

연속수소생성에 사용되는 고온 CSTR 내의 미생물의 분자적 분석

^{1,2}오 유 관 · ^{1,2}박 성 훈 · † ³안 영 희

¹부산대학교 화학생명공학과, ²부산대학교 환경기술산업개발연구센터, ³한국과학기술원 생명화학공학과

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

Molecular Analysis of the Microorganisms in a Thermophilic CSTR used for Continuous Biohydrogen Production

You-Kwan Oh^{1,2}, Sunghoon Park^{1,2}, and Yeonghee Ahn^{3†}

¹Department of Chemical and Biochemical Engineering, Pusan National University,
San 30 Jangjeon-dong, Kumjung-gu, Busan 609-735, Korea

²Institute for Environmental Technology and Industry, Pusan National University,
San 30 Jangjeon-dong, Kumjung-gu, Busan 609-735, Korea

³Department of Chemical and Biomolecular Engineering, Korea Advanced Institute of Science and Technology,
Guseong-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-701, Korea

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

Molecular methods were employed to investigate microorganisms in a thermophilic continuous stirred tank reactor (CSTR) used for continuous H₂ production. The reactor was inoculated with heat-treated anaerobic sludge and fed with a glucose-based medium. Denaturing gradient gel electrophoresis showed dynamic changes of bacterial populations in the reactor during 43 days of operation. Gas composition was constant from approximately 14 days but population shift still occurred. Populations affiliated with *Ferrihydrobacterium gondwanens* and *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* were dominant on 21 and 41 days, respectively. Keeping pH of the medium at 5.0 could suppress methanogenic activity that was detected during initial operation period. CH₄ and *mcrA* detected in the samples obtained from the reactor or inoculum suggested the heat treatment condition employed in this study is not enough to remove methanogens in the inoculum. PCR using primer sets specific to 4 main orders of methanogens suggested that major H₂-consuming methanogens in the CSTR belong to the order *Methanobacteriales*.

Key Words : Anaerobic, biohydrogen production, DGGE, microbial community, thermophilic CSTR

서 론

발효에 의한 H₂ 생산은 통성 또는 절대 혐기성 미생물이 혐기 하에서 유기물을 발효하는 과정에서 H₂가 생성되는 데 그 바탕을 둔다. 이 공정은 빛과는 상관없이 H₂를 생산할 수 있다는 장점과 더불어 광합성에 의한 H₂ 생산에 비해 일반적으로 반응이 빠른 것으로 알려졌다(1, 2). 혐기성 발효에 의한 연속 H₂ 생산 공정에 대한 연구는

continuous stirred tank reactor (CSTR)과 같은 현탁된 배양액을 주로 사용해왔다(1-3). CSTR과 같은 system들은 비교적 장비가 간편하며 운전도 용이하다는 장점이 있다. 그러나 biomass의 유실로 인해 반응기 내에 biomass 농도가 낮다는 단점이 있다.

혐기적 H₂ 생성 공정에 대한 많은 연구에도 불구하고 이 공정에 어떤 미생물들이 참여하며 공정의 동적변화특성에 따라 미생물들이 어떻게 동적으로 변화하는지에 대한 정보는 비교적 드물다(1-3). H₂ 생성 공정에서는 H₂를 발생하는 미생물에 대한 정보도 중요하지만 생성된 H₂를 소모하는 미생물에 대한 정보도 중요하다. 예를 들면 hydrogenotrophic methanogens은 H₂를 이용하여 CH₄을 생산하는 것으로 알려져 있다(4).

다양한 분자생물학적 기법이 개발됨에 따라 빠른 시간 내에 환경미생물을 배양하지 않고도 모니터링할 수 있게 되

† Corresponding Author : Department of Chemical and Biomolecular Engineering, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Guseong-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-701, Korea

Tel : +82-42-869-3941, Fax : +82-42-869-3910

E-mail : yahn@kaist.ac.kr

었다. 분자적 기법으로 최근에는 어떤 미생물들이 혐기적 H_2 생성공정에 존재하는지에 대한 지식이 축적되었다(5-9). 그러나 보고된 대부분의 연구는 반응기가 안정된 시점에서 취한 시료의 미생물군집에 대한 단편적인 정보만 제공하고 있는 수준이다. 공정의 동적 변화특성에 따른 군집조성의 동적변화와 생산된 H_2 를 소모하는 메탄생성균을 모니터링한 보고는 드물다.

고온 ($45\sim 65^\circ C$)발효에 의한 H_2 생산은 고온 미생물의 특성을 이용하므로 높고 안정된 H_2 생산을 할 수가 있으리라 여겨진다. 혐기상태에서 고온미생물은 중온균에 비해 유기물 분해속도가 높은 것으로 알려졌다(4). 고온에서 H_2 는 물에 덜 용해되므로 H_2 의 분압을 줄일 수 있어 높은 H_2 분압에 의한 H_2 생산의 저해를 덜 수가 있다(10). 또한 증류공장, 식품가공공장, 통조림 공장과 같은 곳에서 방출되는 고온 유기성 폐수를 고온 H_2 생산을 통해 활용할 수 있다는 장점도 있다.

이러한 장점에도 불구하고 중온보다는 고온 발효에 의한 H_2 생산에 대해서는 연구가 비교적 드물며, 보고가 된 것일지라도 유기산 또는 미생물에 대한 정보가 부족하여 (7, 8, 11) 반응기 성능에 대한 통합적 해석이 어렵다. 그래서 본 연구에서는 실험실 규모의 고온 CSTR을 이용하여 포도당을 기질로 H_2 를 생산하는 동안 반응기의 미생물을 분석하여 반응기 성능의 이해를 돕고자하였다.

재료 및 방법

CSTR 운전

본 연구에서는 pH controller가 장착된 실험실 규모의 working volume이 3 L인 5 L(KF-5L, Kobiotech, Korea) CSTR(12)을 사용하였다. 하수처리장에서 공급받은 혐기성 소화 슬러지를 채 (No. 12; 1.70 mm aperture)로 걸러 큰 입자를 제거하고 열처리 ($70^\circ C$, 30분)한 후 이 반응기에 식중하였다. 식중 후 초기 biomass 농도는 $5,350\text{ mg VSS/L}$ 이었고, VSS/TSS는 0.5이었다. CSTR에는 1.1 L 규모의 pyrex로 된 침전조 ($55^\circ C$)가 연결되었다. 반응기 내의 biomass를 유지하기 위해 침전조안의 biomass는 CSTR로 다시 도입시켰다. Biomass 재순환 속도는 배지 유입속도와 같게 조절하였다.

CSTR는 포도당을 기질로 하는 합성배지(8)를 공급하여 43일간 운전하였다. 반응기 온도와 유입되는 포도당 농도는 $55^\circ C$ 와 6.86 g/L 로 각각 일정하게 유지하였다. 반면에 체류시간 (hydraulic retention time, HRT)과 pH는 순차적으로 감소시켰다. HRT를 48 h, 36 h, 그리고 24 h로 순차적 감소를 시킴에 따라 유기물 부하량은 3.43에서 6.86 g glucose/Ld 로 증가되었다. 공급된 배지의 pH는 초기에 6.0이었으나 순차적으로 5.0으로 감소시켰다(Fig. 1E). 배지는 N_2 gas (99.999%)로 5분간 처리 후 autoclave된 membrane (pore size, $0.45\ \mu m$; Sartorius AG, Goettingen, Germany)으로 여과 멸균한 후에 반응기로 도입시켰다.

CSTR의 온도는 반응기의 중앙에 설치된 hypodermic thermocouple probe (Cole-Parmer)와 온도계 (Digi-Sense,

Cole-Parmer)로 모니터링하였다. 조류 (algae)의 성장을 억제하기 위해 반응기는 알루미늄 foil로 싸서 빛을 차단하였다. 반응기 운전 조건을 바꿀 때는 18배 이상의 HRT 동안 한 조건하에 반응기를 운전한 후와 가스 농도를 3번 연속 측정하여 같은 값을 나타낼 때를 안정상태로 가정하였다.

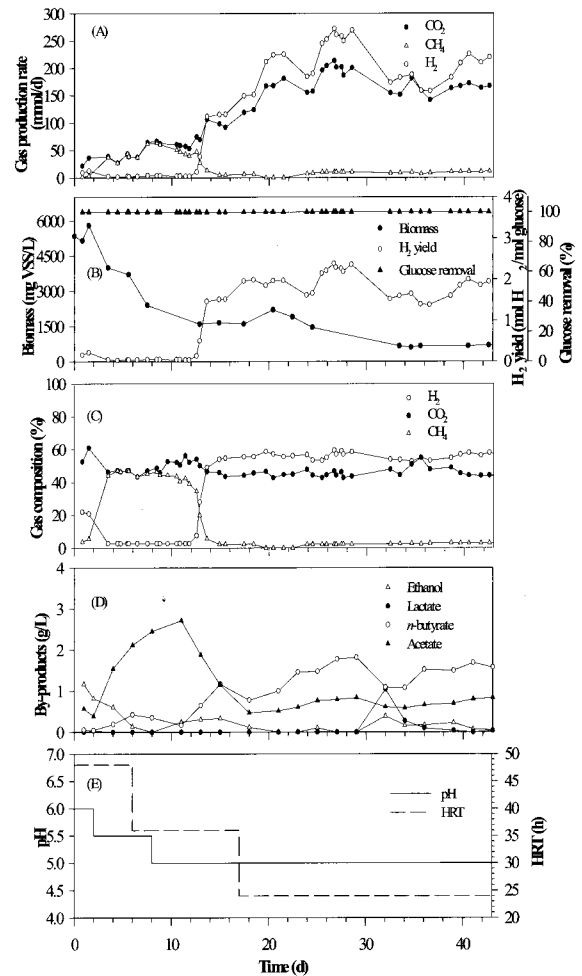


Figure 1. Performance of the thermophilic CSTR used for H_2 production.

분석방법

생산된 biogas의 부피는 wet gas meter (W-NK, Shinagawa, Tokyo, Japan)로 측정하였고, 한편 biogas 내의 H_2 , CO_2 , CH_4 , 그리고 N_2 조성은 문헌(11)에 기술된 것과 같이 gas chromatograph로 측정하였다. 유출수 내의 다양한 유기산, ethanol, 그리고 포도당의 농도는 high-performance liquid chromatograph (HPLC, 1100 series, Agilent Technologies, Forster, CA)로 측정하였다(11). 분석된 유기산은 다음과 같다; succinate, lactate, formate, acetate, propionate, *n*-butyrate, iso-butryate, *n*-valerate, iso-valerate, 그리고 *n*-caproate. 분석은 각 안정상태에서 3번 이상 실시하여 평균하였다. 유출수내의 biomass (VSS)는 Standard methods(13)에 따라 측정하였다.

DNA 추출

식중슬러지나 반응기로부터 취한 시료 6 mL을 원심 분리

하여 biomass를 획득한 후 phosphate-buffered saline (0.13 M NaCl, 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.2)으로 세척하고, Soil DNA isolation kit (Mo Bio Labs. Inc., Solana Beach, CA)을 사용하여 제조회사의 지시대로 DNA를 추출하였다. DNA 농도는 Lambda 12 spectrophotometer (Perkin Elmer, Foster city, CA)로 측정하였고, 추출된 DNA는 polymerase chain reaction (PCR)에 사용되었다.

Table 1. Reference strains and PCR primer sets used in this study

Primer pair	Size of PCR product (kb)	Target phylogenetic group or gene	Reference strain
518r/341f	0.2	Bacteria	<i>Pseudomonas putida</i>
109f/915r	0.83	Archaea	methanogen
ME1/ME2	0.76	<i>mcrA</i>	methanogen
Lf/Lr	0.47	<i>mcrA</i>	methanogen
109f/1401r	1.31	Methanobacteriales	<i>Methanobacterium bryantii</i> DSM 863 ^T
344f/1202r	0.88	Methanococcales	<i>Methanococcus jannashii</i> DSM 2661 ^T
355f/1068r	0.73	Methanosarcinales	<i>Methanosarcina barkeri</i> DSM 10131 <i>Methanosaeta concilli</i> DSM 3671 ^T <i>Methanomicrobiales</i> <i>Methanospillium hungatei</i> DSM 864 ^T

PCR

PCR은 16S rRNA 유전자 단편을 증폭하여 Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) 분석에 사용하거나, 메탄생성균이 가지는 *mcrA* 유전자를 증폭하는데 사용하였다. 본 연구에 사용한 PCR primers는 Table 1에 나타내었으며 PCR 반응은 문헌(5)에 기술된 것과 같이 실시하였다. Primers 357f-GC와 518r을 사용하여 16S rRNA 유전자 단편 (*Escherichia coli* numbering에 의해 341-534 위치에 해당하는 약 194-bp PCR 산물)을 증폭하였다. PCR 산물은 agarose gel 전기영동을 실시하여 그 크기를 확인한 후에 DGGE에 사용하였다.

메탄생성균이 가지는 *mcrA* 유전자를 증폭하기 위해 두 sets의 primers를 사용하였다 메탄생성균을 검출하기 위해 (Table 1); ME1/ME2(14) 그리고 Lf/Lr(15). 유전자 *mcrA* PCR에서 positive control로서는 *Methanosarcina barkeri* DSM 10131로부터 추출한 total DNA를 사용하였고, 한편 negative control로는 *Pseudomonas putida* DNA를 template로 사용하였다. 아울러 template DNA를 첨가하지 않은 PCR 반응도 negative control로 사용하였다.

유전자 *mcrA*가 PCR 증폭된 시료에 있는 메탄생성균의 계통발생학적 위치를 조사하였다. 이 때 메탄생성균의 주요 목 (order)에 특이적인 PCR primers를 사용하여 16S rRNA 유전자 단편을 증폭하였다(16). *Methanobacteriales*에 특이적인 109f/1401r, *Methanosarcinales*와 *Methanomicrobiales*에 특이적인 355f/1068r, *Methanococcales*에 특이적인 344f/1202r. 이 때 PCR에서 positive controls로서는 다음의 균주로부터 추출한 total DNA를 사용하였다. *Methanobacterium bryantii* DSM 863^T, *Methanosarcina barkeri* DSM 10131, *Methanosaeta concilli* DSM 3671^T, *Methanospillium hungatei* DSM 864^T, 그리고 *Methanococcus jannashii* DSM 2661^T(Table 1). 이들은 *Methanobacteriales*, *Methanosarcinales*, *Methanomicrobiales*, 그리고 *Methanococcales* 목에 각각 해당한다. Negative controls은 *P. putida* DNA를 template

로 사용하거나 template DNA를 첨가하지 않은 PCR 반응을 사용하였다. PCR 산물은 agarose gel 전기영동 후 디지털 이미지를 얻었고 필요에 따라 SigmaGel (Jandal Scientific, San Rafael, CA)을 사용하여 DNA band의 강도를 측정하였다.

DGGE 분석

반응기 내의 미생물 군집을 조사하기 위해 PCR로 증폭한 16S rRNA 유전자 단편을 사용하여 DGGE를 실시하였다. PCR 산물은 문헌(5)에 기술된 것과 같이 DCode System (Bio-Rad, Hercules, CA)을 사용하여 분리하였다. 주요 DNA bands는 DGGE gels로부터 잘라내어 PCR로 다시 증폭하고, 증폭된 PCR 산물은 정제 kit (Bioneer Co., Daejeon, Korea)으로 정제한 후에 nucleotide sequencing을 실시하였다. Ribosomal Database Project II의 CHIMERA CHECK program을 이용하여 chimeric sequences를 가진 nucleotide sequences는 스크린 및 배제시켰다. 또한 BLASTN (version 2.2.10)을 이용하여 GenBank database에서 가장 유사한 염기서열을 검색하였다.

결과 및 고찰

반응기 성능

H₂ 생산속도와 H₂ 수율의 안정화를 근거로 판단컨대 고온 CSTR의 start-up기간은 30일 이내로 나타나(Fig. 1A & 1B), 중온 CSTR에 비해 반 정도 짧은 편이었다(17). H₂ 생산 수율은 초기에 1 mol H₂/mol glucose 이하였으나 약 14일부터는 1.5 이상을 나타내어 그 때부터 실험기간 동안의 H₂ 수율의 평균값은 1.9 mol H₂/mol glucose이었다. 고온 CSTR의 최고 H₂ 수율은 2.4 mol H₂/mol glucose이었으며, 최고 H₂ 생산속도는 87 mmol H₂/L.d로 나타났다. 문헌(1-3)과 비교하면, 본 연구의 최고 H₂ 수율은 복합미생물을 사용한 중온 반응기의 것에 비해 우수한 것으로 나타났으며 최고 H₂ 생산속도는 낮은 편이다. 낮은 H₂ 생산속도는 유입된 포도당 농도 (6.86 g/L)가 낮고, HRT가 길기 때문인 것으로 판단된다. 이렇게 낮은 포도당 농도를 사용한 것은 H₂ 생산속도가 아닌 H₂ 수율에 본 연구는 초점을 두었기 때문이다.

약 14일부터 관찰된 biogas의 전형적 조성 (v/v)은 H₂가 53 ± 4% 그리고 CO₂는 47 ± 4%이었다(Fig. 1C). 운전 초기에 생산된 biogas의 40% 이상 CH₄이 검출됨으로써 본 연구에서 식중 슬러지를 열처리하는데 사용한 조건은 메탄생성균을 완전히 제거하는데 불충분하다는 것을 알 수 있었다. 그러나 14일부터는 CH₄이 무시할 수준으로 검출되었다. 그래서 본 연구에서 사용한 CSTR 조건이 메탄생성균의 활성을 억제하는 것으로 나타났다.

CSTR에서 생산된 주요 유기산 중에서 가장 높은 농도를 나타낸 acetate의 농도가 반응기 운전 11일까지는 계속 증가하였으나 그 이후로 감소하였다가 18일 이후로는 일정하였다(Fig. 1D). 운전 15일에는 *n*-butyrate과 acetate의 농도가 같아졌고 그 이후로는 *n*-butyrate이 CSTR에서 생산된 주요 유기산 중에서 가장 높은 농도를 나타내었다. 운전 32일 경에 lactate와 ethanol의 농도가 일시적으로 증가함에

따라 *n*-butyrate의 농도, H₂ 수율과 생산속도도 감소하였다.

Biomass 농도

CSTR은 비교적 사용 장비가 간단하다는 장점으로 흔히 수소생성연구에 사용되나 미생물이 현탁된 형태로 존재하므로 유실되어 반응기내에 균체량이 낮은 단점이 있다. 그래서 본 연구에서는 유출된 biomass를 침전조로부터 CSTR로 재도입 시킴으로써 반응기 내에 biomass를 유지하고자 하였다. 식종 후 초기 biomass 농도는 5,350 mg VSS/L이었으나 시간이 감에 따라 점점 감소하여 13일부터는 1,450~2,200 mg VSS/L 범위를 유지하다가 33일 이후는 595-812 mg VSS/L을 유지하였다(Fig. 1B). 비교적 긴 HRT (48~24 h)와 침전조를 이용한 biomass의 재순환에도 불구하고, 반응기안의 biomass 농도는 다른 반응기에서 보고된 것에 비해 낮은 편이었다(18). 이것은 본 연구에서 사용한 포도당의 농도가 낮을 뿐만 아니라 반응기 운전이 진행됨에 따른 미생물 조성의 변화(DGGE 결과 참조)와 더불어 슬러지 침강에 관련된 미생물의 점차적인 소실 및 수적 약화로 인한 것으로 여겨진다. 그래서 biomass의 침전성이 감소되어 침전조를 이용하여 미생물을 CSTR로 재도입하여 반응기내의 biomass 양을 확보하고자 한 전략에는 한계가 있는 것으로 드러났다.

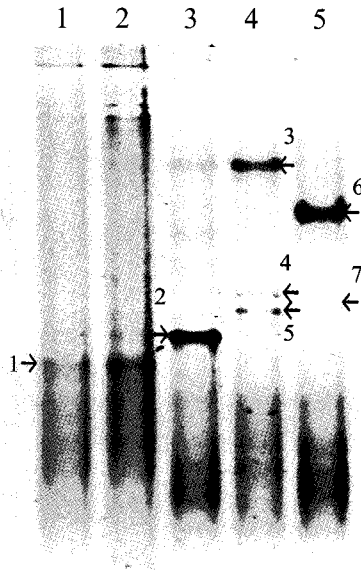


Figure 2. DGGE profiles of PCR-amplified 16S rDNA of thermophilic CSTR samples. Arrows indicate bands whose nucleotide sequences are most closely related with *T. thermosaccharolyticum*. Lanes: 1, unheated seed; 2, heated seed; 3, 8 days; 4, 21 days; 5, 41 days.

미생물 군집조성의 동적 변화

식종 후 43일간의 운전 기간 동안에 관찰된 미생물 군집 조성은 동적인 변화를 나타내었다(Fig. 2). 약 14일부터 관찰된 일정한 biogas 조성 (v/v)에도 불구하고(Fig. 1C) 미생물 군집은 동적 변화를 나타내었다. 또한 식종 미생물과 CSTR 시료의 DGGE band가 나타난 패턴이 다른 것으로 보아 CSTR 조건이 식종된 미생물 군집의 조성에 변화를 야기한

것으로 사료된다. 식종 미생물 시료는 열처리해 상관없이 비슷한 DGGE profiles을 나타내어 *Bacteria* domain에 해당하는 미생물 조성은 비슷함을 나타내었다.

반응기에 식종된 열처리한 혐기성 소화슬러지에서는 연하게 염색된 가는 DNA band가 여러 개 나타났다. 그러나 반응기를 운전함에 따라 채취한 시료에서는 2~3개의 진하게 염색된 굵은 밴드가 관찰되는 것으로 보아 CSTR의 운전조건 하에 농화 배양된 우점종임을 알 수 있었다. 본 연구에서 침전조를 이용해 유실된 biomass를 재순환하여 반응기내 biomass를 유지하고자 한 전략이 효과가 없었던 것은, 이렇게 한 개체군의 우세와 더불어 슬러지 침강에 관련된 다른 균의 점차적인 소실 및 수적 약화에 기인한 것으로 여겨진다.

반응기 운전 8, 21, 그리고 41일째 채취한 시료의 주요 bands (Fig. 2의 bands 2, 3, 그리고 6)는 *Clostridium cellulosi*, *Fervidobacterium gondwanens*, 그리고 *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*에 계통발생학적으로 가장 연관되어있는 것으로 나타났다(Table 2). *Clostridium*과 *Thermoanaerobacterium*속은 *Clostridia* 강 (class)에 속하나 *Fervidobacterium*은 *Thermotogae* 강에 속한다. *C. cellulosi*는 고온 H₂ 생산 배양액에서 보고된 바 있으며(7). *F. gondwanens*는 포자를 형성하지 않는 gram 음성균으로서 포도당을 발효하여 H₂, lactate, acetate, ethanol, 그리고 CO₂를 발생하는 것으로 보고되었다(19). *T. thermosaccharolyticum*의 H₂ 생산능도 이미 알려졌으며(6, 20), 고온 H₂ 생산에 사용된 혐기성 반응기에서 이 세균과 계통발생학적으로 연관된 균이나 16S rRNA 유전자 단편이 발견되었다고 보고 되었다(5, 7-9).

혐기성 H₂ 생산에 사용된 반응기의 안정상태에서는 일반적으로 *Clostridia* 강에 속하는 미생물이 우점으로 발견되었다(1-3, 5, 7-9). 고온 반응기에서는 *Clostridia* 강 중에서 *Thermoanaerobacterium* 속 (genus)에 속하는 미생물이 우세한 것으로 보인다(5, 7-9). 본 연구를 통해 *T. thermosaccharolyticum*와 계통발생학적으로 관련된 개체군이 고온 CSTR 조건하에서도 상당히 농화 배양되었음을 알 수 있었다. 다양한 탄소원과 반응기 형태를 사용하여 H₂ 생산을 연구한 전 보고들(5, 7-9)도 *T. thermosaccharolyticum* 관련 균들이 고온 H₂ 생산에 중요한 역할을 하는 것으로 보고하였다.

Table 2. Characteristic of DNA fragments obtained from DGGE gel

DGGE band	GenBank search result		Taxonomic description (class)
	Phylogenetically closest relative (accession no.)	Similarity	
1	Beta proteobacterium 5Z-C1 (AJ224618)	92	<i>β-Proteobacteria</i>
2	<i>Clostridium cellulosi</i> (L09177)	99	<i>Clostridia</i>
3	<i>Fervidobacterium gondwanense</i> (Z49117)	98	<i>Thermotogae</i>
4	<i>Clostridium thermoamylolyticum</i> DSM 2335 (X76743)	98	<i>Clostridia</i>
5	<i>Thermoanaerobium lactoethylicum</i> (L09170)	97	<i>Clostridia</i>
6	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> strain D120-70 (AF247003)	99	<i>Clostridia</i>
7	<i>Acetanaerobacterium elongatum</i> strain Z7 (AY487928)	92	<i>Clostridia</i>

*Name of the DGGE band (16S rRNA gene fragment) in Fig. 2.

유전자 *mcrA*를 이용한 메탄형성균의 분석

본 연구에서 식종 슬러지를 열처리하는데 사용한 조건은 메탄생성균을 완전히 제거하는데 불충분하여 운전 초기에 CH₄이 biogas에서 검출되었고(Fig. 1C), 식종 슬러지와

반응기로부터 취한 시료에서 메탄생성균이 가지는 *mcrA* 유전자가 PCR로 증폭되었다는 점으로 알 수 있었다(Fig. 3). 유전자 *mcrA*는 메탄형성에서 주요역할을 하는 methyl coenzyme M reductase의 α -subunit을 암호화한다. 유전자 *mcrA*에 특이적인 2 sets의 primers를 사용하여 PCR로 시료 내의 메탄생성균을 분석하였다. 본 연구에 사용된 이 2 sets의 primers는 계통발생학적 적용범위가 다른 것으로 보고 되었다(21).

PCR 분석을 한 결과 식중슬러지와 반응기 운전 8일과 41일째 취한 시료에서 *mcrA* 유전자를 증폭할 수 있었으며, 두 sets의 primers는 같은 결과를 나타냈다(Fig. 3). 운전 8일째 취한 시료에서 증폭된 *mcrA* 유전자는 가스분석 결과를 뒷받침하였다: 이 때 분석된 biogas의 45%는 CH₄가 차지하였다. 비록 반응기 운전 41일째는 CH₄은 검출되지 않았으나, 매우 약하게 염색된 PCR 산물을 나타내었다. 그래서 pH 5.0인 고온 CSTR 환경에서 메탄생성균의 수가 감소되었거나 CH₄를 생산할만큼 활성이 활발하지는 않는 것

으로 여겨진다. 운전 21일에 취한 시료에서는 *mcrA* 유전자가 증폭이 되지 않아 본 연구에서 사용한 조건에서 PCR 산물이 나타나지 않을 정도로 메탄생성균이 수가 아주 적은 것으로 추측된다.

16S rRNA 유전자를 이용한 메탄형성균의 분석

유전자 *mcrA*가 PCR 증폭된 시료에 있는 메탄생성균의 계통발생학적 위치를 조사하기위해 메탄생성균의 주요목(order)에 특이적인 PCR primers를 사용하여 16S rRNA 유전자 단편을 증폭하였다(Fig. 4). 전기영동 사진의 디지털 이미지를 분석한 결과 식중슬러지에 있는 메탄생성균들은 주로 *Methanosarcinales*와 *Methanomicrobiales* 목에 속하였으며(Fig. 4 오른쪽 위 사진), 8일째 검출된 메탄생성균들은 주로 *Methanobacteriales* 목에 해당되는 것으로 나타났다(Fig. 4 왼쪽 아래 사진). *Methanobacteriales* 목에 속하는 메탄생성균은 전형적인 hydrogenotrophic methanogens으로서 H₂를 기질로 하여 CH₄을 생산한다.

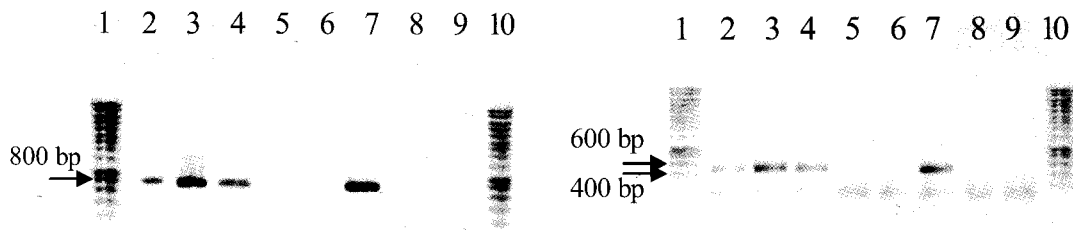


Figure 3. PCR detection of *mcrA* genes in thermophilic CSTR using primers ME1/ME2 (left) and primers Lf/Lr (right). Lanes: 1 & 10, size marker; 2, unheated seed; 3, heated seed; 4, 8 days; 5, 21 days; 6, 41 days; 7, *Methanosarcina barkeri* DSM 10131 (+ control); 8, no template DNA (- control); 9, *Pseudomonas putida* (- control).

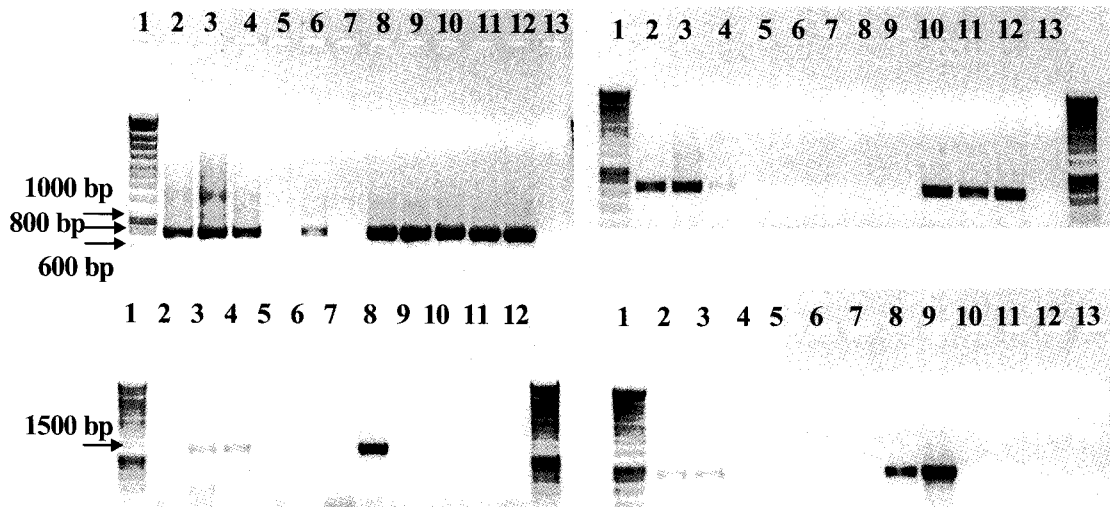


Figure 4. PCR detection of Archaea-related phylogenetic groups in thermophilic CSTR. Primer sets used in the PCR were 109f & 915r specific to Archaea (top left), 355f & 1068r specific to *Methanosarcinales* and *Methanomicrobiales* (top right), 109f & 1401r specific to *Methanobacteriales* (bottom left) and 344f & 1202r specific to *Methanococcales* (bottom right). Lanes: 1, size marker; 2, unheated seed; 3, heated seed; 4, 8 days; 5, 21 days; 6, 41 days; 7, no template DNA (- control); 8, *Methanobacterium bryantii* DSM 863^T; 9, *Methanococcus jannashii* DSM 2661^T; 10, *Methanosarcina barkeri* DSM 10131; 11, *Methanosaeta concilli* DSM 3671^T; 12, *Methanospillium hungatei* DSM 864^T; 13, *Pseudomonas putida* (- control).

*Methanococcales*에 특이적인 344와 1202 primer 쌍에 의해 *Methanobacteriales* 목에 해당하는 *Methanobacterium bryantii* DSM 863^T로부터도 PCR 산물이 증폭되는 것(Fig. 4 오른쪽 및 사진)으로 보아 사용한 PCR 조건 하에서 이 primer 쌍의 특이성이 높은 것은 아닌 것으로 보인다(Cardiff 대학의 A. Weightman 교수와 개인 교신). 그럼에도 불구하고 Fig. 4의 결과는 *Methanobacteriales*에 해당하는 메탄생성균들이 pH 5.5에서도 활성이 억제되지 않고 H₂를 이용하여 CH₄을 발생하는데 주요한 역할을 한 것으로 여겨진다. 계통발생학적으로 *Archaea* domain에 속하는 모든 미생물이 메탄생성균은 아니나 메탄생성균은 이 domain에 속한다. *Archaea*에 특이적인 primers를 이용한 PCR 결과는 목에 특이적인 PCR과 *mcrA* PCR 실험과정에 오류가 없었음을 확인하기 위해서 실시하였다(Fig. 4의 왼쪽 위 사진).

요 약

1. 고온 CSTR은 비교적 짧은 start-up 기간과 높은 H₂ 수율을 나타내었다. H₂ 생산속도와 H₂ 수율의 안정화를 근거로 판단컨대 start-up 기간은 30일 이내이었으며, 최고 H₂ 수율은 2.4 mol H₂/mol glucose이었다.
2. 비교적 긴 HRT와 침전조를 이용한 biomass의 재순환에도 불구하고, 유입 포도당의 농도가 낮아 biomass 농도는 다른 중온 반응기에서 보고된 것에 비해 낮은 편이었다.
3. 운전 초기에 CH₄이 발생하였으나 8일 이후부터는 pH를 5.0 이하로 유지하였더니 14일 이후로는 거의 검출되지 않는 것으로 봐서 메탄생성균이 식종균에 남아 있더라도 반응기 운전조건을 통해 CH₄ 발생을 억제할 수 있었다.
4. 식종 미생물과 반응기로부터 취한 시료의 DGGE band 패턴이 다른 것으로 보아 고온 CSTR 조건에서 식종된 미생물 군집의 조성이 변화하였음을 알 수 있었다.
5. DGGE 분석결과 초기 43일간의 운전기간 동안에 관찰된 미생물 군집조성은 동적인 변화를 나타내었다. 약 14일부터는 biogas 조성이 거의 일정하였으나 미생물 군집은 동적 변화를 나타내었다. *F. gondwanensis*와 *T. thermosaccharolyticum*과 계통발생학적으로 가장 연관이 있는 개체군들이 운전 21일과 41일째에 각각 우점으로 나타났다.
6. 본 연구에서 식종 슬러지를 열처리하는데 사용한 조건은 메탄생성균을 완전히 제거하는데 불충분하다는 것은 운전 초기에 CH₄이 biogas에서 검출되었고, 식종 슬러지와 반응기로부터 취한 시료에서 메탄생성균이 가지는 *mcrA* 유전자가 PCR로 증폭되었으므로 알 수 있었다.
7. 메탄생성균의 주요 목에 특이적인 primers를 사용하여 PCR을 실시한 결과 식종슬러지에 있는 메탄생성균들은 주로 *Methanosarcinales*와 *Methanomicrobiales* 목에 속하였으며, CH₄이 발생했던 때의 반응기에 있는 메탄생성균들은 주로 *Methanobacteriales* 목에 해당되는 것으로 나타났다.

감 사

본 연구는 한국학술진흥재단 (과제번호, KRF-2003-003-D00230)의 지원에 의하여 수행되었습니다.

REFERENCES

1. Das, D. and T. N. Veziroglu (2001), Hydrogen production by biological processes: a survey of literature, *Int. J. Hydrogen Energy* **26**, 13-28.
2. Angenent, L. T., K. Karim, M. H. Al-Dahhan, B. A. Wrenn, and R. Domiguez-Espinosa (2004), Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater, *Trends Biotechnol.* **22**, 477-485.
3. Nath, K. and D. Das (2004), Improvement of fermentative hydrogen production: various approaches, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **65**, 520-529.
4. Zinder, S. H. (1990), Conversion of acetic acid to methane by thermophiles, *FEMS Microbiol. Rev.* **75**, 125-138.
5. Ahn, Y., E.-J. Park, Y. K. Oh, S. Park, G. Webster, and A. J. Weightman (2005), Biofilm microbial community of a thermophilic trickling biofilter used for continuous biohydrogen production, *FEMS Microbiol. Lett.* **249**, 31-38.
6. Ueno, Y., S. Haruta, M. Ishii, and Y. Igarashi (2001), Characterization of a microorganism isolated from the effluent of hydrogen fermentation by microflora, *J. Biosci. Bioeng.* **92**, 397-400.
7. Ueno, Y., S. Haruta, M. Ishii, and Y. Igarashi (2001), Microbial community in anaerobic hydrogen-producing microflora enriched from sludge compost, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**, 555-562.
8. Liu, H., T. Zhang, and H. H. Fang (2003), Thermophilic H₂ production from a cellulose-containing wastewater, *Biotechnol. Lett.* **25**, 365-369.
9. Shin, H.-S. and J.-H. Yoon (2005), Conversion of food waste into hydrogen by thermophilic acidogenesis, *Biodegradation* **16**, 33-44.
10. Van Groenestijn, J. W., J. H. O. Hazewinkel, M. Niendoord, and P. J. T. Bussmann, (2002), Energy aspects of biological hydrogen production in high rate bioreactors operated in the thermophilic temperature range, *Int. J. Hydrogen Energy* **27**, 1141-1147.
11. Oh, Y.-K., S. H. Kim, M.-S. Kim, and S. Park (2004), Thermophilic biohydrogen production from glucose with trickling biofilter, *Biotechnol. Bioeng.* **88**, 690-698.
12. Ahn, Y., Y.-K. Oh, and S. Park (2005), Thermophilic biohydrogen production from glucose with a long-term operation of CSTR, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **20**, 423-427.
13. American Public Health Association (1995). Standard methods for examination of water and wastewater, 19th ed., American Public Health Association, Washington DC, USA.
14. Hales, B. A., C. Edwards, D. A. Ritchie, G. Hall, R. W. Pickup, and J. R. Saunders (1996), Isolation and identification of methanogen-specific DNA from blanket bog peat by PCR amplification and sequence analysis, *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 668-675.
15. Luton, P. E., J. M. Wayne, R. J. Sharp, and P. W. Riley (2002), The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill, *Microbiology* **148**, 3521-3530.
16. Banning, N., F. Brock, J. C. Fry, R. J. Parkes, E. R. C. Hornibrook, and A. J. Weightman (2005), Investigation of the methanogen population structure and activity in a brackish lake sediment, *Environ. Microbiol.* **7**, 947-960.
17. Chen, C. C., and C. Y. Lin (2001), Start-up of anaerobic hydrogen producing reactors seeded with sewage sludge, *Acta Biotechnologica* **21**, 371-379.

18. Oh, Y.-K. (2004), Biological hydrogen production by *Citrobacter* sp. and development of thermophilic process using trickling biofilter reactor. Ph.D Dissertation, Dept. of Chemical and Biochemical Engineering, Pusan National University, Busan, Korea.
19. Andrews, K. T. and B. K. Patel (1996), *Fervidobacterium gondwanense* sp. nov., a new thermophilic anaerobic bacterium isolated from nonvolcanically heated geothermal waters of the Great Artesian Basin of Australia, *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**, 265-269.
20. Lee, C. K. and Z. J. Ordal (1967), Regulatory effect of pyruvate on the glucose metabolism of *Clostridium thermosaccharolyticum*, *J. Bacteriol.* **94**, 530-536.
21. Lueders, T., K.-J. Chin, R. Conrad and M. Friedrich (2001), Molecular analyses of methyl-coenzyme M reductase α -subunit (*mcrA*) genes in rice field soil and enrichment cultures reveal the methanogenic phenotype of a novel archaeal lineage, *Environ. Microbiol.* **3**, 194-204.