

광합성 세균 *Rhodobacter sphaeroides* KS56에 의한 수소 생성

이 은 숙* · 권 애 란

*경산대학교 한의예과, 서울대학교 약학대학

Hydrogen Evolution by Photosynthetic Bacteria *Rhodobacter sphaeroides* KS56

Eun-Sook Lee* and Ae-Ran Kwon

Department of Preparatory Oriental Medicine, Kyungsan University

College of Pharmacy, Seoul National University

ABSTRACT

The optimum temperature and pH for growth and hydrogen evolution of the organism were observed at 30~35°C, and around pH 7.0, respectively. The efficiency of various sugars and organic acids on hydrogen evolution as electron donors by the organism was examined. Among them, higher rates of hydrogen evolution were observed with sugars such as glucose or fructose and organic acids such as malate or pyruvate. From the result, it was evident that *Rhodobacter sphaeroides* KS56 had a great capacity of utilizing various kinds of reduced carbon compounds as electron donors.

Key words: hydrogen evolution, photosynthetic bacteria, *Rhodobacter sphaeroides*

I. 서 론

광합성 세균은 자연계에 널리 분포하는 세균으로서 bacteriochlorophyll 과 carotenoid를 가지고 있는 수중세균(aquatic bacteria)으로 태양광을 이용하여 광합성과 질소고정을 수행하고 수소 gas를 발생시킨다. 광합성 세균에 의한 수소생성은 홍색 비유황세균인 *Rhodospirillum rubrum*에서 처음 밝혀

진 이래로 이 세균의 일반적 성질로 인식되고 있다¹⁾. 1970년대에 와서 biomass자원 및 대체에너지에 관심이 집중되면서 고갈되어가는 화석 에너지에 대체할 생물학적 에너지로서 혐기성 세균에 의한 methane, 수소가스 및 광합성 세균에 의한 수소가스에 관한 연구가 촉진되기 시작하였다. 최근에는 석유 및 석탄자원에 의한 심각한 환경오염문제까지 대두됨에 따라 청정에너지로서 이들 생물학적 에너지에 관심이 집중되고 있다. 광합성 세균에 의해 발

생된 수소를 대체에너지원으로 이용하려는 구상은 여러 그룹에 의해서 보고되었고^{2,3)}, 특히 농산폐기물, 종이폐기물 및 하수유기물에서 배양하여 폐수 처리, 발생된 수소의 이용 및 균체의 이용 등에 관한 구상 등이 보고되었다²⁾. 또한 야외에서의 batch culture가 보고되는³⁾ 등 점차로 응용면에 관심이 집중되고 있으나 아직 응용적인 면은 초보단계라 할 수 있다. 이러한 광합성 세균에 의해서 발생하는 수소를 이용하는 잇점을 물리화학적으로 수소를 생산할 때에는 400~1,000℃의 높은 온도가 요구되는데 비해서 생물학적 방법은 10~40℃의 낮은 온도가 요구된다. 그리고 중요한 에너지원으로 무한정한 태양에너지를 이용하므로 오염물질을 발생하지 않으며, 활성이 좋은 균주를 이용하여 생성된 수소는 재처리 과정을 거치지 않고 즉시 연료로 이용될 수 있으며, 또한 균체는 고가의 의약품인 ubiquinone의 원료⁴⁾ 및 고단백사료로 이용될 수 있다⁵⁾. 본 실험은 자연계에서 분리한 여러 광합성 세균 중 특히 glucose를 기질로 하여 수소를 생성하는 균주를 선정, 분리, 동정하였으며 본 균주의 수소생성을 위한 몇 가지의 조건을 조사하였다. 일반적으로 광합성 세균은 TCA cycle상의 유기산을 전자공여체로하여 수소를 생산하는 것으로 알려져 있으나 본 균주는 glucose 등 당류를 기질로 이용하는 것이 특이한 점이 있어 그 결과를 보고한다.

II. 재료 및 방법

1. 휴지기 균체의 준비

휴지기 균체 (resting cell)의 준비는 Kelley 등⁶⁾의 방법에 준하였다. 균의 생육이 대수증식기 말기 (late exponential phase)에 이르렀을 때 균체를 원심분리 (Hitachi High Speed Refrigerated Centrifuge, Model RPR-20-20, 12,000g, 10min)하여 회수한 다음 10mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)에 현탁시켜 O.D.를 $A_{660}=1.0$ 으로 조절해서 시약병에 넣고 rubber stopper로 막은 후 Argon 가스로 10분간 bubbling시켜서 혐기상태로 유지시키면서 4℃에 보관하였다.

2. 수소발생용 배지와 배양조건

Ormerod의 액체배지를 변형하여 사용하였다. Yeast extract를 첨가하지 않았고 탄소원으로 malate 대신 glucose (30mM)를 첨가하였으며 ammonium sulfate 대신 L-glutamate (7mM)을 질소원으로 하였다. 배양용기는 screw cap tube (17mM)나 serum vial (40ml)을 사용하였다. 온도 및 광도는 30℃ 진탕배양기 (60 oscillation/min, Precision Co.)에서 100W 전구 2개로 6,000 lux (Radiometer/Photometer, Model 550-1, EG & G Electro-Optics, USA)로 유지시켰다.

3. 수소가스 생성 및 측정방법

Serum vial (40ml)에 휴지기 균체 ($A_{660}=1.0$) 5ml와 glucose (60mM) 및 L-glutamate (14mM)이 함유된 수소발생용 배지 5ml를 섞어서 최종적인 균체 및 기질농도가 $A_{660}=0.5$ 및 glucose 30mM, glutamate 7mM 되게 한 다음 gas tight rubber stopper로 막았다. 반응이 시작하기 전 argon gas로 약 3분간 bubbling시켜 반응용기 내부를 혐기적 상태로 만든 후 30℃ shaking water bath에서 광조건을 6,000 lux로 유지시키면서 60 stroke/min로 반응시켰다.

일정기간 반응 후 gas-tight syringe (Precision Co.)로 gas phase의 일정량을 뽑아서 Gas Chromatography (Varian Model 3700)로 발생된 수소량을 정량하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 광합성 수소생성 조건

1) 온도의 방향

각각의 온도를 25~50℃로 조절된 항온장치를 사용하여 균을 배양시켰을 때 균체증식과 수소생성과의 관계는 Fig. 1과 같다. 균체증식은 25℃부터 40℃까지 가능하나 수소생성은 40℃에서 급격히 감소하고, 50℃에서는 균체증식 및 수소생성이 없었다.

수소생성과 균체증식은 25℃부터 35℃까지 비교적 넓은 범위로 나타났고 30℃에서 수소생성이 가

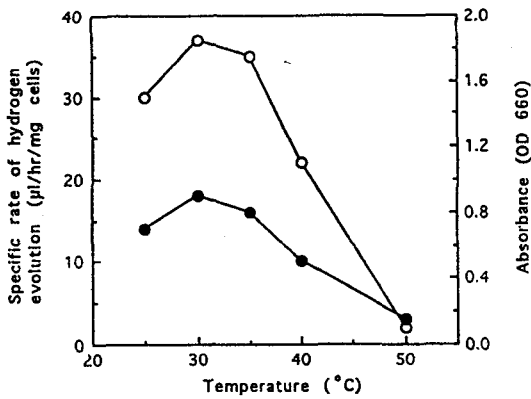


Fig. 1. Effect of temperature on the cell growth and hydrogen evolution by *Rhodobacter sphaeroides* KS56.

- The specific rate of hydrogen evolution
- Cell mass of 40 hrs-cultures

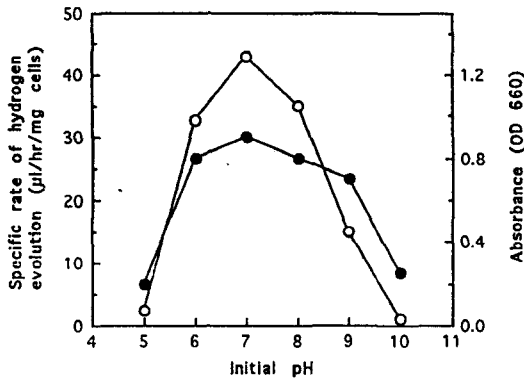


Fig. 2. Effect of pH on the cell growth and hydrogen evolution by *Rhodobacter sphaeroides* KS56.

- The specific rate of hydrogen evolution
- Cell mass of 40 hrs-cultures

장 좋았다.

2) pH의 영향

배양전 배지의 pH를 4.0~10.0으로 조절하고 배양시켰을 때 균체증식과 수소생성과의 관계는 Fig. 2와 같다. 이 경우 균의 생육 pH는 6.0~9.0의 넓은 범위로 나타났고 이 범위에서 수소생성도 좋았다.

특히 pH 7.0일 때 수소생성이 가장 좋았으며, pH

5.0과 pH 10.0에서 균체증식과 수소생성은 거의 없었다. 일반적으로 광합성 세균의 최적 pH는 7.0~8.0과 6.5~6.8로 보고되었고⁷⁾, 균배양중 배지의 pH 변화는 CO₂ 방출, 유기산 축적 등에 그 원인이 있고 광합성 세균에 의해서 소모된 유기산은 일정비율로 배지내의 pH를 변화시키므로 이것을 이용하여 유기산의 소비 속도를 측정할 수 있는 지표가 될 수 있다.

3) 수소생성과 광도와의 관계

광도가 광합성 세균에 미치는 영향은 Hyrayoma 등에 의하여 연구되었다⁸⁾. 광도도 (illumination intensity, lux)에 따른 균체증식과 수소생성과의 관계는 Fig. 3과 같다.

즉, 균체증식은 1,000 lux에서 포화상태를 보이냐 수소생성은 6,000 lux부터 포화상태에 이르렀다.

4) 광의존 수소생성

광합성세균의 수소생성이 빛에 의존하는지를 조사하기 위해 광조사 영향을 실험하였다(Fig. 4). L-Glutamate (7mM)를 질소원으로 사용한 질소제한배지에서 빛이 있는 조건에서는 균이 연속적으로 수소를 생성하였고, 빛이 차단되면 수소생성은 정지되었으며 다시 빛을 공급하면 정상적인 비율로 수

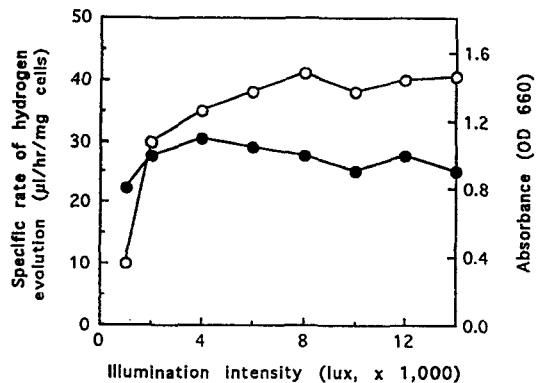


Fig. 3. Effect of illumination intensity on the cell growth and hydrogen evolution by *Rhodobacter sphaeroides* KS56.

- The specific rate of hydrogen evolution
- Cell mass of 40 hrs-cultures

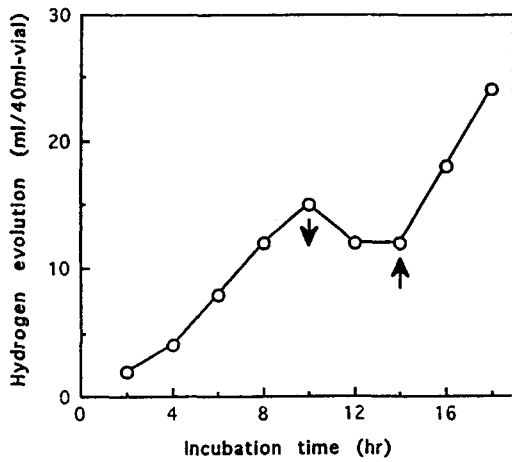


Fig. 4. Effect of light "on" and "off" on the hydrogen evolution by the resting cells of *Rhodospirillum rubrum* KS56.

↓ : Light off

↑ : Light on

소가 생성되었다. 이와 같이 수소생성은 전적으로 광에 의존하는 것으로 나타났는데 광합성 세균에 있어서 이러한 광의존성은 상당량의 ATP가 광에너지를 이용한 광인산화 (photophosphorylation)에 의하여 공급되어지기 때문이다⁹⁾. 광 인산화 반응은 광합성 세균의 질소대사에 관여하는 nitrogenase 활성화와 직접적인 관련이 있으므로 본 균주에 의한 수소생성은 nitrogenase에 의존할 것으로 판단되어 이에 대한 실험은 차후에 보고할 예정이다.

5) 전자공여체에 따른 수소 생성

광합성 세균인 non-sulfur purple bacteria는 수소생성과 질소고정을 수행하는데 소모되는 상당량의 ATP를 공급하기 위해 여분의 electron donor로서 lactate, malate 등의 유기산을 요구하는 것으로 알려져 있다. 특히 당류에서부터 수소생성은 당류를 유기산으로 전환시키고 이 유기산을 광합성 세균

Table 1. Hydrogen evolution^a from various electron donors by *Rhodospirillum rubrum* KS56

Substrate	Specific rate of hydrogen evolution (μ l/hr/mg-cells) ^b	Substrate	Specific rate of hydrogen evolution (μ l/hr/mg-cells)
Dextrin	3.4	DL-Malate	42.0
Starch	0.6	Pyruvate	33.2
CMC	0	Fumarate	32.5
		Succinate	33.2
Melzitose	7.5	Mannitol	30.5
Raffinose	1.8	Gluconate	31.6
		α -Ketoglutarate	28.6
Sucrose	14.5	Sorbitol	25.2
Maltose	9.0	Lactate	27.3
Cellobiose	7.2	Acetate	14.2
Lactose	6.0	Control ^b	0
Mellobiose	5.2		
Trehalose	4.0		
Glucose	39.6		
Fructose	35.3		
Mannose	20.5		
Galactose	4.5		

a. Incubation was performed for 40 hrs in mixtures containing the indicated electron donors (30mM) of D-form and L-glutamate (7mM)

b. Mixture containing only L-glutamate (7mM)

이 이용하여 수소를 생성하는 혼합배양의 방식이 보고되어 있다. Table 1과 같이 본 균주는 유기산뿐만 아니라 당류에서도 수소를 생성하여 전자공여체의 이용범위가 기존의 광합성세균보다 광범위한 것으로 나타났다. 유기산인 경우 malate와 pyruvate, 단당류인 경우 glucose와 fructose에서 수소생성이 좋은 것으로 나타났다. 단당류뿐만 아니라 2당류, 3당류에서도 수소가 생성된 것은 본 균주는 이들을 일단 유기산까지 분해한 다음 이것을 전자공여체로 하여 수소를 생성하는 것으로 보이며 이것은 당류가 함유된 유기성 폐수를 정화할 때 이용 가능성 있음을 나타낸다.

IV. 요약

본 세균의 성장과 수소생성을 위한 최적온도는 30~35°C 이었고 최적 pH는 7.0 부근이었다. 이 광합성 세균의 수소발생을 위한 전자전달계의 유기화합물은 포도당 또는 과당과 같은 당류와 malate 혹은 pyruvate 같은 유기산이 효율적임이 밝혀졌다. 이 결과는 *Rhodobacter sphaeroides* KS56이 전자전달계로서 여러종류의 환원성 탄수화물을 이용할 수 있음을 나타낸다.

V. 참고문헌

- Gest, H. and Kamen, M.D. : Science., 109, 558, 1949.
- Kim, J.S., Ito, K. and Takahashi, H. : Agric. Biol. Chem., 46(4), 937, 1982.
- Macler, B.A., Pelroy, R.A. and Bassham, J. A. : J. Bacteriol., 138(2), 446, 1979.
- Kho, Y.H., Lee, E.S. and Bae, M. : Large occurrence of ubiquinone-10 in *Rhodospseudomonas capsulata* H161 : Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng., 12, 15, 1984.
- Castel, J.D., Sinnhuber, R.O., Wales, J.H. and Lee, D.J. : J. Nutr., 102, 77, 1972.
- Kelley, B.C., Meyer, C.M., Gandy, C. and Vignais, P.M. : FEBB Lett., 81(2), 281, 1977.
- Pfenning, N. : Ann. Rev. Microbiol., 21, 285, 1967.
- Hirayama O. : Agric. Biol. Chem., 32, 34, 1968.
- Krebs, E.G. and Beavo, J.A. : Ann. Rev. Biochem., 48, 923, 1979.
- E.N. Kondratèva : Photosynthetic Bacteria. Israel. Program Sci. Transl. Jerusalem, 1965.
- Sasaki, K, M. Hayashi, S. Nagai : I. of Ferment. Technol., 56, No 3, 200, 1978.