

독립영양형 메탄생산세균의 농화 및 메탄생산 반응기의 개발

나병관 · 황태식 · 이성훈 · 주동훈¹ · 상병인¹ · 박두현*
서경대학교 이공대학 생물공학과, ¹한국과학기술원 유해물질연구센터

Development of Bioreactors for Enrichment of Chemolithotrophic Methanogen and Methane Production. Na, Byung Kwan, Tae Sik Hwang, Sung Hun Lee, Dong Hun Ju¹, Byung In Sang¹, and Doo Hyun Park*. Department of Biological Engineering, Seokyeong University, ¹Division of Water Environment and Remediation, KIST - A gas-circulating bioreactor was used for enrichment of autotrophic methanogens. Mixture of hydrogen and carbon dioxide (5:1) was used as a sole energy and carbon source. Anaerobic digestive sludge isolated from wastewater treatment system was inoculated into the gas-circulating bioreactor. The enrichment of two chemolithotrophic methanogens, *Methanobacterium curvum* and *Methanobacterium oryzae* was accomplished in the gas-circulating bioreactor. The enriched bacteria were cultivated in a bioreactor equipped with hollow-fiber hydrogen-supplying system (hollow-fiber bioreactor), and a hybrid-type bioreactor equipped with hollow-fiber hydrogen-supplying system and electrochemical redox control system. The methane productivity was maximally 30% (V/V) in the hollow-fiber bioreactors and 50% (V/V) in the hybrid-type bioreactor.

Key words: Chemolithotrophic methanogen, *Methanobacterium curvum*, *Methanobacterium oryzae*, hollow-fiber, electrochemical bioreactor

서 론

메탄생산세균은 아세트산을 기질로 이용하는 aceticlastic methanogen, 메틸화합물을 기질로 이용하는 methylotrophic methanogen, 수소와 이산화탄소를 기질로 이용하는 autotrophic methanogen으로 구분할 수 있으나, 16S-rDNA의 염기서열 비교에 의하면 모두 고세균에 속하는 원시형의 생리유전적 특성을 가지고 있다[5, 11, 14]. 특히, 수소와 이산화탄소를 기질로 이용하는 메탄생산세균은 포름산을 수소와 이산화탄소로 분해하여 이용하거나, 일산화탄소와 물을 각각 이산화탄소와 수소로 산화하고 환원하여 기질로 이용할 수 있기 때문에 종에 따라서 기질의 범위가 상대적으로 넓은 종류도 존재한다[6, 8]. 자연계 또는 오폐수 처리시설의 혐기소화조에 서식하는 메탄생산세균은 다양한 혐기성 세균군집(단일초산생산세균, 황산염환원세균, 질산염환원세균, 혐기성발효세균 군 등)과 공생 또는 공영양 관계를 유지하기 때문에 적당한 서식환경을 유지하는데 필요한 인자(기질, 성장인자, 산화-환원전위, 미량영양소 등)를 스스로 조성하거나 조절할 필요가 상대적으로 적다[15, 12]. 대부분의 혐기성 세균들은 공통적으로 산화성 환경에서 기능을 상실하는 효소를 가지고 있거나 산소와 조효소가 반응하여 생

성된 라디칼을 제거하는 기능이 없기 때문에 산소에 노출되면 생리적인 기능을 상실한다. 또한 산화-환원전위가 낮은 환경에서 작동하는 효소(coenzyme F420, -370 mV; tetrahydromethanopterin, -450 mV)를 가지고 있으나, 스스로 산화-환원전위를 낮게 유지하는데 필요한 환원력을 생산하기 어렵기 때문에 메탄생산세균의 경우에는 산화-환원전위가 -300 mV(vs. NHE) 이상의 환경에서는 서식하기 어렵다[7]. 이러한 이유 때문에 메탄생산세균 특히, 수소와 이산화탄소를 기질로 이용하는 독립영양형 메탄세균의 농화배양이나 순수배양이 용이하지 않다[2].

본 연구에서는 생물학적으로 이산화탄소를 고정하여 메탄으로 환원하기 위한 독립영양형 메탄생산세균을 농화하여 hollow-fiber 수소 공급 장치를 반응기에 도입하고 전기화학적으로 반응기의 산화-환원전위를 조절함으로써 연속적으로 메탄을 생산할 수 있는 방법을 개발하였다.

재료 및 방법

미생물

중량하수 종말처리장의 혐기소화조의 배출구로부터 배양액을 주사기를 이용하여 채취한 후, 즉시 1기압의 수소기체(99.99%)가 들어있는 혐기배양용기(165 mL 용량)에 주입하여 실험실로 운반하였다. 혐기배양용기는 상온에서 3시간 동안 정지하여 고형분을 가라앉힌 후 상등액을 주사기로 채취하여 농화배양기에 접종하였으며, 접종 비율은 10%(v/v)로

*Corresponding author

Tel: 82-2-940-7190 Fax: 82-2-919-0345

E-mail: baakdoo@skuniv.ac.kr

조정하였다.

배지

메탄생산세균은 25 mg/L (NH₄)₂SO₄, 10 mg/L CaCl₂·2H₂O, 10 mg/L MgCl₂·6H₂O, 200 mg/L NaCl, KH₂PO₄ 200 mg/L를 함유하는 배지를 이용하여 농화하고 배양하였다. 농화용 배지의 pH는 4.5, 메탄생산용 배지의 pH는 6.5로 조정하였다.

메탄생산세균 농화 배양

메탄생산세균은 그림 1과 같은 반응기를 사용하여 약 4주간 농화한 후 DNA 지문분석을 통하여 서식하는 종류를 확인하였다. 그림 1의 반응기에서 산소 제거장치(O₂-remover)는 코일형의 구리관(직경 15 mm, 길이 1000 mm)을 380°C로 가열하여 혼합가스가 통과할 때 혼합가스에 오염된 미량의 산소를 물로 환원하는 촉매로 배양액에 오염된 산소를 제거하는데 필수적인 구조이다. 반응기를 구성할 때 유리, 스테인레스 관 등은 산소의 투과성이 없기 때문에 문제가 되지 않지만, 기체 순환 펌프, 고무관, 연결관 등은 미량이지만 산소가 유입될 수 있는 물질로 구성되거나 물질이기 때문에 장시간 반응기를 운전할 경우 반응기 내부에 산소가 유입되어 산화-환원 전위를 상승하게 하는 원인이 된다. 따라서 오염된 산소를 수소와 반응하여 물로 전환하는 장치가 필수적이다. 이러한 장치는 화학 환원제(sulfide, Titanium nitriolotriacetate)의 사용을 배제한 반응기의 설계를 가능하게 하기 때문에 본 연구에 사용한 모든 반응기에 동일하게 장착하였다.

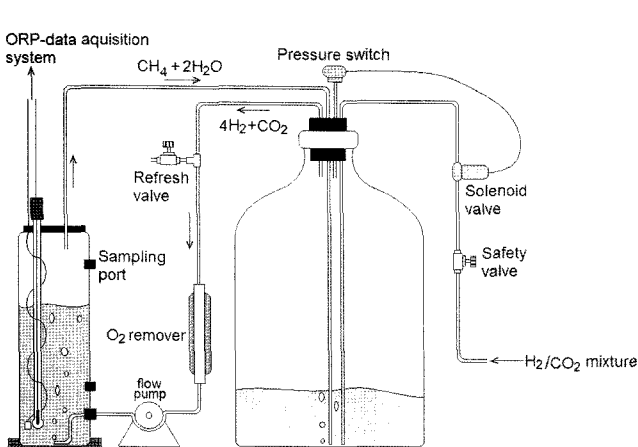


Fig. 1. Schematic structure of bioreactor for enrichment of chemolithotrophic methanogens. A reservoir functions as both gas supplier and pressure buffer. The reservoir's pressure was automatically controlled by a pressure switch and a solenoid valve. Micro oxygen contaminated in hydrogen and carbon dioxide or diffused from outside was continuously removed by O₂ remover (gas purification oven).

메탄 생산 반응기

메탄생산세균의 농화 과정에서 수소와 이산화탄소의 혼합가스를 배양액에 직접 분사하기 때문에 생산되는 메탄을 수소와 이산화탄소로부터 분리하여 포집하는 것이 불가능하다. 이산화탄소를 메탄으로 전환하기 위한 공정에서 기질로 사용한 가스로부터 메탄을 분리하여 포집하기 위해서는 새로운 장치의 적용이 필요하다. 그림 2에서 보는 바와 같이 수소는 hollow-fiber cartridge(높이 150 mm, 직경 60 mm, fiber 총 연장 50 m)를 통하여 공급하고 이산화탄소로 포화된 배지를 사용함으로써 수소와 이산화탄소의 혼합가스를 사용하지 않고 수소와 이산화탄소가 배양액으로부터 유출될 수 있는 가능성을 최소화하였다. 반응기에 사용한 hollow fiber는 기체분리용으로 분리계수(산소/질소 투과속도비는 3.5 이고, 투과계수는 50 GPU(cm³/cm² × cmHg × sec × 1,000,000)이다.

복합형 메탄 생산 반응기

그림 2의 반응기는 메탄을 수소, 이산화탄소와 분리하는데 유용하지만, 수소가 hollow-fiber의 내부에 격리되어 있고 배양액과 혼합되지 않아 배양액의 환원성 환경을 유지하기 어렵다. 그림 3은 hollow-fiber의 외부에 원통형의 carbon 전극(높이 180 mm, 직경 90 mm, 두께 5 mm)을 배치하여 전기화학적으로 환원 반응을 유도함으로써 배양액의 산화-환원 전위를 일정하게 유지하기 위하여 설계된 hybrid type의 반응기 구조이다. 음극과 양극간의 전류밀도는 20 mA를 유지하였으며, 정격 전류를 유지하는 동안 전압은 3.0~4.0 volt에서 자동으로 상승-하강하였다. 음극에서 일어나는 전기화

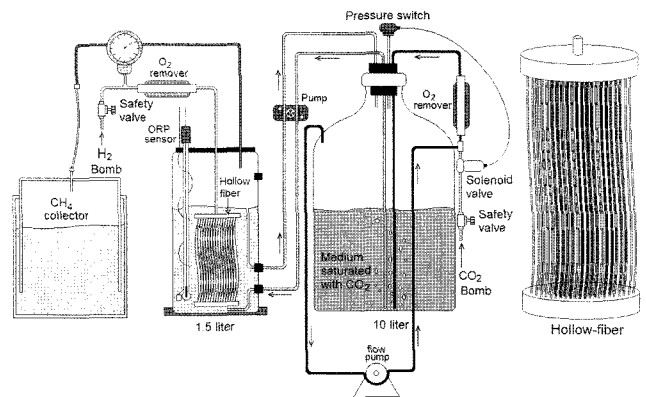


Fig. 2. Schematic structure of bioreactor equipped with hollow-fiber for separation of methane from H₂-CO₂ mixture. Medium saturated with carbon dioxide was cycled through reservoir and bioreactor at the speed of 500 ml/hr. Hydrogen is supplied through hollow-fiber at pressure of 0.22 kgf/cm² but not bubbled. The pressure of reservoir was automatically controlled by pressure switch and solenoid valve. Micro oxygen contaminated in hydrogen and carbon dioxide or diffused from outside was continuously removed by O₂ remover (gas purification oven).

학 반응과 음극의 표면에서 발생하는 미량의 수소(약 16.4 mL/hr)는 배양액에 혼합되어 배양액의 산화-환원 전위를 낮게 유지하고 미생물의 기질로 이용될 수 있기 때문에 메탄 생산성을 향상하는데 유용하다. 양극조에는 백금 전극을 장착하고 200 mM 인산염 완충용액(pH 8.0)을 전해액으로 사용하였다.

Total genomic DNA 추출

메탄생산세균 농화 반응조로부터 배양액 1.5 mL을 채취하여 2 mL tube에 넣고 12,000 × g에서 1분 동안 원심분리한 후 균체를 수확하고 DNeasy Tissue Kit(QIAGEN)을 이용하여 total genomic DNA를 추출하였다. 추출한 DNA는 16S rDNA PCR의 template로 사용하였다. Archeal 16S rDNA primer는 A571F(GCY TAA AGS RIC CGT AGC)와 1204R(TTM GGG GCA TRC IKA CCT)를 사용하였고 PCR mixture는 dH₂O 77.5 μL, 10×buffer(contains 25 mM MgCl₂) 10 μL, 2.5 mM dNTP 8 μL, forward primer (100 pmol/μL) 0.5 μL, reverse primer(100 pmol/μL) 0.5 μL, Ex Taq DNA polymerase(Takara) 2.5U, 그리고 DNA template 3 μL를 섞어 총 100 μL로 만들어 사용하였다. PCR 반응은 Lueders and Friedrich(2003)[10]의 방법에 따라 수행하였다. PCR product는 QIA Quick Gel Extraction Kit(QIAGEN)로 정제해서 RBC T&A Cloning Kit(RBC) plasmid DNA와 적량 혼합하여 16에서 5시간 동안 ligation 반응한 다음 HIT-DH5α competent cell에 transformation 하였고, Ampicillin (50 μg/ml), 20 μL X-Gal(50 mg/ml), 50 μL IPTG(100mM)를 포함하는 LB agar plate에 spreading하여 37°C에서 16시간 동안 배양하였다. 이 plate에서 transformant로 판단되는 white colony 120개를 picking하여 3 mL LB amp(50 μg/mL) broth를 이용하여 37°C에서 180 rpm으로 20시간 동안 shaking incubation하였다. 배양액을 원심분리하여 균체를 회수한 다음 Nucleogen Plasmid Purification Kit(Nucleogen)을 이용해 plasmid를 추출하였으며 plasmid의 sequencing은 전문기관에 의뢰하여 분석하였다.

분석

메탄, 수소, 이산화탄소는 Acme 6000E GC system(영린 기기, 한국)을 이용하여 분석 하였으며, 표준가스를 이용하여 농도를 결정하였다. Carrier gas는 99.99%(V/V) He를 사용하였으며, 45/60 Carboxen-1000 packed column을 사용하여 시료를 분리하였다. 시료는 전처리 하지 않고 gas tight syringe를 사용하여 직접 주입하였으며 칼럼온도의 온도는 초기 5분간 35°C를 유지하고 컬럼을 세척하기 위하여 매분 25°C씩 상승하여 225°C에서 종결하였으며 열전도도 검출기(TCD)의 온도는 50°C로 조정하였다.

저급지방산은 HPX-87H(BioRad) 유기산 분석 컬럼과 굴절률 검출기를 장착한 HPLC(영린)를 이용하여 분석하였다.

이동상으로 0.008N 황산을 사용하였으며, 유속은 분 당 0.6 mL로, 컬럼과 검출기의 온도는 각각 35°C로 조절하였다.

결과 및 고찰

독립영양형의 메탄생산 세균을 농화하기 위하여 약 30일간 수소:이산화탄소(5:1) 혼합가스를 순환 공급하면서 중량하수 종말처리장 혐기소화조의 배양액을 약 10% (V/V) 점중한 후 생산되는 메탄의 양을 분석하여 수소와 이산화탄소의 양과 비교하였다. 반응기의 용량은 1.5리터로, reservoir 내의 배양액의 용량은 10리터로 조정하였다. 이 실험에서는 메탄의 생산 보다 메탄 세균의 농화를 목적으로 하였기 때문에 생산되는 메탄의 양은 메탄 생산세균이 증식하고 있다는 단서로 활용하였다. 그림 4에서 보는 바와 같이 약 30일간 농화 과정에서 메탄생산량은 배양시간에 비례하여 증가하는 것으로 확인되었으며, 비교적 안정하게 생산성이 증가하는 것으로 나타났다. 산화-환원전위는 전반적으로 -400 mV 이하로 메탄 생산세균의 생장에 적합한 상태를 유지하였는데 이는 배양액에 수소를 직접 분사함으로써 배양액의 산화-환원전위가 낮게 유지되었을 것으로 생각된다. 전체적으로 메탄이 10% (V/V) 미만으로 검출되었는데, 90%(V/V) 이상은 수소-이산화탄소의 혼합가스로 확인되었다. 또한 메탄 생산세균과 서식조건이 유사한 homoacetogen과 혐기성 발효세균이 생장여부를 확인하기 위하여 배양액을 HPLC로 분석한 결과 초산, 프로피온산, 부티르산, 에탄올 등의 예상되는 발효대사산물이 검출되지 않았다. 수소와 이산화탄소를 유일 에너지원과 유일 탄소원으로 사용하여 배양한 것을 감안하면, 이러한 결과는 독립영양형 메탄세균이 충분히 농화되었다는 것을 보여주는 단서이다. 그러나 반응기에서 서식하고 있는 세균은 형태학적, 생리학적으로 메탄생산세균이라는 사실을 확인하기 어렵기 때문에 반응기에서 서식하는 세균의 16S-rDNA를 분석하였다. Archeal 16S rDNA의 PCR 결과 얻어진 DNA를 클론하여 얻은 120개의 형질전환체에서 추출한 plasmid 가운데 108개에서 archeal 16S-rDNA가 확인되었다. 이들을 sequencing한 결과 105 clones이 *Methanobacterium oryzae*였고, 2 clones이 *Methanobacterium curvum*, 1 clone이 uncultured Archaea였다. 이러한 결과는 반응기에 서식하는 미생물의 대부분이 *Methanobacterium oryzae*이고 극히 일부는 *Methanobacterium curvum*이라는 것을 보여주는 것이다. *Methanobacterium oryzae*와 *Methanobacterium curvum*은 hydrogenotrophic methanogen이다. 이러한 농화배양의 결과를 근거로 hollow-fiber를 반응기에 장착하여 수소를 이산화탄소와 다른 경로로 공급 함으로서 메탄을 이산화탄소, 수소와 혼합되지 않게 별도로 분취할 수 있었다[9]. 농화 배양용 반응기와 동일한 반응기에 hollow-fiber를 장착(그림 2) 또는 hollow-fiber와 전극을 장착(그림 3)하고 hollow fiber의 내부의 수소압력을 일정하게 유지하

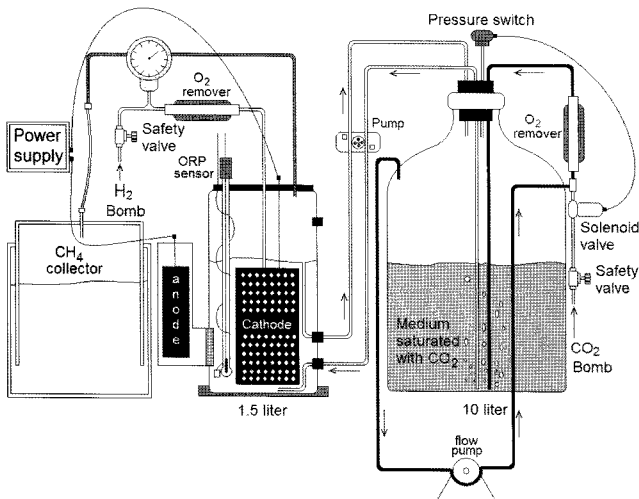


Fig. 3. Schematic structure of hybrid-type bioreactor equipped with hollow-fiber and carbon electrode for control of redox potential in bioreactor. Medium saturated with carbon dioxide was cycled through reservoir and bioreactor at the speed of 500 ml/hr. Hydrogen is supplied through hollow-fiber at pressure of 0.22 kgf/cm² but not bubbled. The carbon dioxide was automatically refilled by gas pressure switch and solenoid valve. Micro oxygen contaminated in hydrogen and carbon dioxide gas or diffused from outside is continuously removed by O₂ remover (gas purification oven). Round type carbon electrode was disposed around the hollow-fiber, to which constant 20 mA electricity was charged to maintain reduction environment of medium.

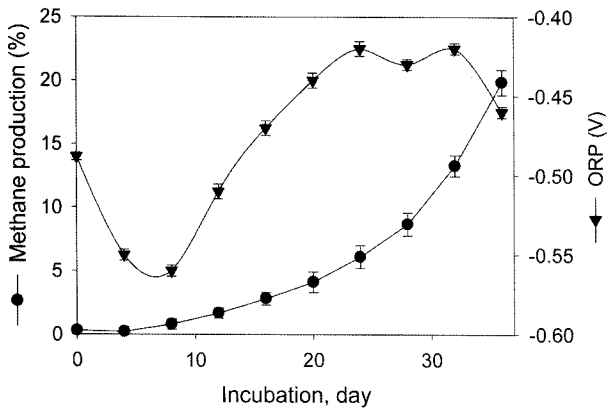


Fig. 4. Enrichment of autotrophic methanogens with hydrogen and carbon dioxide as energy and carbon source. The methane production was progressively cumulated in proportion to the incubation time. Four black symbols indicate methane concentration produced from four different bioreactors.

면서 배지의 산화-환원 전위가 안정화 될 때까지 운전하다가 50%(v/v)의 농화배양액을 혐기적으로 접종하고 2일간 배양한 후 제 3일차를 반응개시 시간(0시간)으로 하여 시료를 채취하기 시작하였다. 그림 2와 3의 반응기에는 일정한 압력을 유지하기 위해 gas gauge와 정밀 valve 등을 추가로 장착하고 check valve를 이용하여 hollow-fiber와 반응기 내부

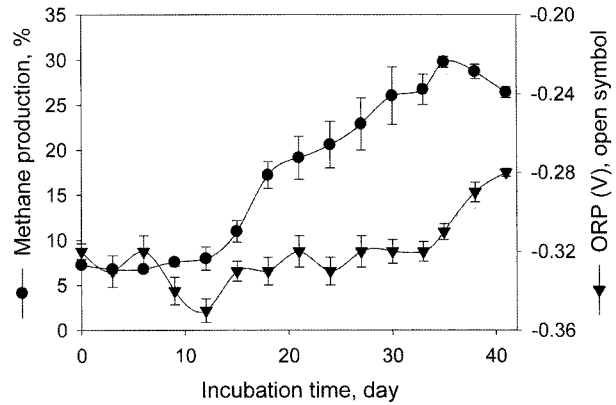


Fig. 5. Methane production from hydrogen and carbon dioxide as energy and carbon source in bioreactor equipped with hollow-fiber. Three black symbols indicate methane concentration produced from three different bioreactors. Medium saturated with carbon dioxide was cycled through reservoir and bioreactor at the speed of 500 ml/hr. Hydrogen is supplied through hollow-fiber at pressure of 0.22 kgf/cm² but not bubbled. The electricity charged to electrode was adjusted to 20 mA.

의 압력이 일정한 평형을 이루도록 하였다. 그림 5에서 보는 바와 같이 3개의 반응기로부터 채취한 시료의 분석결과를 평균하였을 때 메탄 생산량은 약 30일 경과 후에는 비교적 반응기 간의 오차가 크게 감소하는 경향을 보였다. 이러한 특징은 hollow fiber의 표면에 고정되거나 부유하며 성장하는 메탄생산세균의 생물량이 증가하면서 반응기에 따라 서식환경이 달라졌기 때문으로 생각된다. 또한 hollow fiber를 통한 수소의 누출 가능성에 대한 검토가 필요하며, 배지 순환 탱크내에서 이산화탄소를 포화상태로 함유한 배양액이 반응기내부로 유입되면서 반응기 내부와 탱크의 온도차이에 의해서 이산화탄소가 기화되어 메탄가스와 혼합되었을 가능성 등도 배제할 수 없다. 기체 산물의 조성은 메탄을 제외한 나머지는 이산화탄소가 약 45~50%(V/V), 수소가 약 30~35%(V/V)였다. 배양액의 산화-환원 전위는 약 -300~-350 mV로 농화 배양액의 산화-환원 전위 보다 다소 높게 나타났다. 이것은 배양액에 수소를 분사하는 것이 hollow fiber를 통해 공급하는 것보다 배양액의 산화-환원전위를 안정하게 유지하는데 유리하다는 것을 보여주는 것이다. 그러나 수소를 이용하여 배양액의 산화-환원 전위를 400 mV 이하로 유지하는 것은 고농도의 메탄을 생산하기 위한 목적에 위배되기 때문에 그림 3과 같이 복합형의 반응기를 사용하였다. 이러한 반응기는 전극과 hollow-fiber가 미생물의 생물막 형성을 위한 매개체로 작용할 수 있기 때문에 미생물의 활성화와 메탄의 생산성을 개선할 수 있는 효율적인 구조로 생각되지만, 실제로 그림 6에서 보는 바와 같이 메탄 생산성은 최고 50%(V/V)를 초과하지 못하였다. 이러한 현상은 전술한 바와 같이 배지 순환 탱크에서 이산화탄소가 포화된 배양액이 반응기에 유입되면서 온도차이에 의해 기화되기 때

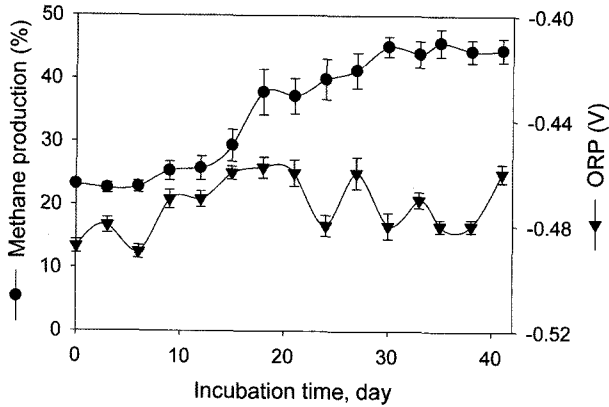


Fig. 6. Methane production from hydrogen and carbon dioxide as energy and carbon source in hybrid-type bioreactor equipped with hollow-fiber and carbon electrode. Three black symbols indicate methane concentration produced from three different bioreactors. Medium saturated with carbon dioxide was cycled through reservoir and bioreactor at the speed of 500 ml/hr. Hydrogen is supplied through hollow-fiber at pressure of 0.22 kgf/cm² but not bubbled. The electricity charged to electrode was adjusted to 20 mA.

문으로 생각된다. 가스분석 결과에 따르면 메탄 이외의 기체 산물은 이산화탄소가 약 35%(V/V), 수소가 약 15%(V/V)였다. 이것은 전극에서 생산된 수소의 일부가 기체 산물에 혼입되었기 때문으로 생각된다. 그러나 전반적으로 hollow-fiber 만을 사용한 반응기에서 생산된 메탄가스보다 농도가 증가한 것은 전기화학적으로 ORP가 안정하게 유지되어 메탄세균의 활성이 높게 유지되었고 전극의 표면에서 생성되는 미량의 수소가 메탄세균의 에너지원으로 이용되었기 때문으로 생각된다. 따라서 메탄의 생산성을 개선하기 위해서는 hollow fiber의 기능 개선, 배지의 순환속도, 전극에 공급하는 전류밀도 및 배지순환탱크의 온도 등을 조절할 필요가 있는 것으로 생각된다.

본 연구는 메탄 세균을 농화하기 위한 반응기와 고농도 메탄을 생산하기 위한 반응기를 개발하기 위한 과정으로 분리하여 수행되었다. 독립영양형 메탄생산세균은 유기물을 생합성에 이용할 수 있는 대사경로가 없고 물질대사 과정에서 생산한 비교적 적은 양의 환원력과 자유에너지를 모두 생합성에 소비하기 때문에 주변의 산화-환원전위가 상승하면 자유에너지를 maintenance 에너지로 소비하여 생장이 저해되고 장시간 이러한 환경에 노출되면 생존력을 상실할 수 있다[13]. 따라서 농화 과정에서 과량의 수소를 반응기에 공급하여 환원성 환경을 유지하는 것이 중요하다. 배양배지의 조성 가운데 유기물을 완전히 배제하고 이산화탄소와 수소만 탄소원과 에너지원으로 공급한다면 메탄세균이나 homoacetogen 이외에는 생존하기 어렵다[1, 3, 4]. 자연계에서는 유기물을 기질로 이용하여 환경을 환원성으로 전환하거나 혐기적인 조건으로 전환할 수 있는 다른 종류의 미생물(황산염환원세

균, 질산염환원세균, 혐기발효세균 등)과 공영양관계를 유지하기 때문에 메탄생산세균 스스로 산화-환원전위를 유지하기 위해 에너지를 소비할 필요가 없지만, 메탄생산세균의 배양용 반응기의 환경을 자연계와 유사하게 유지하기 위해서는 메탄생산세균이 선택적으로 성장할 수 있는 환경을 인위적으로 조성하는 것이 필요하다. 즉, 자연계에서 메탄세균과 공생하는 다른 종류의 세균에 의해 조성될 수 있는 환경조건을 반응기에 부여하기 위해서는 대기 중의 산소가 반응기에 유입되는 것을 차단하고, 반응기의 특성상 유입될 수 밖에 없는 미량의 산소도 특별한 장치를 사용하여 제거하는 것이 중요하다. 본 연구 과정에서 환원성 환경을 유지하는 반응기를 설치하기 위하여 가능한 모든 부품을 유리와 금속 재료로 제작하였고 부득이 합성수지를 사용할 경우 산소의 투과성이 낮은 재료를 사용하였으며 산소를 제거할 수 있는 장치를 설치하여 반응기내부의 환경을 완전한 혐기성 및 환원성을 유지할 수 있게 하였다. 수소는 물에 녹지 않는 기체라고 할 수 있을 만큼 용해도(2%/volume at 0°C)가 낮고, 반대로 이산화탄소는 물에 대한 용해도(171%/volume at 0°C)가 매우 높아 반응기의 상부에서 기체를 주입하면 배양액 속에는 이산화탄소만 존재하고 수소가 결핍되기 때문에 메탄생산세균이 생장하기 어렵다. 이를 극복하기 위해 고압의 반응기를 사용한다면, 반응기의 운전이 까다롭고 연구목적 이외의 위험인자가 발생할 수 있다. 따라서 가장 바람직한 반응기의 구성은 이산화탄소는 배양액에 용해하여 순환 과정을 통하여 공급하고 수소는 hollow-fiber, dialysis bag, micro-pored membrane 등의 특수 소재를 사용하여 기체상태로 일정한 압력을 유지하면서 배양액의 하부에서 미생물이 직접 공급받을 수 있게 제공하는 것이다. 또한 전기화학적 방법을 적용하여 반응기 내부의 산화-환원 전위를 메탄생산 세균이 생장할 수 있는 최적의 조건을 유지하는 것이 필요하다.

요 약

수소-이산화탄소(5:1) 혼합가스 순환장치를 장착한 반응기를 이용하여 독립영양형 메탄생산세균을 농화하였으며, 생산된 메탄의 농도는 10% 미만이었다. 30일 이상 농화배양한 후 16S-rDNA 동질성을 이용하여 반응기에서 성장하고 있는 세균을 분석한 결과 수소를 단일 에너지 원으로 이용하는 *Methanobacterium curvum*와 *Methanobacterium oryzae*로 확인되었다. 농화된 세균을 hollow-fiber 수소 공급장치를 장착한 반응기에 배양하여 메탄의 농도를 30%까지 향상하였다. 그러나 농화된 세균을 hollow-fiber 수소 공급장치와 미량의 수소를 생산하고 전기화학적 환원성 환경을 유도할 수 있는 장치를 장착한 복합형 반응기에 적용한 결과 메탄의 생산성은 50%까지 향상하였다. 이러한 결과는 독립영양형 메탄생산세균을 농화 또는 대량 배양하기 위해서 hollow-

fiber 수소 공급장치와 전기화학적 환원력을 복합적으로 이용하는 것이 유리하다는 것을 보여주는 것이다.

REFERENCES

1. Breznak, J.A., and J.M. Switzer. 1986. Acetate synthesis from H₂ plus CO₂ by termite gut microbes. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 623-630.
2. Chin, K.J., and P.H. Janssen. 2002. Propionate formation by *Optutus terrae* in pure culture and in mixed culture with a hydrogenotrophic methanogen and implications for carbon fluxes in anoxic rice paddy soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 2089-2092.
3. Cord-Ruwisch, R., H. Seitz, and R. Conrad. 1988. The capacity of hydrogenotrophic anaerobic bacteria to compete for traces of hydrogen depends on the redox potential of the terminal electron acceptor. *Arch. Microbiol.* **149**: 350-357.
4. Daniel, S.L., T. Hsu, S.I. Dean, and H.L. Drake. 1990. Characterization of the H₂- and CO-dependent chemolithotrophic potentials of the acetogens *Clostridium thermoaceticum* and *Acetogenium kivui*. *J. Bacteriol.* **172**: 4464-4471.
5. Dhillon, A., M. Lever, K.G. Lloyd, D.B. Albert, M.L. Sogin, and A. Teske. 2005. Methanogen diversity evidenced by molecular characterization of methyl coenzyme M reductase A (*mcrA*) genes in hydrothermal sediments of the Suaymas Basin. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 4592-4601.
6. Ferguson, T.J., and R.A. Mah. 1983. Isolation and characterization of an H₂-oxidizing thermophilic methanogen. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**: 265-274.
7. Gottschalk, G. 1985. Bacterial Metabolism, second edition, pp 252-260. Springer-Verlag, New York.
8. Harris, J.E., P.A. Pinn, and R.P. Davis. 1984. Isolation and characterization of a novel thermophilic, freshwater methanogen. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 1123-1128.
9. Inloes, D.S., D.P. Taylor, S.N. Cohen, A.S. Michaels, and C.R. Robertson. 1983. Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* immobilized in hollow-fiber membrane bioreactor. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**: 264-278.
10. Lueders, T., and M.W. Friedrich. 2003. Evaluation of PCR amplification bias by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of small-subunit rRNA and *mcrA* genes by using defined template mixtures of methanogenic pure cultures and soil DNA extracts. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 320-326.
11. Oremland, R.S., R.P. Kiene, I. Mathrani, M.J. Whitica, and D.R. Boone. 1989. Description of an estuarine methylotrophic methanogen which grows on dimethyl sulfide. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 994-1002.
12. Robinson, J.A., and J.M. Tiedje. 1982. Kinetics of hydrogen consumption by rumen fluid, anaerobic digester sludge, and sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: 1374-1384.
13. Thauer, R.K., K. Jungermann, and K. Decker. 1977. Energy conservation in chemolithotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol. Rev.* **41**: 100-180.
14. Westermann, P, B.K. Ahring, and Mah, R.A. 1989. Threshold acetate concentrations for acetate catabolism by aceticlastic methanogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 514-515.
15. Zinder, S.H., S.C. Cardwell, T. Anguish, M. Lee, and M. Koch. Methanogenesis in a thermophilic (58°C) anaerobic digester: *Methanotherx* sp. an important aceticlastic methanogen. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 796-807.

(Received Jan. 1, 2007/Accepted Mar. 3, 2007)