

***Enterobacter aerogenes*와 *Clostridium butyricum*의 혼합 혐기발효를 통한 수소생산 패턴 분석**

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

Analysis of hydrogen production by mixed culture with *Enterobacter aerogenes* and *Clostridium butyricum*

Sung Hun Park, Kyu Ho Kim, Eui-Yong Kim*
Department of Chemical Engineering, University of Seoul
(eykim@uos.ac.kr*)

서론

전 세계적으로 가장 많이 이용 되고 있는 에너지원인 화석연료는 그 매장량에 한계가 있을 뿐만 아니라 각종 환경오염 문제를 야기한다. 따라서 친환경적이며 반영구적으로 사용 가능한 대체에너지 개발에 전세계가 뛰어들고 있다. 그 중 가장 각광 받는 대체에너지인 수소에너지는 그 자체의 에너지 효율이 높고, 연료전지에 직접 이용할 수 있다는 장점을 가지고 있어¹⁾, 전 세계적으로 연구에 박차를 가하고 있다. 수소를 생산하는 공정에는 여러 방법들이 알려져 있다. 특히 암발효에 의한 생물학적 수소생산 방법은 수소생산 속도가 빠르며, 태양광이 없어도 발효가 일어나기 때문에 밤낮의 구별 없이 수소를 생산할 수 있는 장점을 가지고 있다. 또한 균주의 성장속도가 빨라 산업적으로 수소를 대량생산 할 수 있는 기술로 받아들여지고 있다. 궁극적으로는 바이오 매스(식물자원) 또는 유기성 폐기물로부터 수소생산의 상용화가 목표가 될 것이다²⁾³⁾.

본 연구에서는 혐기성 미생물인 *Enterobacter aerogenes* 와 *Clostridium butyricum*을 이용하여 두 미생물을 혼합배양 하였을 경우의 수소생산 패턴을 분석하였다⁴⁾. 수소의 생산은 더 많은 양의 수소를 생산할 수 있도록 나무재질의 담체를 첨가한 반응기, 철성분의 담체를 첨가한 반응기, 담체를 첨가하지 않은 반응기로 나누어 실험하였다. 하나의 미생물을 단일 접종하여 배양했을 경우, *Enterobacter aerogenes*의 수소생산량은 0.446 mol/mol·glucose 이었고, *Clostridium butyricum*에서의 수소생산량은 1.235 mol/mol·glucose 이었다. 혼합배양의 경우 수소생산량이 1.434 mol/mol·glucose 으로 단일 접종을 통하여 배양한 것보다 많은 수소생산량을 보였다.

본론

1. 사용균주

사용된 균주는 통성 혐기성인 *Enterobacter aerogenes* (KCCM 40146) 와 절대 혐기성인 *Clostridium butyricum* (KCCM 35433) 이며 한국미생물보존센터에서 분양 받았다.

2. 사용배지

실험에 사용된 배지는 혼합배지를 사용하였다. 조성은 증류수 1L당 glucose 20 g, peptone 5 g, K_2HPO_4 14 g, KH_2PO_4 6 g, $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ 1 g, $(NH_4)_2SO_4$ 2 g이었고 trace element solution으로 NaCl 0.1 g, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.1 g, $MnSO_4 \cdot 6H_2O$ 0.015 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.025 g, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.005 g, $CoCl_2 \cdot 5H_2O$ 1.25×10^{-4} g을 첨가하였다. 산소를 제거하기 위하여 L-Cysteine 0.5 g을 첨가하였다. 배지를 Ar gas로 purging 하고 auto clave 에서 고온 멸균 하였다.

3. 접종 및 배양조건

실험에 사용된 *Enterobacter aerogenes* 와 *Clostridium butyricum* 은 agar plate를 통하여 미리 계대배양 하였으며, 혐기적 조건을 만족시켜 주기 위하여 N_2 가스로 치환된 glovebox에서 접종하였다. 접종 후 shaking incubator(Sam Woo Scientific Co)에서 37 °C, 130 rpm의 조건에서 배양하였으며, 균주가 배지에 최적화 될 수 있도록 2회 이상 반복 배양 하였다. 충분히 자란 균주를 나무와 철 재질의 담체가 담겨있는 반응기와 담체를 첨가하지 않은 반응기에 접종하였다. 반응기의 총 volume은 160 ml이었으며, 배지의 양은 100 ml이 되도록 하였다. Mixed culture 상태에서의 수소생산을 분석하기 위하여 각각의 반응기에서 자란 단일 균주가 성장을 멈출 때까지 기다린 후 *E.Aerogenes*가 자란 나무재질의 담체와 *C.Butyricum*이 자란 나무재질의 담체를 새로운 배지에 같은 비율로 혼합하여 접종하였다. 철 재질의 담체도 마찬가지로 방법으로 접종하였다.

4. 분석방법

수소발생에 영향을 미치는 다양한 인자를 측정하기 위하여 pH, cell mass의 농도, 잔존 glucose의 농도를 측정하였다. pH의 측정은 portable pH meter(Thermo Orion, model 720A)를 사용하였고, cell mass의 농도측정은 건조 중량법을 사용하여 측정하였다. 잔존 glucose의 농도측정은 DNS법을 따랐으며 UV spectrophotometer(Varian Technology Korea Co., CARY 50 Probe) 560nm에서 측정하였다. 가스의 조성은 배양기내 head space가스를 micro syringe로 1 ml를 채취하여 GC(영린M 600D)로 분석하였다. 사용된 column은 packed column(carboxen 1000)이고, TCD로 검출하였다. 분석온도는 oven 50 °C, injector 50 °C, detector 50 °C였으며, carrier gas로는 Ar gas 를 사용하였고, flow rate는 30 ml/min이었다.

결과

1. 수소의 생산

Fig. 1 에서 확인할 수 있듯이 *E.Aerogenes*를 단독 배양 했을 경우에는 나무재질의 담체를 넣은 반응기에서 103.7 ml의 수소를 생산하였다. 이때 glucose는 17 g을 사용하여 수율은 0.446 mol/mol-glucose 이었다. *C.Butyricum*을 사용한 경우는 *E.Aerogenes*와 마찬가지로 나무재질의 담체를 넣은 반응기에서 287.1 ml의 수소를 생산하였으며(Fig. 2), 이때의 수율은 1.235 mol/mol-glucose 이었다. 혼합배양의 경우 최고의 수소생산량을 나타낸 것은 나무재질의 *E.Aerogenes*와 *C.Butyricum*을 같은 비율로 혼합한 반응기에서였으며 333.3 ml의 높은 수소생산량을 보여주었다(Fig. 3). 이때의 수율은 1.434 mol/mol-glucose로 혼합배양을 했을 경우 단독배양의 경우보다 수소생산의 수율이 14% 가량 증가하는 것을 확인 할 수 있었다. 그리고 가장 수소생산이 활발하게 이루어진 시점을 알 수 있는 Hydrogen production rate는 *E.Aerogenes*, *C.Butyricum*, *Mixed culture* 각각의 조건에서 112.2, 210.3, 181.5 ml/h/L 으로 나타났다(Fig. 4). 이는 *C.Butyricum*의 경우 최적화된 배지조성 조건에서 1L의 반응기에서 시간당 210 ml의 수소를 생산할 수 있다는 것을 의미한다.

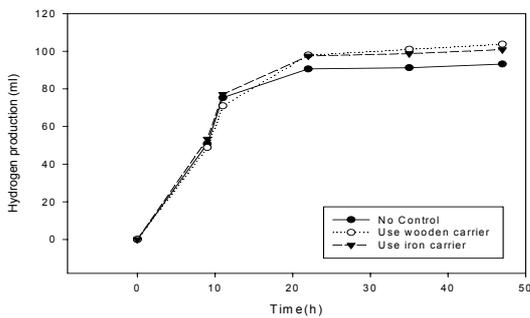


Figure 1. Hydrogen production by various carrier conditions in *E.aerogenes*.

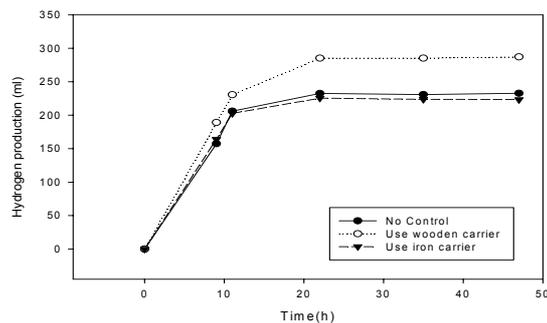


Figure 2. Hydrogen production by various carrier conditions in *C.butyricum*.

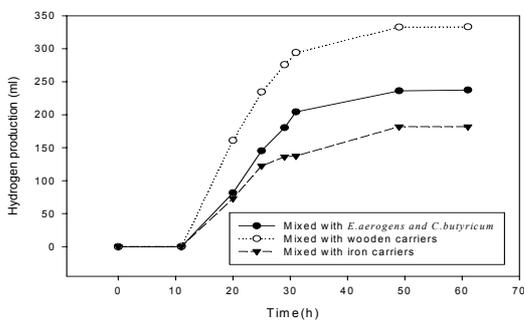


Figure 3. Hydrogen production by various carrier conditions in mixed culture.

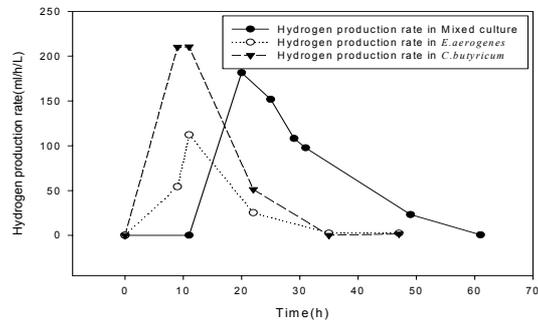


Figure 4. Hydrogen production rate in various medium conditions.

2. pH의 영향

균주가 성장하는데 있어 pH의 영향은 크게 나타났다. Fig. 5, 6, 7 에서 확인 할 수 있듯이 균주가 성장하면서 pH가 감소하는 경향을 볼 수 있으며, 특히 pH가 5.0 이하로 떨어지자 수소생산이 감소하는 것을 확인할 수 있다. 이러한 pH 저하의 원인은 균주가 발효의 과정을 통하여 부산물로 유기산을 생산하기 때문이다. 발효 과정 중 pH를 일정하게 조절할 수 있다면, 더욱더 높은 효율의 수소생산을 보일 것으로 보인다.

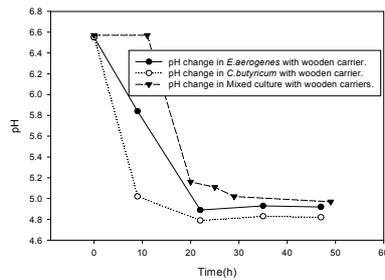


Figure 5. pH changes in various medium conditions.

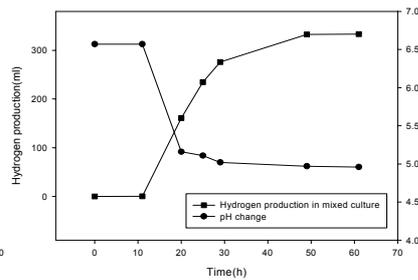


Figure 6. Comparison of hydrogen production and pH change in mixed culture.

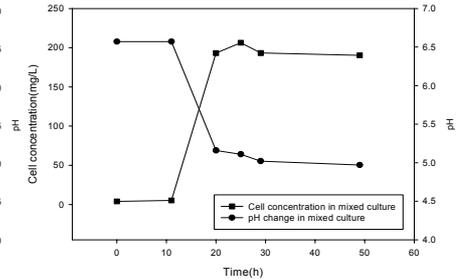


Figure 7. Comparison of cell concentration and pH change in mixed culture.

고찰

연구 결과 미생물의 단독배양에 의한 수소생산보다 혼합배양의 조건에서 좀 더 많은 수소가 생성되는 결과를 얻었다. 또한 나무재질의 담체를 이용 했을 경우 수소생산이 증가하는 경향을 보였다. 이 때의 수율(yield)은 1.434 mol/mol-glucose 이다. 후에 더 좋은 효율을 보이는 담체를 찾아내는 실험이 진행 되어야 한다고 본다.

감사

본 연구는 서울시 신 재생에너지 사업단에서 추진중인 신 재생에너지 사업의 일원으로써 서울시 지원금으로 연구를 수행 하였으며, 이에 감사 드립니다.

참고문헌

1. Ahmed, S., Krumpelt, M., "Hydrogen from hydrocarbon fuels for fuel cells", *International Journal of Hydrogen Energy* 26 (4), pp. 291-301 (2001)
2. 상병인, "유기성 폐기물로부터 혐기발효 미생물을 이용한 수소생산", *News&Information for chemical engineers, Vol. 24, No. 3* (2006)
3. Ching-Hsiung Wang, Ping-Jei Lin, Jo-Shu Chang., "Fermentative conversion of sucrose and pineapple waste into hydrogen gas in phosphate-buffered culture seeded with municipal sewage sludge", *Process biochemistry* 41. 1353-1358 (2006)
4. 김중곤 외 3인, "Clostridium beijerinchii KCTC 1785를 이용한 수소생산 최적화 조건 탐색", *Korean J. Biotechnol. Bioeng. Vol. 20, No. 6, 401-407* (2005)