Korean J. Microbiol. Biotechnol. (2014), 42(1), 41–50
http://dx.doi.org/10.4014/kjmb.1311.11008
pISSN 1598-642X eISSN 2234-7305

KJMB
Korean Journal of Microbiology and Biotechnology

수소 생산과 세균 군집구조에 미치는 PVA-포괄고정화의 영향

윤정희, 김태관, 조경숙*
Global Top 5 Reserch Program, 이화여자대학교 환경공학과

Received: November 21, 2013 / Revised: January 8, 2014 / Accepted: January 9, 2014

Effect of PVA-Encapsulation on Hydrogen Production and Bacterial Community Structure
Jeonghee Yun, Tae Gwan Kim, and Kyung-Suk Cho*
Department of Environmental Science and Engineering, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Republic of Korea

In this study, the performances of PVA-encapsulation and non-encapsulation in a fed-batch bioreactor system were compared for biohydrogen production. Hydrogen production in the PVA-encapsulation bioreactor was not significantly different in comparison to the non-encapsulation bioreactor. However, the hydrogen gas in the encapsulation bioreactor could be stably produced when it was exposed to environmental difficulties such as pH impact by the accumulation of organic acids as fermentative metabolic products. Bacterial communities by DGGE analysis were differently shifted between the PVA-encapsulation and non-encapsulation bioreactors from the initial sludge. The community of hydrogen producing bacteria was stable during the experimental period in the PVA-encapsulation bioreactor compared to the non-encapsulation method. The absolute quantitation of the DNA copy number by a high-throughput droplet digital PCR system for six genera contributed to hydrogen production showing that the numbers of dominant bacteria existed at similar levels in the two bioreactors regardless of encapsulation. In both of two bioreactors, not only *Clostridium* and *Enterobacter*, which are known as anaerobic hydrogen producing bacteria, but also *Firmicutes, Ruminococcus* and *Escherichia* existed with 1×10^5 -1×10^6 copy numbers of ml-samples exhibiting rapid growth during the initial operation period.

Keywords: Polyvinyl alcohol (PVA), encapsulation, hydrogen production, bacterial community

서 론

화석연료 사용으로 인한 온실가스 급증문제와 화석연료 자원고갈에 따라 대체에너지원 개발에 대한 관심이 집중되고 있다. 대체에너지원 중에서 이산화탄소 배출 등의 2차 공해 유발이 없으며 실현가능성이 높은 시스템이라는 점에서 수소생산에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다[9, 17, 26, 27, 38]. 기존의 열분해나 화학공정의 부산물로부터 수소를 얻는 수소 제조 기술[14, 23] 보다는 최근에는 유기성 폐기물로부터 생물학적 방법에 의한 수소 생산이 지속가능한 청정에너지 생산기술 중 하나로 주목받고 있다[9, 26]. 대표적인 생물학적 수소생산은 유기물의 혐기적 분해를 통해 이루어지는데[19, 38], 수소 생산 효율을 높이기 위해서는 pH와 체류시간(HRT)을 최적조건으로 유지하는 것 뿐만 아니라[12, 18], 세균을 반응기내에서 고농도로 유지하는 것이 중요하다[15, 21, 24]. 최근들어 세포 고정화법과 같은 방법 등을 통하여 반응기내에서 세균을 고농도로 유지함으로써 수소 생산 효율 개선을 위한 연구가 이루어지고 있다[17, 34, 40]. 일반적으로 미생물은 온도, pH와 같은 환경인자 뿐만 아니라 배양과정 중 생산되는 발효산물 자체로부터 쉽게 영향을 받을 수 있다[1, 35]. 그런데 미생물을 고정화하면 온도나 pH와 같은 환경조건의 변화 뿐만 아니라 미생물의 성장을 저해할 수 있는 독성물질 유입 등의 극도로 불안정한 환경에서 고정화담체의 완충작용으로 세균의 활성을 안정적으로 유지할 수 있다[16, 21, 28]. 특히, 혐기성 세균의 수소 생산 관련 효소 시스템은 산소에 노출시 매우 불안정해지기 쉽기 때문에 즉각적인 생산수율의 저하를 초래할 수 있다[3, 30].

미생물을 고정화하기 위한 담체로는 agar [28], alginate [28], chitosan [16] 및 polyacrylamide [4, 39], polyurethane

*Corresponding author
Tel: +82-2-3277-2393, Fax: +82-2-3277-3275
E-mail: kscho@ewha.ac.kr
© 2014, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

[4, 39] 등의 다양한 천연 고분자 및 합성 고분자들이 사용되고 있는데, 천연 고분자 물질은 물리적 내구성이 낮다는 한계점이 있다[4]. 다양한 고분자 물질들 가운데 polyvinyl alcohol (PVA)는 합성고분자 물질로 가격이 저렴한 경제적 측면의 이점 뿐만 아니라 세균 독성이 없어 널리 사용되고 있다[22, 30]. 이러한 다양한 담체를 활용한 미생물고정화 방법이 질산과 인 제거 및 중금속 제거 등을 목적으로 유효미생물의 고농도 유지 및 대체응집제로써 폐수처리 분야에서 활발히 연구되어 왔다[5, 6, 20, 25, 29]. 또한, 미생물 고정화 방법은 산소노출에 대한 미생물의 안정적 활성 유지가 가능하다는 점에서 에탄올 또는 유기산 생산 등의 발효공정 등에 시도되었을 뿐 아니라[8, 11], 유기산 등의 대사 부산물의 영향을 받기 쉽고 세포의 유실이 많은 수소생산에 적용한 연구가 보고되고 있다[2, 15, 18, 21, 24, 37] 고정화미생물을 이용한 수소생산은 안정적인 수소생산 단계까지 소요되는 지체기를 단축시키는 장점이 있다[2, 18]. 그러나 유리세포에 비하여 수소 생산성 향상에 거의 영향을 미치지 않고[21] 오히려 수소생산수율이 낮다는 연구결과도 보고되고 있다[24]. 이와같이 수소생산에 미치는 미생물 고정화 효과에 대해 서로 상반된 결과들이 보고되어 있어, 수소 생산에 대한 미생물 고정화 효과를 좀 더 자세하게 규명할 필요가 있다. 본 연구에서는 수소생산 미생물의 PVA-boric acid를 이용한 고정화법이 수소생산 시스템에 유용한 방법인지 여부를 평가하기 위해, 고정화법을 이용한 수소생산과 세균군집구조에 미치는 미생물 고정화 효과를 정성·정량적으로 평가하였다.

재료 및 방법

접종원 및 미생물 고정화 방법

서울 중랑물재생센터의 혐기소화조에서 채취한 슬러지를 90°C에서 30분간 열처리하여 수소 생산을 위한 접종원으로 사용하였다. 열처리 슬러지를 다음과 같이 PVA를 이용하여 포괄고정화 방법으로 고정화하였다. 열처리한 혐기소화슬러지(20.21±0.95 g-dry weight/L) 200 ml와 15% PVA (degree of polymerization, 2000)와 2% sodium alginate 혼합용액 200 ml를 혼합(건조중량 기준 = 40:30:4)하였다. 균일하게 섞어준 혼합용액을 연동펌프를 통해 주사바늘로부터 나오는 bead 크기가 일정하게 형성되도록 속도(2 drops/sec)를 조절하면서 포화 5.5% boric acid와 5.5% $CaCl_2$의 혼합용액(w:w = 1:1)에 적하시켰다. 이렇게 형성된 bead의 평균직경은 4 mm였으며, 완전한 가교결합을 위하여 생산된 bead는 0.5 M phosphate solution 용액에 1시간 방치한 뒤 사용하였다. 비고정화 반응기에는 열처리 슬러지 200 ml를 접종하였으며, PVA 고정화 bead 반응기에는 열처리 슬러지 200 ml를 사용하여 제조한 bead를 접종하였다.

수소생산을 위한 fed-batch 생물반응기

실험에 사용된 fed-batch 생물반응기는 부피 7 L 아크릴로 제작하였고(내경 15 cm × 높이 40 cm), 반응기 상단에 10-L tadler bag을 연결하여 반응기내에서 발생한 가스를 포집하였다. 본 실험에서는 인공폐수를 이용하여 수소 생산효율은 평가하였다. 사용된 인공폐수의 조성은 1 L의 증류수당 sucrose, 10,000 mg COD; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 100 mg; NH_4HCO_3, 2,500 mg; $NaHCO_3$, 3,300 mg; K_2HPO_4, 60 mg; $MnSO_4 \cdot 6H_2O$, 15 mg; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 25 mg; $CoCl_2 \cdot 5H_2O$, 0.125 mg; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 5 mg이고, pH는 6.5로 맞추었다. PVA 고정화 bead와 비고정화에 의한 수소생산 비교실험을 위하여 다음과 같이 접종하였다.

각 접종원을 포함하는 두 반응기 모두 접종후 2 L의 인공폐수로 6일간 전배양하였다. 전배양후 배양액은 30분 이상 정치하여 바이오매스를 충분히 가라앉힌 뒤 반응기내부의 밀폐상태를 유지한 채 분리된 상등액을 연동펌프를 통해 빼낸 뒤 새로운 인공폐수를 2 L를 공급하여 2일 간격으로 교체하였다. 운전기간동안 반응기 내부의 균일한 혼합을 위하여 200 rpm으로 교반하면서 중온소화온도 35°C에서 26일간 운전하였다. 전체 운전기간 동안 반응조용액 교체를 총 8회 실시하였다.

분석방법

반응기 용액의 pH는 pH meter (Orion model 420A, USA)로 실온에서 측정하였고, 반응기내에서 발생한 가스의 부피 및 성분 분석을 수행하였다. 가스함량은 gas-tight syringe로 수소는 300 µl 채취하고 이산화탄소는 500 µl 채취하여 TCD 장착 가스크래마토그래피(Agilent 7890A, USA)로 가스 농도를 분석하였다. 분석에 사용한 컬럼은 capillary 컬럼(30 m × 0.32 ID mm × 0.45 OD mm, Agilent, CP-Molsieve 5A)이며, 열전도도 검출기를 사용하였다. 오븐, 주입구 및 검출기 온도는 각각 50, 80 및 120°C이었다. 분당 3 ml 헬륨을 캐리어가스로 사용하였다.

반응기 용액중 유기산 농도는 0.45 µm 실린지 필터를 이용하여 여과한 시료를 액체크로마토그래피(Waters Binary HPLC pump, USA)로 실온에서 분석하였다. 컬럼은 Agilent Hi-Plex H PL1170-6830 column (300 mm × 7.7 mm, 8 µm)을 장착하였고, 이동상은 0.005 M H_2SO_4을 사용하여 0.6 ml/min으로 흘려주었고 UV 검출기를 이용하여 파장 210 nm에서 측정하였다. 분석된 유기산은 acetate, propionate, butyrate, iso-valerate, valerate였으며, 분석은 각 안정상태에서 2회 실시하였다. 유입폐수 및 반응기 용액중 soluble chemical oxygen demand (SCOD)는 0.45 µm 실린지 필터를 이용하여 여과한 시료를 HACH (USA)에서 제공하는 분석용액을 이용하여 Thermo Orion AQ2040 (USA) 분광광도

http://dx.doi.org/10.4014/kjmb.1311.11008

계를 사용하여 측정하였다. 유기산 분석 결과는 g-removal COD 당 생성된 유기산 값으로 환산하여 나타내었다.

Denaturing gradient gel electrophoresis를 이용한 수소생산 세균 군집분석

고정화 및 비고정화 반응조내 세균의 군집은 PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)로 분석을 하였다. Day 0, 10, 16, 26에 수소생산 세균 군집분석을 위하여 샘플링을 진행하였다. 슬러지는 0.5 ml 및 동량의 bead를 채취하여 13,200 rpm에서 5분간 원심분리한 뒤 바이오매스를 회수하여 DNA 추출시료로 사용하였다. DNA는 NucleoSpin® Soil kit (Macherey-Nagel GmbH Co., Germany)을 이용하여 추출, 정제하였고, 추출방법은 매뉴얼에 따라 수행하였다. 모든 genomic DNA는 2반복으로 추출되었다. DGGE 분석은 추출한 DNA를 주형으로 하여, 16S rRNA 유전자 단편을 PCR을 통하여 증폭하였고, 이 때 사용된 primer set은 universal bacterial primer set으로 GC clamp가 달린 341f(5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3')와 907r (5'-CCCCGTCAATTCATTTGAG TTT-3')을 이용하였다[33]. PCR 반응 혼합물의 조성은 5 μl의 10× buffer, 4 μl의 2.5 mM dNTP, 각각 10 μM의 primer set 1 μl, 5 U/μl의 *Taq* polymerase 0.25 μl와 DNA 시료를 3 μl를 혼합하여 최종 부피를 50 μl로 하였다. PCR은 GeneAmp® PCR system Model 2700(PE Applied Biosystems, USA)를 이용하여 수행하였고 그 조건은 다음과 같았다: initial denaturation 95°C, 4분; 30 cycles - denaturation 96°C, 30초; annealing 50°C, 30초; elongation 72°C, 30초; the final elongation step 72°C, 5분. 각 PCR 산물은 2% 아가로즈 겔에서 확인하였다. QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Netherlands)을 이용하여 정제하였다.

PCR 증폭산물은 30%에서 70%의 농도구배를 지닌 6% 겔을 이용하여 전기영동을 수행하였으며, 각 well 당 20 μl의 시료를 loading 하였다. 전기영동 완충액은 1× TAE buffer를 사용하였으며, 60°C에서 100 V로 5분간 안정화 시킨 후, 50 V로 전압을 내려 14시간동안 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 완료된 겔은 1× TAE buffer 500 ml와 10 mg/ml의

Table 1. Reference strains and PCR primer and probe for detection of H_2 producing bacteria.

Target group	Primer or probe	Sequence (5'-3')	Reference
Firmicutes	Firm8F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	
	Firm534R	ATTACCGCGGCTGCTGG	[10]
	FirmP	CTGATGGAGCAACGCCGCGT	
Clostridium	CLO1F	GCCTYCCGAAAGGRAGATTA	
	CLO1R	TACGCATCGYYGYCTTGG	This study
	CLO1P	GCTWTRAGATGGRCCCGCGGCGC	
Caldicellulosiruptor	CaldF	GGGCTGCTAATACCCGATGG	
	CaldR	AGGTTTACACCCCGAAGGSY	This study
	CaldP	TGRTGWTGTGGTGAAAGGGTRGMC	
Enterobacter	EntF	GGAGGGTGCAAGCGTTAAT	
	EntR	AATGCAGTTCCCAGGTTGAG	This study
	EntP	CTTGACAGACCGCCTGCGTGCGC	
Ruminococcus	RuccF	AGGTTGAACGGCCACATT	
	RuccR	AGACAGRRGTTTACAATCCKAAA	This study
	RuccP	CCTGATGCAGCGATGCCGCGTG	
Escherichia	EcoliF	CATGCCGCGTGTATGAAGAA	
	EcoliR	CGGGTAACGTCAATGAGCAAA	[13]
	EcoliP	TATTAACTTTACTCCCTTCCTCCCCGCTGAA	
Total eubacteria	Bac349F	AGGCAGCAGTDRGGAAT	
	Bac806R	GGACTACYVGGGTATCTAAT	[31]
	Bac516P	TGCCAGCAGCCGCGGTAATACRDAG	
Total archaea	Arch349F	GYGCASCAGKCGMGAAW	
	Arch806R	GGACTACVSGGGTATCTAAT	[31]
	Arch516P	GYGCASCAGKCGMGAAW	

ethidium bromide 50 μl를 이용하여 20분간 염색하고, 1× TAE buffer 500 ml를 이용하여 30분간 탈색 하였으며, 염색이 완료된 겔은 Gel Logic 200 imagine system을 이용하여 band의 패턴을 확인하였다. 세균 군집구조의 주성분 분석(principal component analysis, PCA)은 DGGE band intensity로부터 Canoco progam (Microcomputer Power, USA)을 이용하였다.

Droplet digital PCR (ddPCR)을 이용한 수소생산 세균 절대정량

운전한 수소생산 유가배양조에서 운전시작일로부터 Day 0, 10, 16, 26에 수소생산 세균 절대정량을 위한 샘플링을 진행하였다. 상위의 DGGE 분석에서 수행한 것과 동일한 방법으로 DNA를 추출하였다. 각각의 bead 및 혐기소화 슬러지 반응조에서 채취한 시료로부터 추출한 DNA를 주형으로 하여, *Firmicutes, Clostridium tyrobutyricum, Caldicellulosiruptor saccharolyticus, Enterobacter oryzae, Ruminococcus flavefaciens* 및 *Escherichia coli*와 total bacteria, total archaea, total prokarya를 절대정량 분석하였고, 이 때 사용된 primer 및 probe를 Table 1에 나타내었다.

ddPCR 반응 혼합물의 조성은 10 μl의 PCR premix (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA), 각각 20 μM의 primer 0.9 μl, 5 μM의 probe 1 μl, 그리고 DNA 시료 2 μl를 첨가하여, 최종 부피가 20 μl가 되도록 하였으며, QX100TM Droplet DigitalTM PCR system (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA)를 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR 수행 조건은 95°C에서 10분간 predenaturation을 한 후, 94°C에서 30초간 denaturation, 60°C에서 45초간 annealing, 60°C에서 45초간 extension을 하여, 이 과정을 40 cycle 수행한 후, 마지막으로 96°C에서 10분간 final extension을 하였다. 정량분석 결과는 ml-sludge 당 측정된 gene copy number로 나타내었다.

결과 및 고찰

고정화와 비고정화 방법에 의한 수소 생산효율 비교

본 실험에서 사용한 열처리 혐기소화슬러지를 사용하여 제조한 고정화 경우와 비고정화 경우의 수소생산성을 분석하였고, 그 결과를 Fig. 1과 Table 2에 나타내었다. 고정화 및 비고정화 반응조의 배양액의 pH는 초기 pH 6.5보다 낮아졌는데, 이는 부산물인 유기산이 축적되었기 때문이다(Table 2). 고정화 반응조에서는 수소생산 결과 생성된 유기산에 의한 pH 강하에 영향을 덜 받게되어 더 안정된 pH 값이 유지함으로써 장기적인 운전시 세포생장 또는 활성의 저해를 완화시킬 수 있을 것으로 생각된다. 고정화 반응조에서는 고정

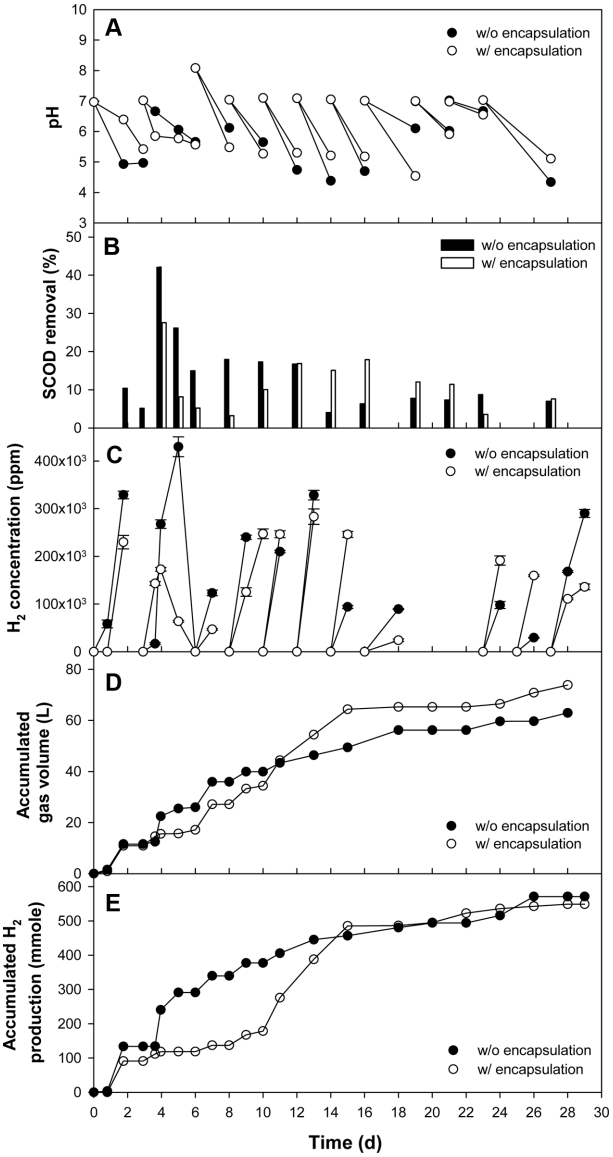

Fig. 1. Time course profile of hydrogen production performance in PVA-encapsulation and non-encapsulation. (A) pH, (B) SCOD removal, (C) hydrogen concentration, (D) accumulated total gas volume (H_2 and CO_2), (E) hydrogen production.

화 담체 성분으로 사용된 alginate 자체가 유기물 공급원으로 포함되어 초기 COD 값이 오히려 증가하여 유입기질의 COD보다 높은 값을 나타내었으나 3일 경과후부터는 이러한 영향이 나타나지 않았다(Fig. 1B). 또한, 운전시작 후 26일 경과 후 최종 실험종료시까지 COD 제거율에서는 큰 차이를 보이지 않았다(COD removal, 4% < 비고정화 < 42%; 3% < 고정화 < 28%). 각 반응조에서 발생한 수소가스의 농도는 운전시작 초기 안정화 기간(7일) 이후 비고정화의 경우 최대 3.28×10^5 ppm, 고정화의 경우 최대 2.85×10^5 ppm으

http://dx.doi.org/10.4014/kjmb.1311.11008

Table 2. The volatile fatty acids (VFAs) in non-encapsulation and PVA-encapsulation.

Unit: mg/g-$COD_{removal}$

Sample	Day	Acetic acid	Propionic acid	Butyric acid	Iso-valeric acid	Valeric acid	TVFA
Non-encapsulation	0	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0
	10	285 (34%)	38 (5%)	439 (53%)	67 (8%)	0 (0%)	830
	16	3088 (93%)	67 (2%)	164 (5%)	0 (0%)	0 (0%)	3319
	26	978 (53%)	254 (14%)	420 (23%)	180 (10%)	0 (0%)	1831
PVA-encapsulation	0	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0
	10	1299 (52%)	87 (3%)	905 (36%)	223 (9%)	0 (0%)	2514
	16	757 (47%)	57 (4%)	622 (39%)	166 (10%)	0 (0%)	1602
	26	2655 (52%)	163 (3%)	958 (19%)	1324 (26%)	0 (0%)	5100

TVFA (total volatile fatty acid) = Hac + HPr + Hbu + His + Hva.
% = (Each volatile fatty acid/TVFA) × 100.

로 나타났으며 15일 이후 두 반응조 모두에서 급격한 농도 감소가 관찰되었다. 15일 이후에 수소생산이 감소한 이유는 반응조내에 고농도로 축적된 유기산에 의해 수소생산세균이 저해를 받았기 때문으로 생각된다. 발생하는 가스부피는 운전 시작 후 10일 경과시점부터 차이가 발생하기 시작였으며, 최종 누적 가스부피는 고정화의 경우 다소 많은 양의 가스가 발생하는 것으로 나타났다(고정화: 74 L; 비고정화: 63 L). 그러나 수소생산량에 있어서는 비고정화 반응조에서 운전시작 초기부터 상대적으로 많은 양의 수소가 생산되었고 10일 경과시점부터 고정화 반응조에서 급격하게 수소가 발생하였으나 운전시작 후 2주 경과시점에는 두 반응조 모두에서 수소생산성은 정지되는 것으로 나타났다(최종 누적 수소 발생량, 고정화: 549 mmole; 비고정화: 571 mmole). 이는 비고정화에 비해 유입기질 및 영양분이 고정화 담체 내부로의 유입이 제한되어 초기 수소생산이 오히려 지연되었을 것으로 생각된다. 본 연구에서 사용한 고정화 반응조에서 수소가 발생하기 시작함과 동시에 고정화 bead가 swelling 되어 부상하였을 뿐 아니라 agglomeration이 관찰되었으며, 이는 고정화 담체내로 충분한 기질공급이 이루어지지 않았을 가능성을 시사한다. 기존 연구에서도 PVA-boric acid 방법을 적용하였을 때 고정화세포의 agglomeration과 swelling 현상에 의한 문제점이 보고된 바 있다[22].

고정화 반응조에서 수소발생이 시작되면 bead가 부상하고, 부상된 bead 밖으로 가스가 빠져 나가고 나면 다시 bead가 가라 앉았다가 수소가 발생하면 다시 부상하는 등의 패턴이 반복되는 것이 관찰되었다. 이러한 과정이 반복되는 동안 bead의 물성이 약화되어 기질공급이 더 원활해졌기 때문에 10일 경과시점에 수소생산량이 급격히 증가한 것으로 생각된다.

비고정화 반응조에서 Day 16에 생성된 총유기산이 최대량을 나타내었고 이는 결과적으로 Day 16에 pH 4.7까지 낮아진 것에 직접적인 영향을 준 것으로 판단된다(Table 2). 고정화 반응조에서는 운전기간 종료시점에 총유기산량이 최대치를 나타내었으며 이러한 양상이 pH에도 반영된 것으로 확인되었다. 두 반응조 내에 축적된 유기산은 배양 전기간에 걸쳐 acetic acid(비고정화: 34-93%; 고정화: 47-52%)와 butyric acid(비고정화: 5-53%; 고정화: 19-39%)가 가장 많았으며 propionic acid(비고정화: 2-14%; 고정화: 3-4%)가 소량 검출되었다. Kim 등은 발효과정을 통해 glucose가 분해됨에 따라 butyric acid와 acetic acid가 주요 중간생성물로써 축적되고 이는 수소 생산성과 밀접한 관련이 있다고 보고하였다[17]. 또한 propionic acid의 축적은 수소 발생을 저해하는데 특히 pH 5.8 이하에서는 associated form으로 존재하여 미생물에게 독성을 줄 수 있는 것으로 판단하였다[17].

수소 생산 세균의 군집 분석

반응조 내부의 세균 군집을 DGGE로 분석한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 반응조내에 존재하는 수소생산 세균 군집구조를 관찰하기 위해 수행한 DGGE 분석 결과, 시간이 경과함에 따라 비고정화 반응조에 비하여 PVA bead를 사용한 고정화 반응조에서 DGGE band 패턴 및 intensity의 변화가 상대적으로 적었다. 이는 고정화 반응조에서 수소생산 세균의 군집이 좀 더 안정적으로 유지되고 있는 것을 시사하는데, 수소생산 과정에서 발생하는 유기산에 의한 배양액의 pH 강하 등의 영향이 고정화에 의해 약간 완화되었기 때문이라고 추측된다.

DGGE band를 통한 세균 군집의 PCA 분석 결과(Fig. 2C), 운전시간이 경과함에 따라 비고정화와 고정화 반응조 내 세균 군집구조가 다르게 형성된 것으로 나타났다. 비고정화 반응조의 경우 식종전 열처리에 의해 형성된 유효 수소생산 세균 군집과 운전기간중의 세균 군집이 유사하게 형성되기는 하였으나 군집내 주요 활동 세균의 변동이 다소 큰

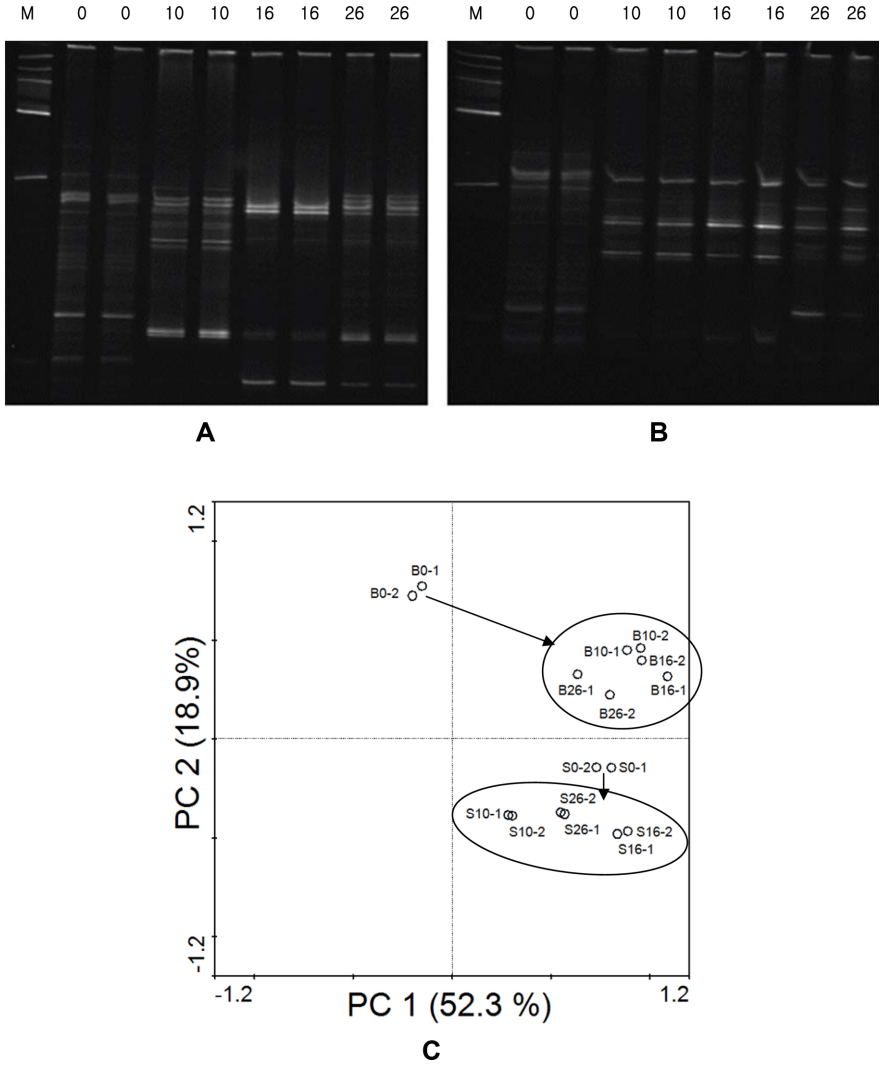

Fig. 2. The microbial communities by DGGE fingerprint analysis of 16S ribosomal DNA in non-encapsulation and PVA-encapsulation. (A) non- encapsulation reactor, (B) PVA-encapsulation reactor, M: marker; Number: operation period (day), (C) principal component analysis (PCA) by DGGE bands (S: non-encapsulation, B: PVA-encapsulation, Number: operation day-replicate).

것으로 나타났다. 반면, 고정화 반응조내 세균 군집구조는 초기 유효 수소생산 세균 군집과는 운전기간 중 형성된 세균 군집과는 상당한 거리가 있는 것으로 나타나나 주요한 수소생산 세균 군집이 운전초기(Day 10)에 형성된 이후 운전종료시까지 안정적으로 유지되는 것으로 나타났다. 이는 고정화 담체성분 자체가 세균의 이용기질로 사용될 수 있기 때문에 이러한 담체성분이 운전초기의 수소생산 세균 군집 형성에 영향을 끼쳤을 가능성이 있는 것으로 생각된다.

고정화 및 비고정화 반응기의 세균 정량 분석

기존의 많은 문헌들을 바탕으로 수소생산 세균으로 잘 알려진 6종[7, 10, 13, 21, 31, 32, 36, 40]을 절대정량하였다. 선정한 6종의 세균 중 *Firmicutes*와 *Clostridium, Ruminococcus* 및 *Caldicellulosiruptor*는 절대혐기성 균이며, *Enterobacter*와 *Escherichia*는 통성혐기성 균이다. 이 중 *Clostridium*과 *Enterobacter*가 가장 대표적인 수소생산 세균이며, 인공기질을 사용한 경우는 물론 *Enterobacter*의 경우 당밀폐수에서 발견되기도 하였다[18]. 반응조 내부의 세균을 ddPCR로 절대정량분석 한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 운전시작 시점에는 비고정화와 고정화 경우 모두 전체 박테리아 중 *Firmicutes*와 *Clostridium*가 가장 많이 존재하는 것으로 나타났으며 archaea도 상당량 존재하는 것으로 나타났다. 비고정화 경우가 고정화 경우에 비해 전체 bacteria와 achaea 및 *Clostridia* class가 1.5-7배 이상 존재하는 것

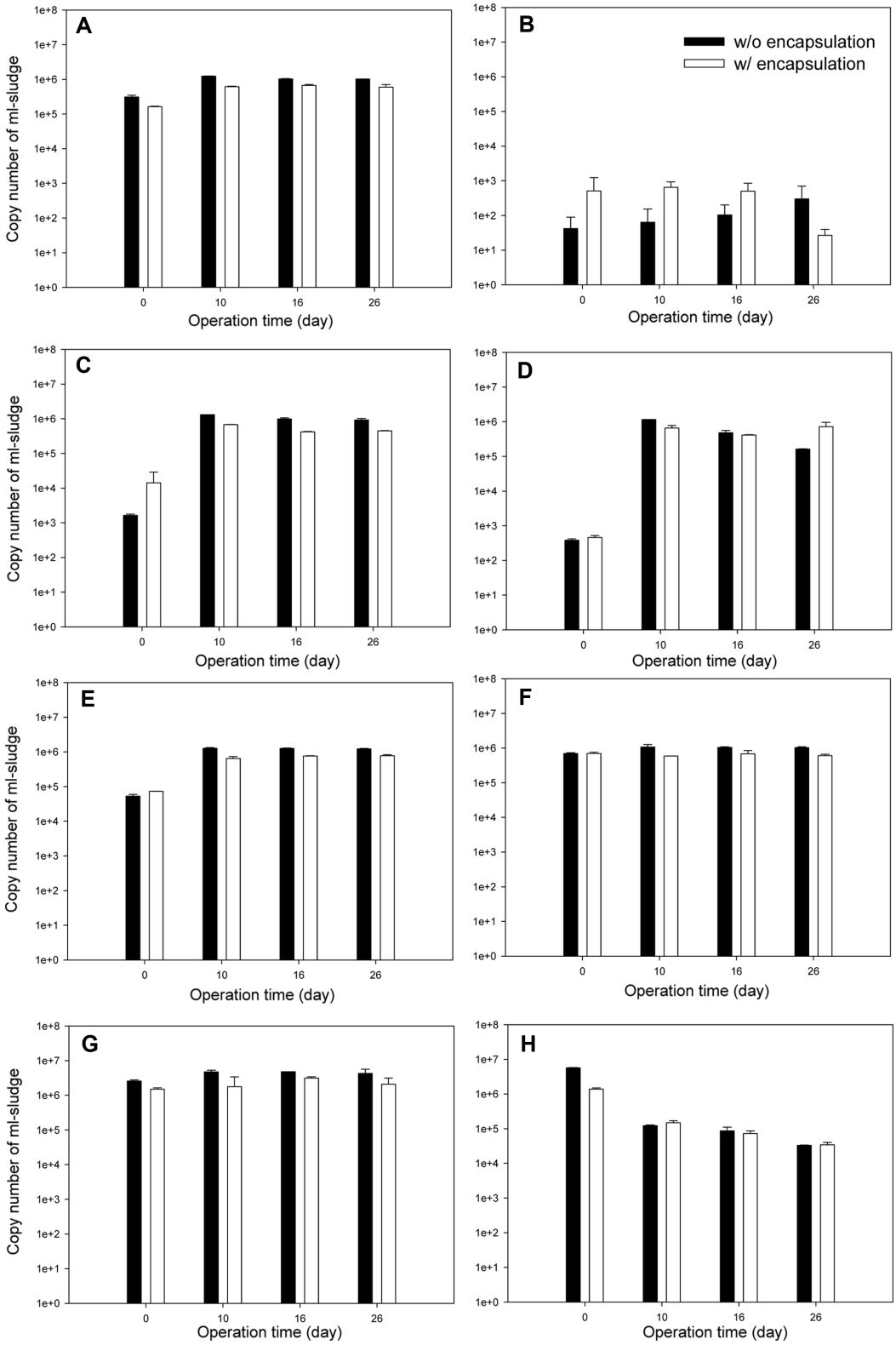

Fig. 3. Absolute quantitation of DNA concentration from the PVA-encapsulation and non-encapsulation bioreactor system (copy number/ml-sludge, log scale). (A) *Clostridium*, (B) *Caldicellulosiruptor*, (C) *Enterobacter*, (D) *Escherichia*, (E) *Ruminococcus*, (F) *Firmicutes*, (G) Eubacteria, (H) Archaea.

으로 나타났다(Day 0). 그러나 운전시간 10일 경과후 비고정화 경우가 고정화 경우보다 2-3배 높은 것으로 나타났으며, 이러한 경향은 운전초기 Day 10부터 운전종료 시점까지 일정하게 유지되는 경향을 나타내었다. 비고정화와 고정화 경우 모두 achaea는 운전종료 시점에 급감한 것으로 나타났다. 두 반응조 모두에서 모든 수소생성이 가능한 세균종들(*Clostridium, Caldicellulosiruptor, Enterobacter*, *Escherichiae*, *Ruminococcus* 및 *Firmicutes*)이 운전시간 10일까지 증식한 이후 변화하지 않았다. 또한 운전시간 10일부터 실험종료까지 두 반응조내 유효 수소생산 세균의 양적 차이는 없는 것으로 나타났다. 따라서, 2주 경과시점에서 두 반응조의 미생물군집의 형태가 다소 차이가 있더라도, 수소생산성의 차이가 나타나지 않았다. 고농도로 축적된 유기산에 의한 저해 등의 요인에 의해 수소생성미생물이 충분히 존재함에도 불구하고 수소생성이 제한되었을 것으로 사료된다.

두 반응조 모두에서 *Caldicellulosiruptor*를 제외한 *Firmicutes, Clostridium, Enterobacter, Ruminococcus* 및 *Escherichia*가 초기 식종슬러지에서 다양한 범위(278-699, 500 copy number of ml-sample)에서 존재하였던 것과 달리 운전시간 경과됨에 따라 운전초기에 1×10^5-1×10^6 copy number of ml-sample 정도로 빠르게 증식하였으며 이는 26일 경과시까지 유지되는 것으로 나타났다. 이는 초기의 열처리에 의해 혐기소화슬러지의 수소 생산 세균 군집이 잘 형성되었기 때문이라고 판단되며, 운전시작 시점에 다른 세균에 비해 적은 수로 존재했던 *Enterobacter* (1635-8485 copy number of ml-sample)와 *Escherichia* (279-381 copy number of ml-sample)도 10일 이내 운전초기에 빠르게 생장한 것으로 나타난 것으로 보아, 초기 접종원에 있어서 유효 수소생산 세균의 양보다는 존재의 유무가 안정적 세균군집을 형성하는데 주요한 인자가 될 것으로 판단되었다. *Caldicellulosiruptor*는 고온환경을 선호하기 때문에[35, 36] 운전시간이 경과함에 따라 생장이 거의 없는 것으로 나타났으며 고정화의 경우는 감소하는 것이 관찰되었다.

Firmicutes, Clostridium, Enterobacter 및 *Escherichia*는 발효산물로 주로 acetic acid와 butyric acid를 생산하는 것으로 알려져 있다[7, 21, 32, 40]. 특히 본 연구에서 주요 우점종으로 나타난 *Firmicutes*와 *Clostridium*는 acetic acid와 butyric acid의 생산과 더불어 소량의 propionic acid를 생산하는 것으로 보고되었으며, 이는 유기산 분석에서 나타난 결과와 일치하였다.

요 약

수소생산 유효세균을 유지하기 위해 열처리한 혐기소화슬러지를 접종원으로 하여 PVA 담체를 활용한 고정화와 비고정화 방법에 의한 수소생산능 및 세균 군집을 비교분석 하였다. 고정화에 의한 수소생산성은 비고정화 방법과 비교하여 수소생산성에 영향을 미치지 않았다. 그러나 고정화 방법은 유기물 분해결과 발생하는 유기산 축적 및 pH 강하 등의 환경변화에 있어 세균의 성장과 활성에 안정적 환경을 제공할 수 있는 가능성을 나타내었다. DGGE 분석에 의한 세균 군집분석에서는 비고정화와 고정화 반응조간에 형성된 세균 군집이 차이가 있는 것으로 나타났으며, 상대적으로 고정화 반응조내의 유효 수소생산 세균 군집이 좀 더 안정적으로 유지되는 것으로 확인되었다. Droplet digital PCR에 의한 6종의 유효한 수소생산 세균 절대정량 분석결과, encapsulation에 관계없이 두 반응기에서의 우점세균수는 유사하였다. *Firmicutes, Clostridium, Enterobacter, Ruminococcus* 및 *Escherichia*가 1×10^5-1×10^6 copy number of ml-sample 수준에서 존재하였다.

Acknowledgments

This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Science, ICT and future Planning (NRF-2012R1A2A2A03046724).

References

1. Aguilar MAR, Fdez-Güelfo LA, Álvarez-Gallego CJ, García LIR. 2013. Effect of HRT on hydrogen production and organic matter solubilization in acidogenic anaerobic digestion of OFMSW. *Chem. Eng. J.* **219**: 443-449.
2. Bai MD, Chao YC, Lin YH, Lu WC, Lee HT. 2008. Immobilized biofilm used as seeding source in batch biohydrogen fermentation. *ISESCO Sci. Technol. Vision* **4**: 55-59.
3. Bingham AS, Smith PR, Swartz JR. 2012. Evolution of an [FeFe] hydrogenase with decreased oxygen sensitivity. *Int. J. Hydrogen Energy* **37**: 2965-2976.
4. Carballeira JD, Quezada MA, Hoyos P, Simeo Y, Hernaiz MJ, Alcantara AR, *et al.* 2009. Microbial cells as catalysts for stereoselective red-ox reactions. *Biotechnol. Adv.* **27**: 686-714.
5. Chen K, Chen S, Houng J. 1996. Improvement of gas permeability of denitrifying PVA gel beads. *Enzym. Microb. Tech.* **18**: 502-506.
6. Choi JW, Lee SY, Chung SG, Lee SH. 2011. Development of the calcium alginate bead immobilized with $TiOSO_4$ for the efficient removal of phosphorous. *J. Korean Soc. Environ. Eng.* **33**: 162-166.
7. Chu A, Mavinic DS, Kelly HG, Ramey WD. 1994. Volatile fatty acid production in thermophilic aerobic digestion of sludge. *Water Res.* **28**: 1513-1522.
8. Dembczynski R, Jankowski T. 2002. Growth characteristics

and acidifying activity of *Lactobacillus rhamnosus* in alginate/starch liquid-core capsules. *Enzyme Microb. Technol.* **31**: 111-115.
9. El-Bery H, Tawfix A, Kumari S, Bux F. 2013. Effect of thermal pre-treatment on inoculums sludge to enhance bio-hydrogen production from alkali hydrolyzed rice straw in a mesophilic anaerobic baffled reactor. *Environ. Technol.* **34**: 1965-1972.
10. Haakensen M, Dobson CM, Deneer H, Ziola B. 2008. Real-time PCR detection of bacteria belonging to the Firmicutes Phylum. *Int. J. Food Microbiol.* **125**: 236-241.
11. Han MS, Chung DH. 1992. Cell immobilization of *Zymomonas mobilis* by entrapment. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 459-469.
12. Huang ST, Chang ACC. 2013. Multivariate statistics to evaluate factors affecting hydrogen production in a pilot-scale operation system. *Int. J. Hydrogen Energy* **38**: 15843-15848.
13. Huijsdens XW, Linskens RK, Mak M, Meuwissen SGM, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Savelkoul PHM. 2002. Quantification of bacteria adherent to gastrointestinal mucosa by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 4423-4427.
14. Jiang H, Wu Y, Fan H, Ji J. 2012. Hydrogen production from biomass pyrolysis in Molten Alkaki. *AASRI Procedia* **3**: 217-223.
15. Keskin T, Giusti L, Azbar N. 2012. Continuous biohydrogen production in immobilized biofilm system versus suspended cell culture. *Int. J. Hydrogen Energy* **37**: 1418-1424.
16. Khondee N, Tathong S, Pinyakong O, Powtongsook S, Chatchupong T, Ruangchainikom C, *et al*. 2012. Airlift bioreactor containing chitosan-immobilized *Sphingobium* sp. P2 for treatment of lubricants in wastewater. *J. Hazard. Mater.* **213-214**: 466-473.
17. Kim JO, Kim YH, Ryu JY, Song BK, Kim IH. 2003. Continuous hydrogen gas production by immobilized anaerobic microorganism. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **18**: 111-116.
18. Kim JS, Hong YK, Sin IS, Cho HR, Chang DS. 1992. Effective supply of substrate for hydrogen production by immobilized cells of *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 79-84.
19. Kothari R, Singh DP, Tyagi VV, Tyagi SK. 2013. Fermentative hydrogen production - An alternative clean energy source. *Renew. Sust. Energy Rev.* **16**: 2337-2346.
20. Kumar SS, Kumar MS, Siddavattam D, Karegoudar TB. 2012. Generation of continuous packed bed reactor with PVA-alginate blend immobilized *Ochrobactrum* sp. DGVK1 cells for effective removal of *N,N*-dimethylformamide from industrial effluents. *J. Hazard. Mater.* **199-200**: 58-63.
21. Lee K, Huh Y, Chung S, Kang C. 2005. Hydrogen production from fruit wastes by immobilized cells of *Enterobacter cloacae* YJ-1. *Korean J. Biotechnol. Bioeng*. **20**: 447-452.
22. Li X, Hu A, Ye L. 2011. Structure and property of porous polyvinyl alcohol hydrogels for microorganism immobilization. *J. Polym. Environ*. **19**: 398-404.
23. Mehdizadeh AM, Klausner JF, Barde A, Mei R. 2012. Enhancement of thermochemical hydrogen production using an iron-silica magnetically stabilized porous structure. *Int. J. Hydrogen Energy* **37**: 8954-8963.
24. Nakao M, Kawagoshi Y, Hino N, Iwasa T, Furukawa K. 2007. Stable fermentative hydrogen production by polyvinyl alcohol (PVA) gel beads fluidized bed reactor. *Korean Wetlands Soc.* **9**: 115-121.
25. Oh CH, Cho HY, Yang HC. 1995. Effects of chitosan on cell flocculation in soybean curd wastewater teated by photosyntheric bacteria. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 763-769.
26. Perera KRJ, Ketheesan B, Arudchelvam Y, Nirmalakhandan N. 2012. Fermentative biohydrogen production II: net energy gain form organic wastes. *Int. J. Hydrogen Energy* **37**: 167-178.
27. Rashid N, Rehman MSU, Memon S, Rahman ZU, Lee K, Han J. 2013. Current status, barriers and developments in biohydrogen production by microalgae. *Renew. Sust. Energy Rev.* **22**: 571-579.
28. Singh A, Sharma P, Saran AK, Singh N, Bishnoi NR. 2013. Comparative study on ethanol production from pretreated sugarcane bagasse using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* on various matrices. *Renew. Energy* **50**: 488-493.
29. Song SH, Choi SS, Park K, Yoo YJ. 2005. Novel hybrid immobilization of microorganisms and its applications to biological denitrification. *Enzyme Microb. Technol.* **37**: 567-573.
30. Stiebritz MT, Reiher M. 2012. Hydrogenases and oxygen. *Chem. Sci.* **3**: 1739-1751.
31. Takai K, Horikoshi K. 2000. Rapid detection and quantification of members of the archaeal community by quantitative PCR using fluorogenic probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 5066-5072.
32. Wang X, Monis PT, Saint CP, Jin B. 2009. Biochemical kinetics of fermentative hydrogen production by *Clostridium butyricum* W5. *Int. J. Hydrogen Energy* **34**: 791-798.
33. Watanabe K, Kodama Y, Hrayama S. 2001. Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting. *J. Microbiol. Meth.* **44**: 253-262.
34. Westman JO, Ylitervo P, Franzén CJ, Taherzadeh MJ. 2012. Effects of encapsulation of microorganisms on product formation during microbial fermentations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **96**: 1441-1454.
35. Wicher E, Seifert K, Zagrodnik R, Pietrzyk B, Laniecki M. 2013. Hydrogen gas production from distillery wastewater by dark fermentation. *Int. J. Hydrogen Energy* **38**: 7767-7773.
36. Willquist K, Van Niel EWJ. 2012. Growth and hydrogen production characteristics of *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* on chemically defined minimal media. *Int. J. Hydrogen Energy* **37**: 4925-4929.
37. Wu KJ, Chang JS. 2007. Batch and continuous fermentative production of hydrogen with anaerobic sludge entrapped in a composite polymeric matrix. *Process Biochem.* **42**: 279-284.

38. Zahedi S, Sales D, Romero LI, Solera R. 2013. Hydrogen production from the organic fraction of municipal solid waste in anaerobic thermophilic acidogenesis: influence of organic loading rate and microbial content of the solid waste. *Bioresour. Technol.* **129**: 85-91.
39. Zajkoska P, Rebroš M, Rosenberg M. 2013. Biocatalysis with immobilized *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**: 1441-1455.
40. Zhao L, Cao GL, Wang AJ, Guo WQ, Liu BF, Ren HY, *et al.* 2012. Enhanced bio-hydrogen production by immobilized *Clostridium* sp. T2 on a new biological carrier. *Int. J. Hydrogen Energy* **37**: 162-166.

http://dx.doi.org/10.4014/kjmb.1311.11008