

혐기성 미생물의 암발효를 통한 수소 생산 배지의 최적화

김규호, 김의용*
 서울시립대학교 화학공학과
 (eykim@uos.ac.kr*)

The optimization of hydrogen production medium by dark fermentation with anaerobe microorganism

Kyu Ho Kim, Eui Young Kim*
 Department of Chemical Engineering, University of Seoul, Seoul, Korea
 (eykim@uos.ac.kr*)

서론

전 세계적으로 수요가 급증하고 있는 화석연료의 사용과 그에 따른 매장량의 한계, 환경오염의 문제점은 대체에너지의 개발에 시급한 상황을 야기 시켰다. 또한 높은 수입에 너지의 의존도와 낮은 에너지 자립율은 그 상황을 더욱 악화시키는 요인이 되었다. 미래의 대체에너지이며 청정자원의 하나인 수소에너지는 이를 충족시켜줄 것이다. 하지만 수소에너지 생산에도 에너지와 자원의 소비가 뒤따르게 된다.

본 논문에서는 수소 생산 미생물에 대한 생물학적 수소에너지 생산방법 및 효율적인 생산을 위한 배지의 최적화를 연구하였다. 혐기성 조건의 혼합배지(Complex medium)에서 미생물의 암발효(dark fermentation)를 통한 배양과정에 여러 영향 인자들을 최적화 하는데 중점을 두었다. 수소 생산 미생물 중 수소 생산 효율이 뛰어난 *Enterobacter aerogenes*, *Clostridium butyricum*을 대상으로 potassium phosphate buffer를 이용한 초기 pH 설정과 buffer의 농도, 탄소원의 종류 및 양, 질소원의 종류 등의 최적화를 통하여 높은 수소 생산 수율에 도달하도록 노력하였다. 환원제로 사용된 L-cysteine의 영향을 알아보고 부산물인 유기산의 생성과 수소 생산의 상관관계를 알아보고 최대 수율에 해당하는 최적의 조건을 제시하였다. 덧붙여 두 미생물의 혼합배양을 통한 미생물간의 상호 작용 및 미생물의 분포도를 파악함으로써 미생물을 통한 수소 에너지의 생산이 가능하다는 것이 관찰되었다. 앞으로 수소 에너지의 생산과 저장·관리·사용할 수 있는 산업의 전반적인 시스템 구축이 요구된다.



위 식과 같이 이론적으로 1 mol glucose로부터 2 ~ 4 mol의 수소가 발생하지만 발효 중에 발생하는 pH의 변화, 유기산(organic acid)의 생성을 등은 균주의 성장에 방해요소로 작용하며 수소생산 효율을 크게 좌우한다. 그 외에 배지 내의 수소 분압, 체류시간, 중금속, 탄소원, 질소원 종류 등이 수소생산에 영향을 준다.

실험

본 실험에 사용된 균주는 탄소원을 주영양분으로 하여 혐기성 조건에서 암발효를 통해 수소와 부산물인 유기산(Organic Acid), CO_2 을 생산하는 미생물이다. 통성 혐기성인 *Enterobacter aerogenes* KCCM 40146 와 절대 혐기성인 *Clostridium butyricum* KCCM 35433 이며 한국미생물보존센터에서 균주 분양하여 제공받았다. 균주의 보관은 활성배양체(agar-plate) 상태로 4 °C에서 냉장보관 하였다.

본 실험에는 Medium No.2, Medium No.71, 혼합배지를 사용하였다. Medium No.2 배지는 *Enterobacter aerogenes* 종균배양 배지이며 조성은 다음과 같다 : beef extract 3 g, peptone 5 g, D.W 1 l, pH 7.0, Temp. 37 °C. Medium No.71 배지는 *Clostridium butyricum* 종균배양 배지이며 조성은 다음과 같다 : yeast extract 3 g, beef extract 10 g, peptone 10 g, soluble starch 10 g, glucose 5 g, cysteine hydrochloride 0.5 g, NaCl 5 g, sodium acetate 3 g, D.W 1 l, pH 6.80, Temp. 37 °C. 혼합배지의 조성은 다음과 같다 : glucose 30 g, peptone 5 g, K₂HPO₄ 14 g, KH₂PO₄ 6 g, Na₃C₆H₅O₇S·2H₂O 1 g, (NH₄)₂SO₄ 2 g, trace element solution (NaCl 0.1 g, MgCl₂·6H₂O 0.1 g, MnSO₄·6H₂O 0.015 g, FeSO₄·7H₂O 0.025 g, CuSO₄·5H₂O 0.005 g, CoCl₂·5H₂O 1.25×10⁻⁴ g), D.W 1 l, pH 6.7, Temp. 37 °C.

배지의 초기 pH를 설정하기 위하여 potassium phosphate buffer를 사용하였다. D.W 대신 혼합배지에 사용되는 KH₂PO₄ 와 K₂HPO₄을 각 0.3 M, 0.5 M, 1.0 M의 용액으로 만들어 혼합하여 초기 pH를 설정한 buffer 용액 1 l 를 사용하였다. 완충 역할로서 초기의 안정된 pH를 유지하였다.

활성배양체(agar-plate) 상태의 균주는 loop를 이용하여 먼저 Medium No.2, Medium No.71 배지 100 ml에 소량(colony) 접종 하고 인큐베이터(JISICO shaking incubator, 37 °C, 160 rpm)에서 2일간 배양한다. 균주의 상태를 최적화하기 위하여 3 ~ 4회 반복 배양하였으며 사전 적응(pre-conditioning)이 된 상태에서 혼합배지에 접종하였다. 혼합배지에 접종할 때에는 glove box(N₂ gas) 내에서 실행하였으며 종균 배양 배지에서 충분히 영양분을 섭취한 균주를 syringe를 이용하여 1 ml (1% V/V)을 혼합배지에 접종한다. 혼합배양의 경우 *En. aerogenes* : *Cl. butyricum* = 1 : 4 의 비율로 배지에 접종하였다(Mix). 총 배지의 양은 100 ml이고 initial head space는 60 ml이다. head space는 분석에서 sampling으로 인한 serum bottle 내의 head space의 변화를 감안한 것으로 변화된 부피에 대한 총 발생 gas 량과 gas 중의 H₂의 비율에 있어 매우 중요하다.

접종 직 후, bottle 내에 증가된 배지의 양으로 인한 압력을 제거하기 위하여 syringe를 이용하여 serum bottle 내를 대기압 상태로 만들어준다. 배양은 인큐베이터(37 °C, 160 rpm)에서 혐기, 암반응 조건에서 배양한다.

수소 생산 배지의 최적화를 위하여 몇 가지 인자를 변화하여 실험을 수행하였다. 먼저 미생물의 성장에 있어서 가장 큰 영향을 미치는 요소인 pH의 비교를 위하여 potassium phosphate buffer를 이용한 초기 배지의 pH를 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0으로 설정하고 대조군으로 buffer를 사용하지 않은 배지와 비교 실험하였다. 또한 buffer의 농도를 0.3 M, 0.5 M, 1.0 M 으로 하여 효율적인 buffer의 사용을 실험 하였다. 탄소원의 비교를 위하여 glucose 와 sucrose를 사용하였고, lag time을 비교하였다. 탄소원의 잔여량에 따른 비교를 위하여 탄소원의 양을 20 g, 25 g, 30 g으로 비교 실험하였다. 질소원의 비교를 위하여 urea, malt extract, yeast extract, peptone, tryptone을 각각 5 g 씩 넣어 여러 가지 질소원 조건에서 비교하였다. 환원제로 L-cysteine 사용하여 영향을 알아보고 유기산의 생성 및 소비 패턴을 분석하였다.

접종 후 3시간 경과, 6, 9, 12, 18, 24, 36, 48, 72, 96, 120, 144, 168시간 경과된 시점에서 syringe를 이용하여 gas(1 ml), liquid(1 ml) sampling하였다.

총 gas 생산량은 syringe를 serum bottle에 꽂아서 head space의 증가량을 기록하였다. 수소생산량(H₂)은 GC(Gas Chromatography, Young-Lin M600D, SUPELCO Carboxen 1000 column, TCD detector)로 분석하였다. 생산된 gas 중에 정확한 H₂ 생산량 분석을 위하여 표준 gas (H₂ 조성 비율 5%, 10%, 20%, 44%)를 사용하여 calibration하였다. Cell mass는 UV(Ultraviolet Spectroscopy, Varian Cary 50UV-vis, 10 mm Quartz cell)로 원시료의 10배 희석하여 660 nm에서 측정하고 건조중량법을 이용하여 그 양을 산출하였다. 잔여 당량분석은 UV로 glucose의 경우 DNS법에 의하여 546 nm 에서 측정하였고, sucrose의 경우 페놀-황산법에 의하여 490 nm 에서 측정하였다.

결과 및 고찰

Fig. 1, 2, 3 은 potassium phosphate buffer 0.5 M, initial pH 6.5, glucose 30 g/l, peptone 5 g/l 배지에서 *Enterobacter aerogenes*, *Clostridium butyricum*, 혼합 균주(Mix)를 배양하여 얻은 결과이다. pH가 5.0 ~ 5.5 범위에서 균주의 성장과 수소 생산이 동시에 이루어진다. 단독 배양일 때보다 혼합균주의 배양 때에 수소 생산능과 최대 수소 생산 속도가 높았다. 이는 두 균주 간의 상호작용으로 인한 결과로 판단된다. Buffer를 사용하지 않은 배지에서는 pH가 급감하면서 초기 균주의 성장이 높았다가 급감하였다. 1.0 M의 buffer 농도에서는 pH가 적정 범위에 들어서지 못한 채 균주의 성장이 이루어지지 않았다.

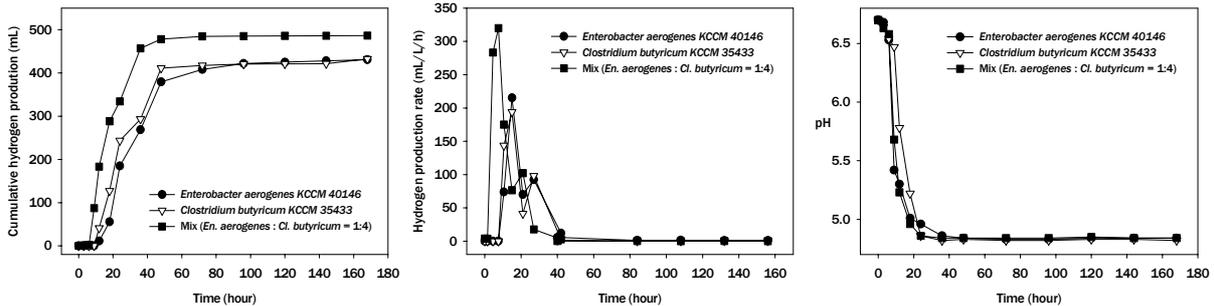


Figure 1. Cumulative hydrogen production of *bacteria* in medium.

Figure 2. Hydrogen production rate of *bacteria* in medium.

Figure 3. pH change of *bacteria* in medium.

탄소원의 종류로 glucose와 sucrose를 사용하였다. Lag time과 최대 수소 생산속도는 glucose의 경우 20 h, 215.3 ml/l/h이며, sucrose의 경우 36 h, 98.3 ml/l/h로 나타났다. 총 수소 생산량에서는 glucose의 경우 431 ml, sucrose의 경우 427 ml이다(Fig. 4).

탄소원의 양에서는 20, 25 g/L 에서 잔여 탄소원의 양으로 보아 거의 소비를 하였으며 30 g 이상의 경우에는 균주가 그 이상의 탄소원을 소비하지 못하였다(Fig. 5, Fig. 6).

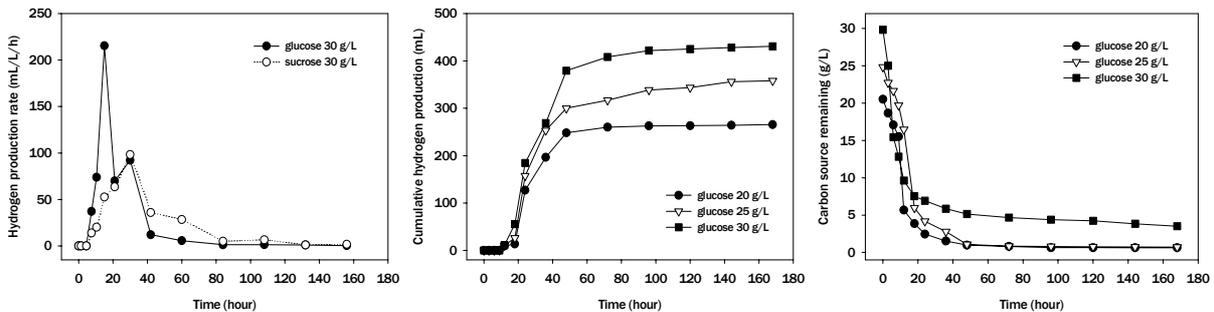


Figure 4. Hydrogen production rate of *Enterobacter aerogenes* in glucose medium and sucrose medium.

Figure 5. Cumulative hydrogen production of *Enterobacter aerogenes* in glucose medium.

Figure 6. Carbon source remaining of *Enterobacter aerogenes* in glucose medium.

Buffer를 사용한 초기 pH 설정 배지와 buffer의 농도에 따른 배지에서 *Enterobacter aerogenes*의 비성장속도(μ)와 수소의 비생산속도(q_p)를 나타낸 그래프이다(Fig. 7). Initial pH 6.5, buffer conc. 0.5 M 배지에서 효율이 가장 높았다. Buffer의 농도가 다를 때 비성장속도는 비슷한 값 (3.85 ~ 4.47)은 비슷하지만 수소의 비생산속도 값 (10.80 ~ 17.80)은 차이를 보인다. 균주의 성장이 높다고 해서 수소의 생산 또한 증가하는 것은 아니다. 즉, 수소 생산 배지 환경의 최적화일 때에 균주 성장 및 수소 생산이 극대화 된다. 질소원의 영향에서 peptone, tryptone에서 효율이 좋았으며, 질소원을 사용하지 않은 배지(no add)에서는 수소 생산이 거의 없는 것으로 보아 질소원이 균주의 성장에 영향을 미치는 것을

알 수 있다(Fig. 8). 환원제를 사용하였을 경우에는 첨가량에 비례하여 균주의 성장이 저조하였다(Fig. 9). 유기산의 생성·소비 패턴에서는 초기 pH 6.5 설정 배지에서 acetic acid의 양이 많았으며, 이는 배지의 산성화와 연관되어 수소 생산능을 저하시킨다(Fig. 10).

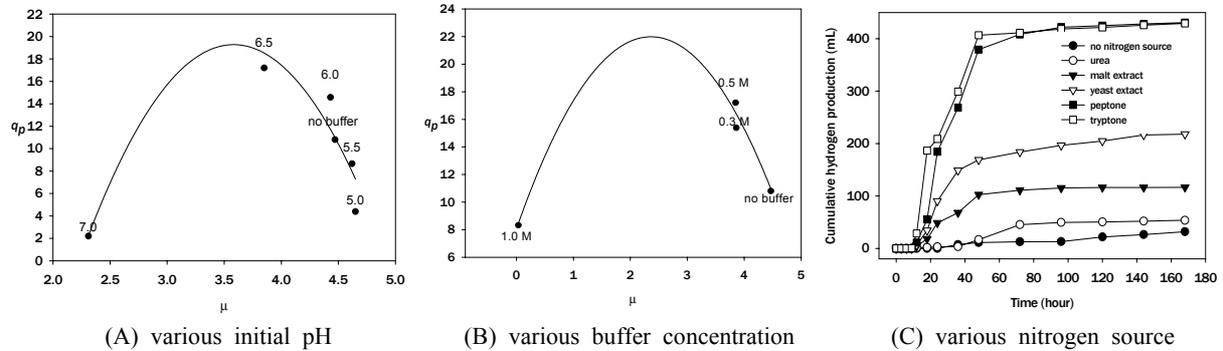


Figure 7. Correlation graph in cell growth per unit time & hydrogen production per unit time. (A), (B)
Figure 8. Cumulative hydrogen production of *Enterobacter aerogenes* in various nitrogen source. (C)

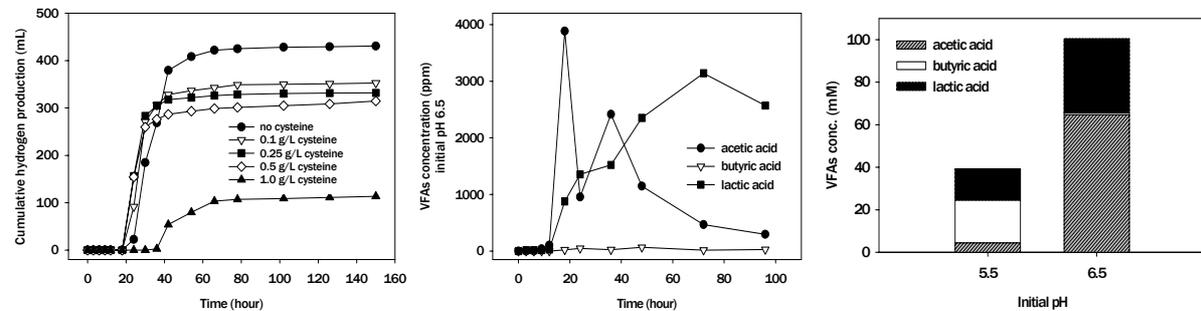


Figure 9. Effect of L-cysteine in cultivation process.
Figure 10. Pattern of created organic acid and total created organic acid in hydrogen production process.

Enterobacter aerogenes, *Clostridium butyricum*, 혼합균주(Mix)의 최적 배지 조건은 initial pH 6.5, potassium phosphate buffer conc. 0.5 M, glucose 30 g/l, peptone 5 g/l이다. 단위 glucose 당 수소 생산 mol 수는 *Enterobacter aerogenes* 1.058, *Clostridium butyricum* 1.061, 혼합균주(Mix) 1.194이며, 배지에 다량의 영양분을 첨가하거나 반응기의 크기를 크게 하여 압력에 대한 저항을 적게 하면 그 수치가 높아질 수 있다. (H_2 mol / mol glucose)

감 사

본 연구는 서울시 신재생 에너지 사업단에서 추진 중인 신재생 에너지 사업의 일원으로서 서울시 지원금으로 연구를 수행하였으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. M. Morimoto, M. Atsuko., "Biological production of hydrogen from glucose by natural anaerobic microflora", *Int. J. Hydrogen Energy* 29 (2004) 709-713
2. M. A. Rachman, Y. Furutani., "Enhanced hydrogen production in altered mixed acid fermentation of glucose by *Enterobacter aerogenes*", *J. Ferment. Bioeng.* 83 4 (1997) 358-363
3. Wen-Ming Chen., "Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge", *Int. J. Hydrogen Energy* 30 (2005) 1063-1070
4. H. Yokoi, T. Tokushige., " H_2 production from starch by a mixed culture of *Clostridium butyricum* and *Enterobacter aerogenes*", *Biotechnology Letters* 20 2 (1998) 143-147