP가 관여하는 역전자 전달계에 의해서 ③ 직접적인 dehydrogenation 반응이나 전자 전달계에 속하지 않는 중간산물의 oxidative decarboxylation 반응에 의해서 라고 추정된다.

광합성 박테리아는 또한 대사적인 다양성을 가지고 있어 호기적 및 혐기적 압조건에서도 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(9). 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, 기질의 전환율은 glucose의 경우 30-40%이고, lactic acid는 85-90%까지 가능하다고 알려져 있다. 조류나 광합성 박테리아로부터 생산되는 생물학적 수소의 양 또한 빛에너지를 이용할 수 있는

최대 양자 효율이 높을수록 많은 수소를 생산하는 것으로 알려져 있는데, 이는 광화학적 parameter인 균주의 reaction center 수 및 안테나 크기 등에 비례한다.

Rhodobacter 속이 유기물로부터 광합성에 의한 수소생산을 최대화하기 위해 여러 가지 방법이 연구되고 있는데, 첫째, 수소발생에 관여하는 효소인 nitrogenase 유전자의 변형 및 발생한 수소를 재사용하는 uptake hydrogenase (Hup) 유전자 제거 등의 관련 유전자를 조작하는 연구를 비롯하여 광 이용효율에 영향을 주는 광반응 관련 유전자와 연관된 light harvesting system에 존재하는 각종 안테나의 변형(28) 등 유전공학적 연구가 진행되고 있다. 또한 미생물이 수소와 동시에 대사산물로 축적하는 polyhydroxybutyrate (PHB), amino levulonic acid와 같은 고분자물질의 생성경로 제거에 의해 수소발생을 최대화하는 대사관련 분자 생물학 연구가 되고 있다. 둘째, 광합성 수소생산 생물반응기의 형태 및 최적 수소생산 조건에 관련한 연구가 활발히 수행되고 있는데, 이는 대규모 반응기의 실질적인 적용에 초점을 두고 효율적인 광원의 공급 및 분산을 목표로 진행되고 있다. 개발된 광이용 생물반응기는 stirred-tank, open pond, 수직/수평형 tubular type, helical (or coil) type, internal gas exchange tubular type (수평형 또는 경사형), vertical modular type 등 다양하다. 각 형태의 광합성 생물 배양기는 균체 대량생산 및 수소 발생과 관련하여 장단점이 있으나 대부분은 균체를 대량 확보할 목적으로 개발되었으며, 가스 생산에 적절하게 연구된 형태는 아직 없지만, 일본과 미국을 비롯한 생물학적 수소생산 연구가 활발한 국가에서 현재 개발 중에 있다. 셋째, 광합성 미생물 배양기술은 우수한 미생물의 확보나 적절한 반응기의 개발만큼 생물수소생산에 중요한 부분으로, 최대의 균체를 배양액 중에 확보하기 위한 균체 고정화 기술과 유기성폐수나 폐자원을 적용할 경우 발생하는 각종 염이나 암모니아를 제거하기 위한 전처리, 온도 및 광도조절이 주로 연구되고 있다.

요 약

수소를 생산하는 미생물은 크게 광합성 세균 (photosynthetic bacteria), 혐기성세균 (non-photosynthetic anaerobic bacteria), 조류 (algae) 등으로 구분되고, 이들의 수소 생성 기작, 사용가능 기질 및 수소 발생량은 상당한 차이가 있다. 광합성세균은 *Rhodospirillaceae*, *Chromatiaceae* 및 *Chlorobiaceae*로 구분되며, 이는 각각 홍색비유황세균 (purple non-sulfur bacteria), 홍색유황세균 (purple sulfur bacteria), 녹색유황세균 (green sulfur bacteria)으로 통칭된다. 혐기성 세균은 절대 또는 통성혐기세균 중 일부가 수소생산에 관여하며, 조류는 녹조류 (green algae)와 남조류 (blue-green algae, cyanobacteria)가 알려져 있다.

생물학적 수소생산 기술은 ① 녹조류 (green algae)가 광합성 메카니즘에 의해 수소를 생산하는 직접 물 분해 수소생산 (direct bio-photolysis) ② 광합성 작용에 의해 물을 분해하여 산소를 발생하고, 동시에 공기 중 이산화탄소를 고정하여 고분자 저장물질로 균체 내에 저장한 후 혐기 발효 또는 광합성 발효에 의해 수소를 발생하는 간접 물 분해 수소생산 (indirect bio-photolysis or two stage photolysis) ③ 빛이 존재하는 혐기상태 배양 조건에서 홍색 세균에 의한 광합성 발효

(photo-fermentation) 또는 ④ 광이 존재하지 않는 조건에서 혐기 미생물에 의해 수소와 유기산을 내는 혐기 발효 (dark anaerobic fermentation) ⑤ 균체 외 (in vitro) 수소 발생 ⑥ 일산화탄소 가스 전환 반응 (microbial gas shift reaction)에 의한 수소 생산 기술로 구분할 수 있다.

물로부터 생물학적 기술에 의한 수소생산은 공기 중의 이산화탄소를 고정하고, 수소와 산소를 발생하는 원천기술으로써 오래 전부터 미국, 유럽에서 태양에너지를 이용하는 광합성 미생물의 분리, 개선 및 반응기에 관한 연구가 축적되어 왔으며, 유기물 즉 바이오매스로부터 혐기 및 광합성 발효를 연속적으로 적용하는 기술은 비교적 최근에 일본을 비롯한 유기성 폐기물이 많은 국가에서 수소에너지 생산과 유기성 폐기물 처리라는 두 가지 목적에 부합하는 연구로써 활발히 진행되고 있다.

유기성 폐기물이나 폐수와 같은 수분함량이 높은 바이오매스는 대부분이 매립처리 되는 실정이지만 높은 수분함량 때문에 매립 시 발생하는 침출수는 환경오염의 주범으로 가까운 장래에는 매립도 금지될 전망이다. 이와 같은 수소에너지 생산기술과 이용시스템 개발은 화석연료 사용을 최소화 할 수 있으며, 국내에서 다량 발생하는 유기성 폐기물을 이용한 에너지 생산으로 자원 강대국 입지에 설 수 있다.

미생물에 의한 수소생산 기술은 청정에너지 생산과 아울러, 동시에 산소 발생, 공기 중 이산화탄소 고정, 식품공장 폐수 및 음식쓰레기와 같은 유기성 폐기물 처리 등 환경에 이로운 방향으로 진행될 뿐만 아니라, 미생물 자체가 갖는 생물 산업성도 높아서 비타민류, 천연색소, 피부암 치료제등의 고부가가치 의약품 생산도 활성화할 수 있다.

감 사

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

REFERENCES

- Benemann, J. R. and N. M. Weare (1974), Hydrogen evolution by nitrogen fixing *Anabaena cylindrica* cultures, *Science* **184**, 175-176.
- Addario, D. 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 1996. Stuttgart. Germany, pp2577-2582.
- Hendrickx, M., A. Vansteenbeeck, and J. DeLeg (1986), The culture, general physiology, morphology and classification of the nonsulfur purple and brown bacteria, System, *Appl. Microbiol.* **8**, 239-244.
- Weaver, P. F., S. Lien, and M. Seibert (1980), Photobiological production of hydrogen, *Solar Energy* **24**, 3-45.
- Markov, S. A., M. J. Bazin, and D. O. Hall (1995), Advances in Biochem., *Eng. Biotech.* **52**, 60-81.
- Ikuta, Y., T. Akano, N. Shioji, and I. Maeda (1998), Biohydrogen production by photosynthetic microorganisms, In Biohydrogen, O. Zaborsky (Ed.) Plenum Press, New York, pp319 - 328.
- Szyper, J. P., A. Y. Brandon, J. R. Benemann, M. R. Tredici, and O. R. Zarborsky (1998), Internal Gas Exchange Photobioreactor development and testing in Hawaii, pp441-446.
- Bakterien-Energiekraftwerke der Zukunft. Marz (1998), Umwelt-Magazin, pp53.
- Lindblad, P., Y. Asada, J. Benemann, P. Hallenbeck, A. Melis, J. Miyake, M. Seibert, and O. Skulberg (2000), IEA Hydrogen-Agreement, Task 15, Proc. 13th World Hydrogen Energy Conference. Hydrogen Energy Progress XIII Beijing, China June, pp12-15, 56-59.
- Development of environmentally friendly technology for the production of hydrogen, New Energy and Industrial Technology Development Organization (NEDO), Global Environment Technology Department Brochure.
- Travieso, L., F. Benitez, and M. Hernandez (1998), Prospects of biological hydrogen production in Cuba, Proc. 12th World Hydrogen Energy Conference. Hydrogen Energy Progress XII. Buenos Aris, Argentina, June, pp12-15, 827-832.
- Gaudernack, B. (1998), Photoproduction of hydrogen Annex 10 of the IEA hydrogen programme, Proc. 12th World Hydrogen Energy Conference. Hydrogen Energy Progress XII. Buenos Aris, Argentina, June, pp12-15, 2011-2023.
- 김미선, 문광웅, 이상근 (1998), *Rhodospseudomonas sphaeroides*에 의한 수소생산 -glucose 및 유기산의 영향, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 89-95.
- Gaffron, H. and Rubin (1942), Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae, *J. Gen. Physiol.* **26**, 219-240.
- Klemme, J. H. (1968), Untersuchungen zur Photoautotrophie mitmolekularem Wasserstoff bei neuisolierten schwefelfreien Purpurbakterien, *Arch. Mikrobiol.* **64**, pp29-42.
- Kim, J. S., K. Ito, K. Izaki, and H. Takahashi (1987), *Agri. Biol. Chem.* **51**, 2591-3593.
- Van Niel, C. B. (1944), The culture, general physiology, morphology and classification of the nonsulfur purple and brown bacteria, *Bacteriol. Rev.* **8**, 1.
- Gray, C. T. and H. Gest (1965), Biological formation of molecular hydrogen, *Science* **148**, 186-192.
- Benemann, J. R., J. A. Berenson, N. O. Kaplan, and M. D. Kamen (1973), Hydrogen Evolution by a Chloroplast-Ferredoxin- Hydrogenase System, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **70**, 2317-2320.
- Jackson, D. D. and J. W. Ellms (1886), Reports Massachusetts State Board Health, pp410-420.
- Gaffron, H. and J. Rubin (1942), Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae, *J. Gen. Physiol.* **26**, 219-240.
- Ghirardi, M. L., S. P. Toon, and M. Seibert (1995), Proc. Annual Review Meeting DOE Office of Utility Technol. Hydrogen Program Review, Miami, FL.
- Greenbaum, E., J. W. Lee, C. V. Tevault, S. L. Blankinship, and L. J. Melis (1995), CO₂ Fixation and Photoevolution of H₂ and O₂ in a Mutant of *Chlamydomonas* Lacking Photosystem I, *Nature* **376**, 438-441.
- Melis, A., L. Zhang, M. Foster, M. L. Ghirardi, and M. Seibert (2000), Sustained Photobiological Hydrogen Gas Production upon Reversible Inactivation of Oxygen Evolution in the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Physiol.* **122**, 127-135.
- Boichenko, V. A. and P. Hoffman (1997), Photosynthetic hydrogen production. in prokaryotes and eucaryotes: occurrence, mechanism, and functions, *Photosynthetica* **30**, 527-552.
- Gest, H. and M. D. Kamen (1949), Photoproduction of molecular hydrogen by *Rhodospirillum rubrum*, *Science* **109**, 558-559.
- Hillmer, P. and H. Gest (1977), H₂ metabolism in the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas capsulata*: H₂ production by growing cultures, *J. Bacteriol.* **129**, 724-731.
- Vasilyeva, L. G., M. Miyake, E. Khatipov, T. Wakayama, M. Sekine, M. Hara, E. Nakada, Y. Asada, and J. Miyake (1999), Enhanced hydrogen production by a mutant of *Rhodobacter sphaeroides* having an altered light-harvesting system, *J. Biosci. Bioeng.* **87**, 619-624.