

미생물 연료전지에서 Fe(III) 환원 미생물 *Geobacter sulfurreducens*를 이용한 전기 생산

이유진^{*,**}, 오유관^{*}, 김미선[†]

*한국에너지기술연구원 바이오에너지연구센터, **충남대학교 생명과학과

Electricity Production from Fe(III)-reducing Bacterium *Geobacter sulfurreducens* in Microbial Fuel Cell

YUJIN LEE^{*,**}, YOUKWAN OH^{*}, MISUN KIM[†]

*Bioenergy Research Center, Korea Institute of Energy Research,
71-2 Jang-dong Yuseong-gu Daejeon 305-343, Korea

**Department of Microbiology, Chungnam National Univ.,
220 Gung-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-764, Korea

ABSTRACT

Metal-reducing bacterium, *Geobacter sulfurreducens* is available for mediator-less microbial fuel cell (MFC) because it has biological nanowires(pili) which transfer electrons to outside the cell. In this study, in the anode chamber of the MFC system using *G. sulfurreducens*, the concentrations of NaCl, sodium phosphate and sodium bicarbonate as electrolytes were mainly optimized for the generation of electricity from acetate. 0.4%(w/v) NaClO and 0.5 M H₂SO₄ could be utilized for the sterilization of acrylic plates and proton exchange membrane (major construction materials of the MFC reactor), respectively. When NaCl concentration in anode phosphate buffer increased from 5 to 50 mM, power density increased from 6 to 20 mW/m². However, with increasing sodium phosphate buffer concentration from 5 to 50 mM, power density significantly decreased from 18 to 1 mW/m². Twenty-four mM sodium bicarbonate did not affect electricity generation as well as pH under 50 mM phosphate buffer condition. Optimized anode chamber of MFC using *G. sulfurreducens* generated relatively high power density (20 mW/m²) with the maximum coulombic efficiency (41.3%).

KEY WORDS : *Geobacter sulfurreducens*(철 환원 세균), Mediator-less microbial fuel cell(무매개체 미생물 연료전지), Electrolyte(전해질), pH control (pH 조절), Power density (전력 밀도)

1. 서 론

미생물 연료전지(microbial fuel cell, MFC)는 전기적 활성이 있는 미생물에 의해 유기물을 분해하여 전기에너지를 만드는 기술이다. 이 기술은 사

[†]Corresponding author : bmmkim@kier.re.kr

회적으로 문제가 되고 있는 유기성 폐수 및 폐기물 등을 환경 친화적으로 처리할 뿐만 아니라 동시에 전기를 생산하는 신재생 에너지기술이며 최근에는 MFC를 이용한 수소생산연구가 활발히 진행되고 있다²⁾.

MFC는 음극(anode)과 양극(cathode)으로 이뤄져 있고 저항을 이용한 외부 회로로 연결된다. 음극부와 양극부는 수소이온 교환막(Proton exchange membrane, PEM)과 같은 분리막으로 분리된다. 미생물과 유기물이 음극부에 주입되면 전자와 수소 이온이 생성된다. 생성된 전자와 수소 이온은 각각 외부 회로 및 분리막을 통해 양극으로 전달되며, 외부에서 공급 되는 전자 수용체인 O₂에 의해 물로 전환된다.

MFC는 매개체 필요 유무, 반응기 형태, 생산물, 사용 미생물 등 여러 기준에 따라 분류될 수 있다. *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* 등은 전자전달시 외부 매개체가 필요한 미생물로 이들에 의해 생성된 전자는 anthraquinone 2-6, disulfonate (AQDS), thionin, potassium ferricyanide, methyl viologen 등에 의해서 전극에 전달된다. 하지만 이런 인공 전자 매개체는 일반적으로 미생물에게 독성이 있으며 또한 가격도 비싼 단점이 있다³⁾. 반면 *Shewanella oneidensis*, *Geobacter sulfurreducens*, *Rhodospirillum rubrum* 등은 세포내 생성된 전자를 매개체 없이 직접 전극으로 전달할 수 있는 무매개체 전기적 활성 미생물이다. 이 경우 매개체가 필요한 경우에 비해 추가적인 매개체의 공급 없이 연속적인 운전이 가능하고, coulombic efficiency도 높은 것으로 알려져 있다³⁾.

MFC의 성능(전기 생산 효율, 안정성 등)은 반응기 재질/형태, 전극 재질, 전극 모양, 전극간 거리, 멤브레인 종류/크기, 산소 공급 등에 따라 크게 달라진다. 양극에 산소 공급방법에 따라 single chamber(air cathode), two chamber(dissolved air cathode) 시스템으로 나눌 수 있으며, 산소 대신 포텐셜을 가하는 경우 (poised potential reactor)도 있다. 재질은 acrylic, lexan, 유리, 스테인리스스틸

등이 사용되고 있다. 반응기 형태는 cube, tube, stack 등이 있다.

본 실험에서는 two chamber의 아크릴 반응기가 사용되었고, 사용한 균주는 다양한 퇴적환경에서 Fe(III) oxide와 같은 물에 녹지 않는 전자 수용체에 전자를 전달하는 *G. sulfurreducens*이다⁴⁾. 최근 *G. sulfurreducens*의 pili는 생물학적 nanowire의 역할을 하여, 세포 표면에서 전자 수용체(전극)로의 전자 전달 과정에 중요한 역할을 한다고 알려졌다^{5,6)}. 이러한 *G. sulfurreducens*를 이용한 MFC가 장기간 효율적으로 운전되기 위해서는 미생물의 적절한 성장환경이 중요하다. 본 연구에서는 미생물 성장과 궁극적으로 미생물 연료전지의 전기 생산에 큰 영향을 주는 음극부의 환경 조절 인자에 대해 연구하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 배지와 성장 조건

G. sulfurreducens ATCC 51573TM 은 30°C, N₂/CO₂(80:20) 혼합가스의 혐기 조건에서 배양하였다. 배지(1 L) 조성⁷⁾은 KCl 0.1 g, NH₄Cl 1.5 g, NaH₂PO₄ 0.6 g, NaHCO₃ 2.5 g, Wolfe's Mineral solution 10 mL, Wolfe's Vitamin solution 10 mL이며, 고압 증기 멸균(15분) 후 N₂/CO₂(80:20) 혼합가스로 치환하여 보관하였다. 탄소원/전자 공여체와 전자수용체로 각각 20 mM acetate 및 50 mM의 fumarate를 사용하였다. *G. sulfurreducens*에 의해 acetate가 소모됨에 따라 배양액은 노란색에서 주황색으로 바뀌었다.

72시간씩 두 번의 계대 배양 후 활성화된 *G. sulfurreducens*는 MFC의 음극부에 접종되기 전 acetate와 fumarate가 없는 MFC 음극부 배지를 이용하여 원심분리한 후 Abs_{600nm}에서 OD 0.1이 되게 음극부에 주입되었다. MFC 음극부 배지(1 L)⁷⁾는 KCl 0.1 g, NH₄Cl 0.2 g, NaCl 2.9 g, NaH₂PO₄ 0.6 g, NaHCO₃ 2 g, Wolfe's Mineral solution 10 mL, Wolfe's Vitamin solution 10 mL 이었다. 탄소원/전자공여체로 20 mM acetate를 사

용하였고, 전자수용체로 fumarate 대신 전극(carbon paper)이 사용되었다. 양극부 배지(1 L) 조성⁷⁾은 KCl 0.1 g, NaH₂PO₄ 0.6 g, NaCl 2.9 g, Tris-HCl 4.78 g이었다. 음극부 및 양극부 배지 모두 MFC 공급 전에 pH 6.8로 조정하였으며, 0.2 μm 필터 여과멸균 후 N₂/CO₂(80:20) 혼합가스로 치환하여 보관하였다.

2.2 MFC 반응기

아크릴 반응기는 6.5 cm×8 cm×1 cm(가로×세로×두께)의 외부 아크릴판 2개와 그 사이에 5 cm×6 cm×1 cm(가로×세로×두께)의 4개의 내부 아크릴판으로 이뤄져 있다. 6개의 아크릴판에 의해 형성되는 반응기의 총 부피는 50 mL이었다.

내부 아크릴판의 상부에는 6개의 입구(직경 0.5 cm)가 설치되었으며, 이들 입구에 실리콘 마개를 끼워 가스라인, 전극 고정, 미생물 주입, 시료 채취 용도로 사용하였다. 각 아크릴판과 PEM사이에는 viton gasket을 끼우고 외부 아크릴의 모서리에 너트와 볼트를 끼워 고정하였다.

아크릴판은 0.4%(w/v) NaClO에 담근 후 멸균한 증류수에 24시간 이상 헹군 뒤 사용하였고, gasket, 테프론 가스라인은 70% 에탄올로 멸균하였다.

PEM으로는 Nafion 117 (DuPont Co., USA)을 사용했고 3 cm×4 cm(가로×세로) 크기로 잘라 0.5 M H₂SO₄에 30분 전처리 후, 멸균한 70~80°C 증류수에 24시간 이상 헹구 사용하였다.

반응기는 PEM에 의해 각각 25 mL의 음극부와 양극부로 분리되었다. 양극부에는 전자수용체로 7~8 ml/min공기를 공급하였고, 음극부에는 혐기분위기 조성, 용액 혼합, 양극부에 공급된 산소의 음극부 확산 방지를 위해 7~8 ml/min Ar 가스를 공급하였다. 이때 공기와 Air 가스는 필터 멸균하였다.

PEM을 중심으로 가장 안쪽의 두 아크릴판을 통해 전극을 고정하여 전극간 거리를 1.5 cm로 유지 하였다. 음극과 양극은 2.5 cm×3.7 cm (가로

×세로)의 carbon paper(without wet proofing; TGPB-090, E-Tek, USA)에 5 cm의 백금 선을 silver paste (Dotite, Fujikura Kansei Co., Japan)와 epoxy (Devcon, ITW Performance Polymers Co., USA)를 이용하여 부착하였고, 자연 건조 후 1 N HCl 및 1 N NaOH에 차례로 30 분간 처리하였다. 이후 멸균 증류수에 헹구 사용하였다. 백금선이 부착된 전극 자체의 저항 값은 0.4-0.7 Ω로 측정되었다.

2.3 전압, 전류, 전력 측정

음극과 양극의 전압 차는 멀티미터 (DMM PC 20, Sanwa, Japan)로 측정하였고, 옴 법칙을 이용해 전류와 전력으로 환산하였다.

$$V[V] = I[A]R[\Omega] \quad (1)$$

$$P[W] = I[A]V[V] = \frac{(V[V])^2}{R[\Omega]} = (I[A])^2R[\Omega]$$

혐기상태의 음극부에 *G. sulfurreducens*와 acetate를 주입 하고 저항을 연결 하지 않은 상태에서 측정된 전압(Open circuit voltage, OCV)은 0.5-0.6 V이며, 이 후 사용된 저항은 500 Ω이었다.

3. 결과 및 고찰

3.1 NaClO와 H₂SO₄를 이용한 반응기 멸균의 영향

단일 미생물을 이용한 MFC 실험에서 멸균은 매우 중요한 인자이다. 일반적으로 미생물의 순수 배양 시 고압/고온 또는 에탄올 멸균법을 사용한다. 그러나 본 연구에서는 사용한 MFC 반응기는 다양한 재질의 실험 재료 (아크릴, viton, PEM, 테프론, 실리콘)로 구성되었으므로, 각 재질별로 멸균 방법을 달리하였다 (자세한 내용은 2.2 MFC 반응기 참조). 특히 아크릴은 재질 특성상 고온 및 에탄올 멸균법을 사용할 수가 없었다. 많은 연구자들도 본 연구에서 사용된 아크릴 재질의 반응기를 사용하였지만 구체적인 멸균방법은 보고되지 않았

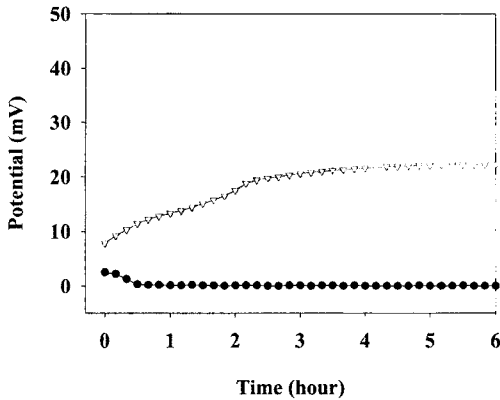


Fig. 1 Effect of NaClO sterilization on potential generation. MFC reactors were operated with (∇) and without (●) DDW washing for 24 hr after NaClO sterilization of acrylic components. Temperature and resistance were 30°C and 500Ω, respectively

다¹¹⁾.

Fig. 1은 0.4%(w/v) NaClO를 사용하여 아크릴 부품을 멸균한 결과를 나타내고 있다. NaClO로 처리 후 바로 MFC 실험에 적용한 경우 초기 2.5 mV의 전압 (*G. sulfurreducens*의 전기 생산 활성)이 관찰되었지만 이후 감소하여 더 이상 관찰되지 않았다. 반면 멸균한 증류수로 24시간 이상 충분히 세척 후 사용하였을 때 전압은 시간에 따라 증가하는 경향을 보였다. 이는 NaClO이 *G. sulfurreducens*에도 강력한 살균력을 나타내므로 실험에 사용하기 전 충분한 세척이 필요함을 나타낸다.

Fig. 2는 0.5 M의 H₂SO₄을 사용하여 PEM을 전처리/멸균 후 사용한 MFC 실험결과를 나타내고 있다. H₂SO₄ 처리 후 멸균수 세척 없이 바로 실험에 사용한 경우 음극부 배지의 pH가 6.8에서 5.6으로 급격히 감소하였고, 전압도 충분히 멸균수에 세척한 경우보다 낮은 값을 나타내었다. 이는 PEM의 H₂SO₄ 처리 시 PEM에 남은 H₂SO₄이 미생물의 전기 생산 활성에 영향을 미친다는 것을 나타낸다.

3.2 NaCl의 영향

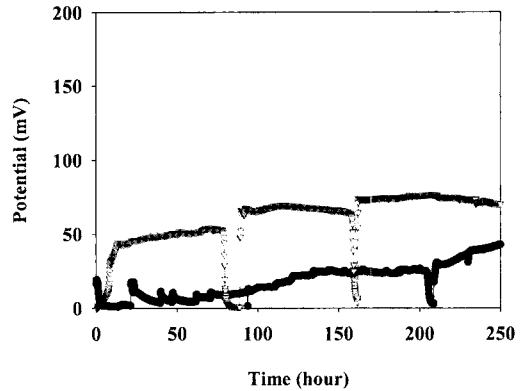


Fig. 2. Effect of H₂SO₄ sterilization on potential generation. MFC reactors were operated with (∇) and without (●) DDW washing for 24 hr after H₂SO₄ sterilization of PEM. Temperature and resistance were 30°C and 500Ω, respectively

Fig. 3은 MFC 전류생산에 대한 NaCl 농도의 영향을 나타내고 있다. MFC의 음극부와 양극부 배지 모두에 50 mM NaCl을 사용한 경우 5 mM의 경우보다 높은 전압이 관찰되었다. 5 mM 및 50 mM의 NaCl에 대해 최대 전극 면적당 전력밀도는 각각 8 mW/m² 및 20 mW/m²로 계산되었다.

이와 같은 결과는 폐수를 이용한 MFC 실험에서 NaCl을 첨가했을 때 더 높은 전류와 효율이 관찰된 것과 일치 한다⁸⁾. NaCl은 전기전도성을 지닌

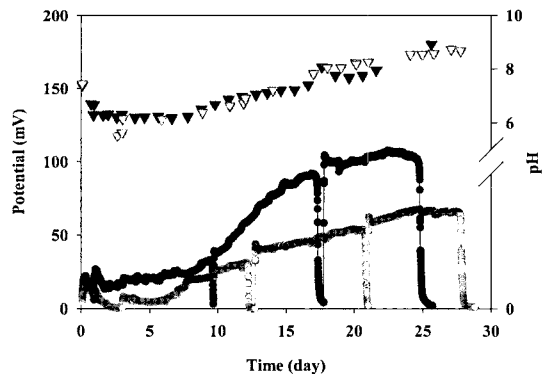


Fig. 3 Effect of NaCl concentration on electricity generation (∇, ●) and pH change (∇, ▼). Purple symbols represent 5 mM NaCl and black symbols represent 50 mM NaCl. Temperature and resistance were 30°C and 500Ω, respectively

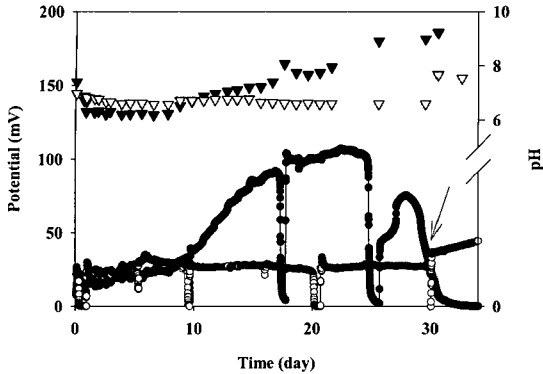


Fig. 4 Effect of phosphate buffer concentration on potential generation (○, ●) and pH change (▽, ▼). Purple symbols represent 50 mM phosphate and black symbols represent 5 mM phosphate. Arrow indicates that 50 mM sodium phosphate buffer was replaced by 20 mM phosphate buffer. Temperature and resistance were 30°C and 500Ω, respectively

물질로 음극부내 수소이온의 이동을 향상시킬 수 있지만, 과도한 NaCl 사용은 오히려 PEM을 통한 수소이온 전달을 방해시켜 전체적인 MFC 성능을 떨어뜨릴 수 있는 것으로 알려져 있다⁹⁾.

3.3 Sodium Phosphate buffer의 영향

Ar 가스 치환에 의한 혐기 상태에서 전기 생산에 대한 sodium phosphate 5 mM과 50 mM의 영향을 조사 하였다. 그 결과 MFC의 음극부와 양극부 배지 모두에 5 mM sodium phosphate를 사용한 경우 18일 동안 전압이 증가하여 평균 102 mV에서 7일간 안정화 되었고 50 mM sodium phosphate를 사용한 경우 실험초반부터 평균 27 mV에서 안정화 되었다(Fig. 4). 전력 밀도에서 보면 5 mM sodium phosphate를 사용하였을 때 세 번째 주기에서 평균 18 mW/m²을 나타낸 반면 50 mM sodium phosphate에서는 평균 1 mW/m²에서 그쳤다. 동일 실험 set에서 50 mM sodium phosphate buffer를 20 mM로 교체 하였더니 24시간 만에 pH는 6.6에서 7.7, 전압은 27 mV에서 37 mV로 상승하였다.

상대적으로 많은 전기를 생산하는 5 mM sodium phosphate를 이용한 MFC 실험에서는 음

극부가 pH 9.5까지 상승하여 미생물의 전기 생산을 제한하였다. 반면 50 mM sodium phosphate를 사용한 MFC의 경우 낮은 전기를 생산하였지만 지속적인 전기 생산이 가능하였으며 pH의 영향을 적게 받아 실험초기부터 안정화 되었다. 또한 50 mM을 20 mM sodium phosphate buffer로 교체 하였을 경우 전압과 pH가 모두 상승한 것으로 보아 buffer의 capacity가 지속적인 전기 생산과 관련이 있고 실험 결과 3.2에서와 같이 많은 양의 전해질로 인해 양이온과 수소이온의 경쟁적 PEM 이동이 발생하여 높은 전력 생산을 저해 할 것으로 생각 된다^{9,10)}.

23.8 mM sodium bicarbonate를 사용한 본 실험은 Ar 가스의 지속적인 공급에 의해 음극부에서 생성되는 CO₂가 탈기되고 용액과 공기 중의 CO₂ 평형상태가 깨져 pH가 9.5까지 상승하였다. 균체 배양 실험시 pH 9.5에서는 *G. sulfurreducens*의 성장이 관찰되지 않았다 (data not shown). 이는 과도한 pH 상승이 높은 전력 밀도와 효율을 도출하는데 제한요소임을 나타낸다. 본 실험 조건에서 sodium bicarbonate buffer capacity 저해 현상은 50 mM의 sodium phosphate를 사용함으로써 음극부의 중성 pH를 유지할 수 있었다.

3.4 Bicarbonate의 영향

음극부 배지에 50 mM의 sodium phosphate buffer를 사용할 경우 23.8 mM sodium bicarbonate가 *G. sulfurreducens*를 이용한 MFC의 전기생성과 pH 변화에 어떤 영향을 주는지 알아보기 위해 23.8 mM의 sodium bicarbonate가 포함되지 않은 50 mM sodium phosphate buffer로 교체하였다. Fig. 5는 그 결과를 보여주는 것으로서 buffer 교체 전부터 pH 6.8과 30-40 mV의 전압 생성을 유지한 실험은 sodium bicarbonate를 제거하여도 그 값에는 큰 차이가 없었다. Ar 가스에 의한 혐기 조건에서 sodium bicarbonate를 제거하여도 pKa 6.35의 bicarbonate buffer 체계가 아닌 pKa 6.70의 phosphate buffer에서 실험이 이

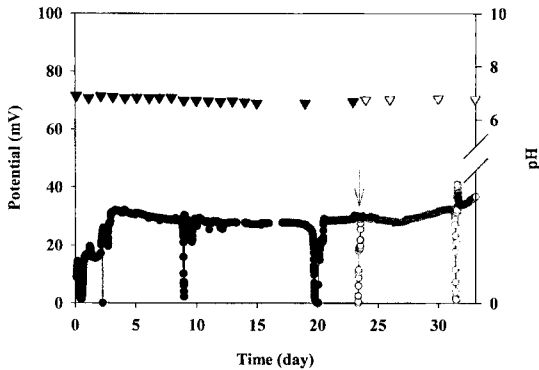


Fig. 5 Effect of bicarbonate buffer on potential generation (○, ●) and pH change (▽, ▼). Arrow indicates that anode medium containing phosphate and bicarbonate was replaced same medium without bicarbonate. Temperature and resistance were 30°C and 500Ω, respectively

뤄지고 있음을 알 수 있었다.

Fig. 4와 5를 통해 50 mM의 sodium phosphate buffer는 5 mM의 것보다 buffer capacity가 높아 pH의 안정화가 용이 하였고 *G. sulfurreducens*에 의한 MFC 전기 생산이 phosphate buffer에서도 가능하다는 것을 알 수 있었다. 하지만 외부 회로를 통한 전자의 이동과 동시에 전기적 중성을 유지하기 위해 PEM을 통한 수소이온의 이동이 함께 일어나는 것을 생각해 볼 때 많은 양의 전해질은 양이온의 증가를 유발 할 것으로 생각된다. 결국 수소 이온은 양이온들과의 경쟁적으로 PEM을 통과하고 이는 MFC 효율을 저해할 것으로 생각 된다^{9,10}.

4. 결 론

- 1) 반응기와 PEM의 멸균 및 전처리 후 남아 있는 NaClO, H₂SO₄는 반응기 내부의 pH와 미생물 수를 낮춰 MFC 초기의 안정화와 전기 생산을 저해하므로 MFC 실험재료의 멸균 및 세척은 MFC에 의한 전기 생산에 중요한 인자 중 하나이다.
- 2) 50 mM의 NaCl을 사용한 경우가 5 mM 보다

높은 전류 생산을 나타내었고, 이때 전력 밀도는 각각 20 mW/m² 및 8 mW/m²로 관찰되었다.

- 3) Ar을 이용한 혐기 조건에서 23.8 mM bicarbonate, 5 mM phosphate buffer를 사용할 경우 음극부의 pH는 상승경향을 보이며 25일 이후 pH가 9.5까지 증가하여 전류생산이 중단 되었으나 중단되었던 전기 생산은 50 mM phosphate 를 사용할 경우 안정적인 전기 생산이 가능하였다.
- 4) 23.8 mM bicarbonate가 포함된 50 mM의 phosphate buffer를 사용할 경우 실험 초반부터 pH 6.8과 30-40 mV의 전압 생성을 유지하였고 bicarbonate가 없는 50 mM의 phosphate buffer로 교체하여도 pH와 전기 생산 모두 영향을 받지 않았다.

후 기

이 연구(논문)는 교육과학기술부의 지원으로 수행하는 21세기 프론티어연구개발사업(수소에너지 사업단)의 일환으로 수행되었습니다.

참 고 문 헌

- 1) D. call and B. E. Logan, "Hydrogen production in single chamber microbial electrolysis cell lacking a membrane", Environ. Sci. Technol., Vol. 42, No. 9, 2008, pp. 3401-3406.
- 2) R. A. R., A. W. Jeremiasse, H. V.M. Hamelers and C. J. N. Buisman, "Hydrogen production with a Microbial Biocathode", Environ. Sci. Technol., Vol. 42, No. 2, 2008, pp. 629-634.
- 3) D. R. Lovley, "Bug juice; harvesting electricity with microorganisms", Nature reviews, Vol. 4, 2006, pp. 497-508.
- 4) D. R. Bond, D. E. Holmes, L. M. Tender and D. R. Lovley, "Electrode-reducing

- Microorganism That Harvest Energy from Marine Sediments", *Science*, Vol. 295, 2002, pp. 483-485.
- 5) G. Reguera, K. D. McCarthy, T. Mehta, J. S. Nicoll, M. T. Tuominen and D. R. Lovley, "Extracellular electron transfer via microbial nanowires", *Nature*, Vol. 435, No. 23, 2005, pp. 1098-1101.
 - 6) G. Reguera, K. P. Nevin, J. S. nicoll, S. F. Covalla, T. L. Woodard and D. R. Lovley, "Biofilm and Nanowire Production Leads To Increased Current in *Geobacter Sulfurreducens* Fuel Cells", *Appl. Environ. Microbial.*, Vol. 72, No. 11, 2006, pp. 7345-7348.
 - 7) D. R. Bond and D. R. Lovley, "Electricity Production by *Geobacter sulfurreducens* Attached to Electrode", *Appl. Environ. Microbial.*, Vol. 69, No. 3, 2003, pp. 1548-1555.
 - 8) G. C. Gil, I. S. Chang, B. H. Kim, M. Kim, J. K. Jang, H. S. Park and H. J. Kim, "Operational parameters affecting the performance of a mediator-less microbial fuel cell", *Biosens. and Bioelectronics*, Vol. 18, 2003, pp. 327-334.
 - 9) R. A. Rozendal, H. V.M. Hamelers and C. J. N. Buisman, "Effect of Membrane Cation Transfer on pH and Microbial Fuel Cell Performance", *Environ. Sci. Technol*, Vol. 40, No. 17, 2006, pp. 5206-5211.
 - 10) K. J. Chae, M. j. Choi, F. F, Ajayi, W. sh. Park, I. S. Chang and I. S. Kim, "Mass Transport through a Proton Exchange Membrane (Nafion) in Microbial Fuel Cell", *Energy & Fuels*, Vol. 22, 2008, pp. 169-176.
 - 11) H. J. Kim, H. S. Park, M. S. Hyun, I. S. Chang, M. Kim and B. H. Kim, "A mediator-less microbial fuel cell using a metal reducing bacterium, *Shewanella putrefacien*", *Enzy. Microb. Technol.*, Vol. 30, 2002 , pp. 145-152.
 - 12) Pham, T. Hai, J. K. Jang, I. S. Jang and B. H. Kim "Improvrment of Cathode Reaction of a Mediatorless Microbial Fuel Cell", *J. Microbial. Biotechnol.*, Vol. 14, No. 2, 2004, pp. 324-329.
 - 13) Z. d. Liu and H. R. Li, "Effect of bio-and abio-factors on electricity production in a mediatorless microbial fuel cell", *Biochem. Eng. J.*, Vol. 36, No. 3, 2007, pp. 209-214.