



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0082779
(43) 공개일자 2009년07월31일

(51) Int. Cl.

C12P 7/18 (2006.01) C12P 7/02 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0008725

(22) 출원일자 2008년01월28일

심사청구일자 2008년01월28일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자

이관영

서울시 영등포구 여의도동 55-1번지 대우트럼프월드 A동 2104호

김의용

서울시 강남구 대치동 은마아파트 6동 1204호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이문섭

전체 청구항 수 : 총 12 항

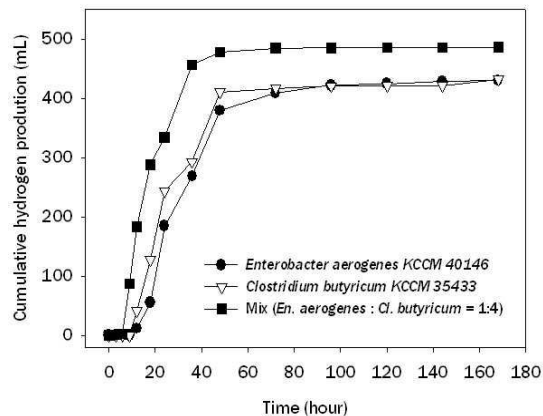
(54) 혐기성 혼합 균주의 단계적 배양을 이용한 수소가스생산방법

(57) 요약

본 발명은 혐기성 혼합 균주의 단계적 배양을 이용한 수소가스 생산방법에 관한 것으로, 구체적으로 수소생성능이 있는 혐기성 혼합 균주 중 비우점종을 먼저 배지를 포함하는 반응기에 접종하고, 이와 동시 또는 일정시간 경과 후에 우점종 균주를 접종하여 혼합배양 하는 것을 특징으로 하는 수소가스 생산방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 상기 균주들은 단독배양을 통한 수소생산 효율에서 완벽한 혐기적 조건 조성이 어렵기 때문에, 수소 생산에 더 효율적인 클로스트리디움의 높은 성장을 유도하기 위하여 두 균주의 혼합배양을 하였다. 또한 혼합배양에 이용될 수 있는 수소생산용 배지의 최적화 방법을 연구하였으며, 나아가 그람 염색법을 통하여 혼합배양 중의 우점종 균주를 확인하고, 비우점종 균주와 우점종 균주의 담체를 이용한 단계적 접종 및 배양을 통하여 수소생산 효율을 향상시킬 수 있음을 확인하였다.

대표도 - 도10



(72) 발명자

김규호

서울시 양천구 신정3동 1192-1 정은아파트3차 120
4호

최영진

서울시 강서구 화곡3동 초록아파트 108동 410호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 R0700321

부처명 서울시

연구사업명 전략산업 혁신 클러스터 육성 지원사업

연구과제명 고밀도 지역의 주거및 상업용 신재생에너지 기술 개발

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2005년 12월 01일 ~ 2010년 11월 30일

특허청구의 범위

청구항 1

수소생성능이 있는 절대 혐기성 균주를 먼저 배지를 포함하는 반응기에 접종하여 배양하고, 일정시간 경과 후 수소생성능이 있는 통성 혐기성 균주를 상기 반응기에 접종하여 혼합배양하는 것을 포함하는 수소가스 생산방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 절대 혐기성 균주는 두 균주의 동시배양시 비우점종이고, 통성 혐기성 균주는 두 균주의 동시배양시 우점종인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 배지를 포함하는 반응기는 균주들의 고정화를 위한 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 담체의 재질은 폴리비닐알코올(polyvinyl alcohol)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 절대 혐기성 균주는 클로스트리디움 부티리쿰(*Clostridium butyricum*)이고, 통성 혐기성 균주는 엔테로박터 에어로제네스(*Enterobacter aerogenes*)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 클로스트리디움 부티리쿰에 대한 엔테로박터 에어로제네스의 균수 접종비율은 0.1 내지 10인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 배지는 탄소원 20-40 g/L, 질소원 1-10 g/L, K_2HPO_4 10-20 g/L, KH_2PO_4 1-10 g/L, $Na_3C_6H_5O_7S \cdot 2H_2O$ 0.1-2.0 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 0.5-3.0 g/L 및 미량원소(trace element)를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 탄소원은 글루코오스(glucose) 또는 수크로오스(sucrose), 질소원은 요소(urea), 맥아추출물(malt extract), 효모추출물(yeast extract), 펩톤(peptone), 트립톤(tryptone)으로 구성된 균으로부터 선택된 하나이상인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 1항에 있어서, 상기 일정시간은 12-36 시간인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 1항에 있어서, 상기 혼합균주의 배양은 pH 5-7, 온도 35-40℃, 및 100-200 rpm으로 수행하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

탄소원 20-40 g/L, 질소원 1-10 g/L, K_2HPO_4 10-20 g/L, KH_2PO_4 1-10 g/L, $Na_3C_6H_5O_7S \cdot 2H_2O$ 0.1-2.0 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 0.5-3.0 g/L 및 미량원소(trace element)를 포함하는 클로스트리디움 부티리쿰과 엔테로박터 에어로제네스의 혼합배양을 이용한 수소생산용 배지조성물.

청구항 12

제 11항에 있어서, 탄소원은 글루코오스(glucose) 또는 수크로오스(sucrose), 질소원은 요소(urea), 맥아추출물(malt extract), 효모추출물(yeast extract), 펩톤(peptone), 트립톤(tryptone)으로 구성된 균으로부터 선택된 하나이상인 것을 특징으로 하는 배지조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- <1> 본 발명은 수소생산능이 있는 통성 혐기성 균주와 절대 혐기성 균주를 배지를 포함하는 반응기에서 혼합배양하는 것을 포함하는 수소가스 생산방법에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 상기 통성 혐기성 균주를 먼저 배지를 포함하는 반응기에 접종하여 배양하고, 일정시간 경과 후 절대 혐기성 균주를 상기 반응기에 접종하여 배양하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- <2> 전 세계적으로 에너지 문제에 대한 관심도가 높아지면서 대체 에너지에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 그중에 미래 에너지로 크게 각광 받고 있는 수소 에너지는 고효율, 고부가가치, 환경 친화적이라는 장점을 지니고 있다. 본 발명에서는 혐기적 배양조건에서 수소를 생산하는 대표적인 미생물인 엔테로박터 에어로제네스(*Enterobacter aerogenes*)와 클로스트리디움 부티리쿰(*Clostridium butyricum*)을 대상으로 수소 생산능, 균주의 성장 패턴 및 수소생산을 위한 배지의 최적화 방법을 알아보았다. 이 균주들은 탄소를 기질로 수소와 유기산을 생성하며 온도, pH, 탄소원, 질소원 등이 영향 인자로 작용한다. 균주의 단독배양을 통한 수소생산 효율은 보통 통성 혐기성인 *Enterobacter aerogenes*보다 절대 혐기성인 *Clostridium butyricum*이 높은 것으로 알려져 있다. 하지만 완벽한 혐기적 조건을 만든다는 것이 어렵기 때문에, *Clostridium butyricum*의 우수한 수소생산능에도 불구하고 수소생산 수율은 높지 않았다. 본 발명은 *Clostridium butyricum*의 높은 성장을 유도하고, 상기 두 균주의 상호작용을 이용하기 위하여 두 균주의 혼합배양 방법을 연구하였다. 더불어 그람(Gram) 염색법을 통하여 혼합배양 중의 우점종 균주를 확인하고 이를 활용하여 담체를 이용한 단계적 균주 접종 및 배양을 통한 수소생산 효율을 알아보았다. 두 과정의 결과를 이용하여 혼합균주의 단계적 배양이 수소생산의 효율 증대에 영향을 끼치는지 여부에 대한 연구를 수행하였다.
- <3> 이에, 본 발명자들은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 연구노력한 결과, 수소생산능이 있는 두 균주를 혼합배양 또는 통성혐기성 균주와 절대혐기성 균주를 순차적으로 혼합배양하는 경우, 수소생산 효율을 향상시킬 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <4> 따라서, 본 발명의 주된 목적은 수소생산 효율을 향상시키기 위한 수소생산능이 있는 혐기성 균주들의 혼합배양 방법을 제공하는 데 있다.
- <5> 본 발명의 다른 목적은 상기 혐기성 균주들을 이용한 수소생산용 혼합배지를 제공하는데 있다.

과제 해결수단

- <6> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 수소생산능이 있는 절대 혐기성 균주를 먼저 배지를 포함하는 반응기에 접종하여 배양하고, 일정시간 경과 후 수소생산능이 있는 통성 혐기성 균주를 상기 반응기에 접종하여 혼합배양하는 것을 포함하는 수소가스 생산방법을 제공한다.
- <7> 본 발명의 수소가스 생산방법에서, 상기 절대 혐기성 균주는 두 균주의 동시배양시 비우점종이고, 통성 혐기성 균주는 두 균주의 동시배양시 우점종인 것이 바람직하다.
- <8> 본 발명에서, 상기 우점종은 동시배양시 그람(Gram) 염색법에 의해 확인한 결과 상대적으로 성장률이 더 높게 나타난 균주를 의미하고, 반대로 비우점종은 상대적으로 성장률이 더 낮은 균주를 의미한다. 본 발명의 실시예

에서는, 두 균주를 동시배양하여 그람염색하게 되면, 보라색으로 나타나는 그람(+) 균주와 붉은색으로 나타나는 그람(-) 균주가 혼합배양이 진행됨에 따라 붉은색의 그람(-) 균주의 성장이 우세하여 전체적인 색변화가 붉은색으로 나타남을 확인하고, 붉은색을 우점종, 보라색을 비우점종으로 판단하였다(도 15 참조).

- <9> 본 발명에서, 상기 “절대 혐기성 균주”는 성장 조건에서 산소가 존재하면 생육이 억제되거나 사멸되는 균주를 말하는 것으로, 산소가 있는 환경에서는 살 수 없는 미생물을 의미한다. 또한 상기 “통성 혐기성 균주”는 성장 조건에서 산소의 유무에 상관없이 생육할 수 있는 균주를 의미한다.
- <10> 본 발명에서, 우선 단독 배양을 통하여 각 균주의 수소 생산능을 알아보았다. 일반적으로 절대 혐기성인 *Clostridium butyricum*이 수소 생산능에서 우수하다는 것은 이미 알려진 사실이다. 하지만 실제 배양 공정에서는 공정이 진행됨에 따라 소량의 산소가 유입될 수 도 있기 때문에, 이러한 혐기적 조건을 전부 만족시키는 것이 어려운 문제여서, *Clostridium butyricum*을 단독 배양한 경우 수소 생산능은 이론적 값보다 낮아질 수밖에 없다. 또한 혼합 배양을 통한 공정에서도 두 균주의 성장 패턴에서 우점종을 차지하고 있는 한 균주 (*Enterobacter aerogenes*)에 의하여 반응기 내의 반응이 일어났다.
- <11> 본 발명에서는 수소 생산에 효율적이면서도 비우점종인 *Clostridium butyricum*의 성장을 유도함으로써 좀더 높은 수소 생산 수율을 얻고자 하였다. 이를 위하여 담체를 이용한 *Clostridium butyricum*의 선 접종 및 배양을 통하여 충분히 균주가 자랄 수 있는 환경을 만들어 주었고, 단계적으로 통성혐기성인 *Enterobacter aerogenes*를 일정시간 후에 접종, 배양함으로써 반응기 내에 존재 또는 유입 가능성이 있는 소량의 산소를 소모시키게 하여, 결과적으로 *Clostridium butyricum*은 절대 혐기성 조건, *Enterobacter aerogenes*는 우점종의 효과를 일으켜, 실제 수소생산 공정에서도 두 균주 간의 상호작용을 유도할 수 있으며, 좀 더 높은 수소 생산 수율을 얻을 수 있음을 확인하였다.
- <12> 본 발명에서, 일반적으로는 통성혐기성 균주를 우선배양한 후 절대혐기성 균주를 배양하게 되면 통성혐기성 균주의 배양에 의해 혐기성 조건이 유지될 수 있어 절대 혐기성 균주의 생육에 기여할 것으로 예측되나, 본 발명자들은 상기 두 균주간의 관계가 우점관계가 분명하기 때문에 통성혐기성인 *Enterobacter aerogenes*를 선배양한 후 절대혐기성인 *Clostridium butyricum*를 배양하게 되면, 오히려 비우점종인 *Clostridium butyricum*의 성장이 제한될 수 있다는 점을 밝혀냈다. 따라서 본 발명에서는 두 혼합균주의 우점관계를 그람 염색법을 통하여 먼저 우점균주를 선별한 후, 비우점종(*Clostridium butyricum*)을 먼저 접종하고 비우점종이 충분히 자랄 수 있는 시간이 지난 후에 우점종을 접종함으로써 두 균주의 상호작용을 유도할 수 있었다.
- <13> 본 발명의 수소가스 생산방법에서, 상기 배지를 포함하는 반응기는 균주들의 고정화를 위한 담체를 포함하는 것이 바람직하다.
- <14> 본 발명에 있어서, 상기 담체의 재질은 수소생산에 이용되는 균주들을 고정화하기 위한 것으로 나무재질, 금속재질, 화학합성재질 등 균체가 부착하여 성장할 수 있다면 그 재질은 특별히 한정되지 않으나, 바람직하게는 폴리비닐알코올(polyvinyl alcohol)이며, 균체의 성장 특성을 고려하여 적절한 것을 선택하여 사용할 수 있다.
- <15> 본 발명의 수소가스 생산방법에서, 상기 절대 혐기성 균주는 수소생산능이 있는 클로스트리디움 종(*Clostridium sp.*), 통성혐기성 균주는 엔테로박터 에어로제네스(*Enterobacter aerogenes*), 엔테로박터 클로아카에(*Enterobacter cloacae*), 시트로박터 종(*Citrobacter sp.*), 클라미도모나스 라인하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*)을 이용할 수 있으나, 바람직하게는 절대 혐기성 균주는 클로스트리디움 부티리쿰(*Clostridium butyricum*)이고, 통성 혐기성 균주는 엔테로박터 에어로제네스(*Enterobacter aerogenes*)가 적당하다. 본 발명의 방법을 이용하여 상기 균주들 이외에도 수소생산능이 있는 절대 혐기성 균주와 통성 혐기성 균주를 혼합 배양함으로써 그 시너지 효과를 기대할 수 있으며, 이 때 두 균주의 우점관계를 밝힌 후 비우점종을 먼저 배양한다면 더 높은 시너지 효과를 기대할 수 있다. 본 발명에서는, 상기 수소생산능이 있는 것으로 알려져 있는 대표적인 두 균주를 이용하여 본 발명에서는 혼합배양을 통하여 수소생산 효율을 증대할 수 있는 방법을 모색하고자 하였다. 본 발명의 실시예에서는 상기 균주들의 혼합배양, 특히 단계적 혼합배양을 통하여 수소생산 효율을 향상시킬 수 있음을 확인하였다.
- <16> 본 발명에 있어서, 상기 클로스트리디움 부티리쿰에 대한 엔테로박터 에어로제네스의 균수 접종비율은 0.1 내지 10인 것이 바람직하다. 본 발명에서는, 상기 두 균주가 각각 절대 혐기성과 통성 혐기성의 특성을 가지므로, 절대 혐기성 균주를 충분히 배양시킨 후 통성 혐기성 균주를 배양시키면, 비우점종인 절대 혐기성 균주가 충분히 자란 후에 우점종인 통성 혐기성 균주가 생육함에 따라 반응기 내로 유입되는 소량의 산소를 소모시켜 혐기성 조건을 유지시키는데 도움이 되고, 이에 두 균주의 성장 및 수소생산 효율이 증가하게 됨을 확인하였다. 따라서

두 균주는 접종량은 상기 접종비율이라면 단독배양보다 시너지 효과를 기대할 수 있으며, 더 높은 수소생성량 증대를 위해서는 수소 생성능이 더 우수한 클로스트리디움 부티리쿰의 접종량을 많게 하는 것이 좋으므로 두 균주의 접종비율을 0.1 내지 1로 하는 것이 더욱 바람직하다.

<17> 본 발명의 수소가스 생산방법에서, 상기 배지는 탄소원 20-40 g/L, 질소원 1-10 g/L, K_2HPO_4 10-20 g/L, KH_2PO_4 1-10 g/L, $Na_3C_6H_5O_7S \cdot 2H_2O$ 0.1-2.0 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 0.5-3.0 g/L 및 미량원소(trace element)를 포함하는 것이 바람직하다. 상기 용어 “배지”는 특별한 언급이 없는 한, 두 균주를 혼합하여 배양하기 위한 수소생산용 배지를 말하는 것으로, 본 명세서에서는 “혼합배지”와 혼용하여 사용하였다.

<18> 본 발명에서, 상기 미량원소(trace element)는 미생물이 정상적으로 성장하는 데는 종류에 따라 차이가 있으나 반드시 필수불가결한 원소를 말하는 것으로, 본 발명에서는 $NaCl$ 0.1 g, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.1g, $MnSO_4 \cdot 6H_2O$ 0.015g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.025g, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.005g, $CoCl_2 \cdot 5H_2O$ 1.25×10^{-4} g를 포함하는 trace element solution을 사용하였다.

<19> 본 발명에 있어서, 상기 탄소원은 글루코오스(glucose) 또는 수크로오스(sucrose), 질소원은 요소(urea), 맥아 추출물(malt extract), 효모추출물(yeast extract), 펩톤(peptone), 트립톤(tryptone)으로 구성된 균으로부터 선택된 하나이상인 것이 바람직하다. 본 발명의 실시예에서는 상기 질소원의 영향에서 peptone, tryptone에서 효율이 좋았으며, 질소원을 사용하지 않은 배지(no add)에서는 수소 생산이 거의 없는 것으로 나타나, 질소원이 균주의 성장에 중요한 영향을 미치는 것을 알 수 있었다(도 6참조).

<20> 본 발명의 수소가스 생산방법에서, 상기 단계적 배양에서의 일정시간은 먼저 접종한 비우점종인 절대혐기성 균주가 충분히 성장할 수 있는 어떤 시간도 가능하나, 바람직하게는 12-36시간, 더욱 바람직하게는 20-28시간인 것을 특징으로 한다.

<21> 본 발명의 수소가스 생산방법에서, 상기 혼합균주의 배양은 pH 5-7, 온도 35-40℃, 및 100-200 rpm으로 수행하는 것이 바람직하다. 상기 배양조건은 본 발명의 실시예에서와 같이, 각 균주의 단독배양 시 사용되는 배양조건을 토대로 설정한 것이며, 일반적인 혐기성 균주의 배양조건인 인큐베이터(37℃, 160 rpm)에서 혐기, 암반응 조건에서의 배양을 포함한다.

<22> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 탄소원 20-40 g/L, 질소원 1-10 g/L, K_2HPO_4 10-20 g/L, KH_2PO_4 1-10 g/L, $Na_3C_6H_5O_7S \cdot 2H_2O$ 0.1-2.0 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 0.5-3.0 g/L 및 미량원소(trace element)를 포함하는 클로스트리디움 부티리쿰과 엔테로박터 에어로제네스의 혼합배양을 이용한 수소생산용 배지조성물을 제공한다.

<23> 본 발명의 수소생산용 배지조성물에서, 탄소원은 글루코오스(glucose) 또는 수크로오스(sucrose), 질소원은 요소(urea), 맥아추출물(malt extract), 효모추출물(yeast extract), 펩톤(peptone), 트립톤(tryptone)으로 구성된 균으로부터 선택된 하나이상인 것이 바람직하다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<24> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

<25> 실시예 1. 혼합 균주 및 배양배지의 준비

<26> 본 발명에 사용된 균주는 탄소원을 주영양분으로 하여 혐기성 조건에서 암발효를 통해 수소와 부산물인 유기산(Organic Acid), CO_2 를 생산하는 미생물이다. 통성 혐기성인 엔테로박터 에어로제네스(*Enterobacter aerogenes*) KCCM 40146과 절대 혐기성인 클로스트리디움 부티리쿰(*Clostridium butyricum*) KCCM 35433이며, 한국미생물보존센터에서 균주 분양하여 제공받았다. 균주의 보관은 활성배양체(agar-plate) 상태로 4℃에서 냉장보관 하였다.

<27> 본 발명에는 Medium No.2, Medium No.71, 혼합배지를 사용하였다. Medium No.2 배지는 *Enterobacter aerogenes* 종균배양 배지이며 조성은 다음과 같다: beef extract 3g, peptone 5g, D.W 1ℓ, pH 7.0, Temp. 37℃. Medium No.71 배지는 *Clostridium butyricum* 종균배양 배지이며 조성은 다음과 같다: yeast extract 3g, beef extract 10g, peptone 10g, soluble starch 10g, glucose 5g, cysteine hydrochloride 0.5g, NaCl 5g, sodium acetate 3g, D.W 1ℓ, pH 6.80, Temp. 37℃. 혼합배지의 조성은 다음과 같다: glucose 30g, peptone 5g,

K_2HPO_4 14g, KH_2PO_4 6 g, $Na_3C_6H_5O_7S \cdot 2H_2O$ 1g, $(NH_4)_2SO_4$ 2g, trace element solution ($NaCl$ 0.1 g, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.1g, $MnSO_4 \cdot 6H_2O$ 0.015g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.025g, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.005g, $CoCl_2 \cdot 5H_2O$ 1.25×10^{-4} g), D.W 1ℓ, pH 6.7, Temp. 37 °C.

<28> 배지의 초기 pH를 설정하기 위하여 potassium phosphate buffer를 사용하였다. D.W 대신 혼합배지에 사용되는 KH_2PO_4 와 K_2HPO_4 을 각 0.3M, 0.5M, 1.0M의 용액으로 만들어 혼합하여 초기 pH를 설정한 buffer 용액 1ℓ를 사용하였다. 완충 역할로서 초기의 안정된 pH를 유지하였다.

<29> **실시예 2. 수소생산 배지의 최적화를 위한 혼합배양 방법**

<30> 활성배양체(agar-plate) 상태의 균주는 loop를 이용하여 먼저 Medium No.2, Medium No.71 배지 100 ml에 소량(colony) 접종하고 인큐베이터(JISICO shaking incubator, 37 °C, 160 rpm)에서 2일간 배양한다. 균주의 상태를 최적화하기 위하여 3~4회 반복 배양하였으며, 사전 적응(pre-conditioning)이 된 상태에서 혼합배지에 접종하였다. 혼합배지에 접종할 때에는 glove box(N_2 gas) 내에서 실행하였으며, 종균배양 배지에서 충분히 영양분을 섭취한 균주를 syringe를 이용하여 1ml (1% v/v)을 혼합배지에 접종한다. 혼합배양의 경우 *En. aerogenes* : *Cl. butyricum* = 1 : 4의 비율로 배지에 접종하였다(Mix). 총 배지의 양은 100 ml이고 initial head space는 60 ml이다. head space는 분석에서 sampling으로 인한 serum bottle 내의 head space의 변화를 감안한 것으로 변화된 부피에 대한 총 발생 gas량과 gas중의 H_2 의 비율에 있어 매우 중요하다.

<31> 접종 직 후, bottle 내에 증가된 배지의 양으로 인한 압력을 제거하기 위하여 syringe를 이용하여 serum bottle 내를 대기압 상태로 만들어주었다. 배양은 인큐베이터(37 °C, 160 rpm)에서 혐기, 암반응 조건에서 배양하였다.

<32> **실시예 3. 혼합배지의 최적화**

<33> 수소생산 배지의 최적화를 위하여 몇 가지 인자를 변화하여 실험을 수행하였다. 먼저 미생물의 성장에 있어서 가장 큰 영향을 미치는 요소인 pH의 비교를 위하여 potassium phosphate buffer를 이용한 초기 배지의 pH를 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0으로 설정하고, 대조군으로 buffer를 사용하지 않은 배지와 비교 실험하였다(도 1). 또한 buffer의 농도를 0.3M, 0.5M, 1.0M으로 하여 효율적인 buffer의 사용을 실험하였다(도 2). 탄소원의 비교를 위하여 글루코오스(glucose)와 수크로오스(sucrose)를 사용하였고, lag time을 비교하였다(도 3, 4). 탄소원의 잔여량에 따른 비교를 위하여 탄소원의 양을 20g, 25g, 30g으로 비교 실험하였다(도 5). 질소원의 비교를 위하여 urea, malt extract, yeast extract, peptone, tryptone을 각각 5g 씩 넣어 여러 가지 질소원 조건에서 비교하였다(도 6). 환원제로 L-cysteine 사용하여 영향을 알아보고 유기산의 생성 및 소비 패턴을 분석하였다(도 7).

<34> 도 1과 2는, Buffer를 사용한 초기 pH 설정 배지와 buffer의 농도에 따른 배지에서 *Enterobacter aerogenes*의 비성장속도(μ)와 수소의 비생산속도(qp)를 나타낸 그래프이다. 도면에서 볼 수 있듯이, Initial pH 6.5, buffer conc. 0.5 M 배지에서 효율이 가장 높았으며, Buffer를 사용하지 않은 배지에서는 pH가 급감하면서 초기 균주의 성장이 높았다가 급감하였다. 1.0M의 buffer 농도에서는 pH가 적정 범위에 들어서지 못한 채 균주의 성장이 이루어지지 않았다. Buffer의 농도가 다를 때 비성장속도는 비슷한 값(3.85 ~ 4.47)은 비슷하지만 수소의 비생산속도 값(10.80 ~ 17.80)은 차이를 보였다. 균주의 성장이 높다고 해서 수소의 생산 또한 증가하는 것은 아니다. 즉, 수소생산 배지 환경이 최적화일 때 균주 성장 및 수소 생산이 극대화 된다.

<35> 도 3과 4에서와 같이, Lag time과 최대 수소 생산속도는 glucose의 경우 20h, 215.3 ml/ℓ/h이며, sucrose의 경우 36h, 98.3 ml/ℓ/h로 나타냈으며, 총 수소 생산량에서는 glucose의 경우 431 ml, sucrose의 경우 427 ml이었다. 도 5에서, 탄소원의 양에서는 20, 25 g/L 에서 잔여 탄소원의 양으로 보아 거의 소비를 하였으며 30g 이상의 경우에는 균주가 그 이상의 탄소원을 소비하지 못하였다.

<36> 도 6에서, 질소원의 영향에서 peptone, tryptone에서 효율이 좋았으며, 질소원을 사용하지 않은 배지(no add)에서는 수소 생산이 거의 없는 것으로 보아 질소원이 균주의 성장에 영향을 미치는 것을 알 수 있다. 또한 환원제를 사용하였을 경우에는 첨가량에 비례하여 균주의 성장이 저조하였고(도 7), 유기산의 생성·소비 패턴에서는 초기 pH 6.5 설정 배지에서 아세트산(acetic acid)의 양이 많았으며(도 8), 이는 배지의 산성화와 연관되어 수소 생산능을 저하시킨다(도 9).

<37> 따라서, *Enterobacter aerogenes*, *Clostridium butyricum*, 혼합균주(Mix)의 최적 배지 조건은 initial pH 6.5, potassium phosphate buffer conc. 0.5M, glucose 30g/ℓ, peptone 5g/ℓ이다. 단위 glucose당 수소생산 mol수

는 *Enterobacter aerogenes* 1.058, *Clostridium butyricum* 1.061, 혼합균주(Mix) 1.194이며, 배지에 다량의 영양분을 첨가하거나 반응기의 크기를 크게 하여 압력에 대한 저항을 적게 하면 그 수치(H_2 mol/mol glucose)를 더 높일 수 있다.

<38> **실시예 4. 최적화 배지에서 혼합배양에 의한 수소생산량 변화**

<39> 상기 최적화 배지에서 혼합배양 접종 후 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36, 48, 72, 96, 120, 144 및 168시간 경과된 시점에서 syringe를 이용하여 gas(1 ml), liquid(1 ml) sampling하였다. 총 gas 생산량은 syringe를 serum bottle에 꽂아서 head space의 증가량을 기록하였다. 수소생산량(H_2)은 GC(Gas Chromatography, Young-Lin M600D, SUPELCO Carboxen 1000 column, TCD detector)로 분석하였다. 생산된 gas 중에 정확한 H_2 생산량 분석을 위하여, 표준 gas(H_2 조성 비율 5%, 10%, 20%, 44%)를 사용하여 교정(calibration)하였다. 균체량(cell mass)은 UV(Ultraviolet Spectroscopy, Varian Cary 50UV-vis, 10 mm Quartz cell)로 원시료의 10배 희석하여 660nm에서 측정하고 건조중량법을 이용하여 그 양을 산출하였다. 잔여 당량분석은 UV로 glucose의 경우 DNS법에 의하여 546 nm 에서 측정하였고, sucrose의 경우 페놀-황산법에 의하여 490 nm에서 측정하였다.

<40> 도 10, 11, 12는 potassium phosphate buffer 0.5M, initial pH 6.5, glucose 30g/l, peptone 5g/l 배지에서 *Enterobacter aerogenes*, *Clostridium butyricum*, 혼합 균주(Mix)를 배양하여 얻은 결과이다. pH가 5.0 ~ 5.5 범위에서 균주의 성장과 수소 생산이 동시에 이루어진다. 단독 배양일 때보다 혼합균주의 배양 때에 수소 생산능과 최대 수소 생산 속도가 높았다. 이는 두 균주 간의 상호작용으로 인한 결과로 판단된다.

<41> **실시예 5. 수소생산 효율 증대를 위한 단계적 혼합배양**

<42> 단계적 혼합배양에는 상기 실시예 1에서 준비된 두 균주, 혼합배지 및 배양조건을 이용하였다.

<43> **1) 분석방법**

<44> 반응기 내 head space에 생산된 gas의 부피는 syringe를 이용하여 측정하였다. 생산된 gas중 수소의 조성은 GC(Gas Chromatography, Young-Lin M600D, SUPELCO Carboxen 1000 column, TCD detector)를 이용하여 분석하였다. Cell mass는 UV(Ultraviolet Spectroscopy, Varian Cary 50 UV-vis, 10 mm Quartz cell)로 원 시료의 10배 희석하여 660 nm에서 측정하였으며 건조중량법을 이용하여 균주의 농도를 산출하였다. Glucose는 DNS법에 의하여 분석하였다.

<45> **2) 동시 접종 혼합배양**

<46> 수소 생산 배지에 두 균주를 농도비 1:1의 비율로 동시 접종하였다. 접종 후 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36, 48, 72, 96, 120, 144 및 168시간 경과된 시점에서 syringe를 이용하여 head space 중의 gas 1 ml과 배양액 1 ml을 시료 채취하였다. 분석기기를 이용하여 누적 수소 생산량, pH, cell mass, glucose의 변화량을 분석하였다.

<47> 두 균주를 농도비 1:1의 비율로 동시 접종하여 얻은 결과를 도 13에 나타내었다. 도 13에서, 누적 수소 생산량은 486 ml 이었으며 pH 5.0 ~ 6.0 범위에서 cell mass가 급증한다. 이에 따라 glucose의 양은 감소하며 최종적으로 glucose가 거의 소비되었음을 알 수 있다. 최종 cell mass는 0.7 g/L이며 수소 생산 수율은 1.42 mole H_2 /mole glucose이다.

<48> **3) 단계적 혼합배양을 위한 우점종 균주의 선별**

<49> 수소생산 배지에 두 균주를 혼합배양(1:1) 하였을 경우, 한 균주가 다른 균주에 비하여 크게 성장하는 우점종으로 나타났다. 일반적으로 박테리아는 Gram 염색법에 의하여 양성균(+)과 음성균(-)으로 구분할 수 있다. Gram 염색법에 필요한 시약을 표 1에 나타내었다.

<50> [표 1]. 시약 제조

Reagent	Method
staining	{crystal violet 2.0 g + ethanol 20 ml} + {ammonium oxalate 0.8 g + D.W. 80 ml}
coloring	iodine 1.0 g + KI 2.0 g + D.W. 300 ml
decolorant	ethanol 95 ml + D.W. 5 ml
counter staining	safranin 0.25 g + ethanol 10 ml + *D.W. 100 ml

<51>

<52> *distilled water

<53> 최종 염색된 표본을 증류수로 세척하였을 때에 crystal violet의 보라색이 나타나는 균주는 Gram 양성균(+)이며, safranin의 붉은 색이 나타나는 균주는 Gram 음성균(-)이다. Gram 염색법에서 색깔의 변화도 14에 나타내었다. 본 발명에 사용한 균주 가운데 *Enterobacter aerogenes*는 Gram 음성균(-)이고 *Clostridium butyricum*은 Gram 양성균(+)으로 알려져 있다. 상기 실시예의 혼합배양 과정에서 접종 후 6, 12, 18, 24 시간 경과된 시점의 시료를 일정량 채취하여 Gram 염색법을 통한 두 균주의 성장 패턴을 관찰하였다.

<54> 그 결과, 혼합 균주의 배양에서 접종 후 6, 12, 18, 24 시간 경과 된 시점에서의 균주 성장 패턴을 도 15에 나타내었다. 초기에는 두 균주가 비슷하게 성장하다가 점점 한 균주의 성장이 두드러지면서 24시간 경과 된 시점에서는 우점종을 확인할 수 있었다. Gram 염색법을 통한 결과에서 우점종은 *Enterobacter aerogenes*이다. 이는 단독 배양에서 수소 생산 효율이 높았던 *Clostridium butyricum*이 제대로 성장하지 못하여 결과적으로 수소 생산 효율이 떨어졌음을 알 수 있었다.

<55> 4) 담체를 이용한 단계적 배양을 통한 균주의 성장 패턴

<56> 실시예 5의 3)에 따라, 담체를 이용하여 비우점종 균주를 우선적으로 접종 및 배양시켰다. 담체의 재질은 PVA(polyvinyl alcohol)이며 총 배지량의 5% (w/V)로 반응기에 넣어서 사용하였다. 160 ml serum bottle에 배지 50 ml와 비우점종을 접종하고 접종 후 24 시간 경과된 시점에서 새로운 배지 50 ml와 우점종을 접종하였다. 배양을 통하여 단계적 접종 및 배양에 의한 수소 생산 효율의 증대를 알아보았다.

<57> 단계적 혼합배양의 결과, *Clostridium butyricum*은 단독 배양에서 상대적으로 수소 생산 효율이 높지만 혼합 배양에서는 비우점종으로 나타났다. 따라서 *Clostridium butyricum*의 성장을 유도하기 위하여, 담체에 우선적으로 단독 배양하고 24시간 경과 된 시점에서 *Enterobacter aerogenes*를 단계적으로 접종하여 얻은 결과를 도 16에 나타내었다. 도 16에서, 단계적으로 균주를 접종 하였을 경우에서 누적 수소 생산량은 506.8 ml이었으며 cell mass는 0.98 g/L로 두 균주를 동시 접종하였을 때 보다 높은 값을 나타내었다. 수소 생산 수율은 1.49 mole H_2 /mole glucose였다.

<58> 이상의 결과를 정리하면, 본 발명에서는 수소 생산능이 높은 *Clostridium butyricum*의 성장을 유도함으로써 좀 더 높은 수소 생산 수율을 얻고자 하였다. 이를 위하여 담체를 이용한 *Clostridium butyricum*의 선 접종 및 배양을 통하여 충분히 균주가 자랄 수 있는 환경을 만들어 주었고, 단계적으로 *Enterobacter aerogenes*를 접종함으로써 두 균주 간의 상호작용을 유도할 수 있었으며, 좀 더 높은 수소생산 수율을 나타낸다는 것을 알 수 있었다. 두 균주를 농도비 1:1의 비율로 동시 접종하여 실험하였을 경우에서, 누적수소 생산량은 486 ml, 수소 생산 수율은 1.42 mole H_2 /mole glucose이었으며, 담체를 이용하여 두 균주를 단계적으로 접종하여 실험하였을 경우에는 누적 수소 생산량은 506.8 ml, 수소생산 수율은 1.49 mole H_2 /mole glucose로써, 결과적으로 단독배양 보다는 동시 혼합배양, 동시 혼합배양보다는 단계적 혼합배양이 수소생산량 및 수소생산 수율이 높게 나타났다.

산업이용 가능성

<59> 이상 설명한 바와 같이, 수소 생산능이 높은 *Clostridium butyricum*의 효율적인 성장을 유도하여 좀 더 높은 수소 생산 수율을 얻고자 하였다. 이를 위해 담체를 이용한 *Clostridium butyricum*의 선 접종 및 배양을 통하여 충분히 균주가 자랄 수 있는 환경을 만들어 주었고, 일정시간 후 단계적으로 *Enterobacter aerogenes*를 접종함

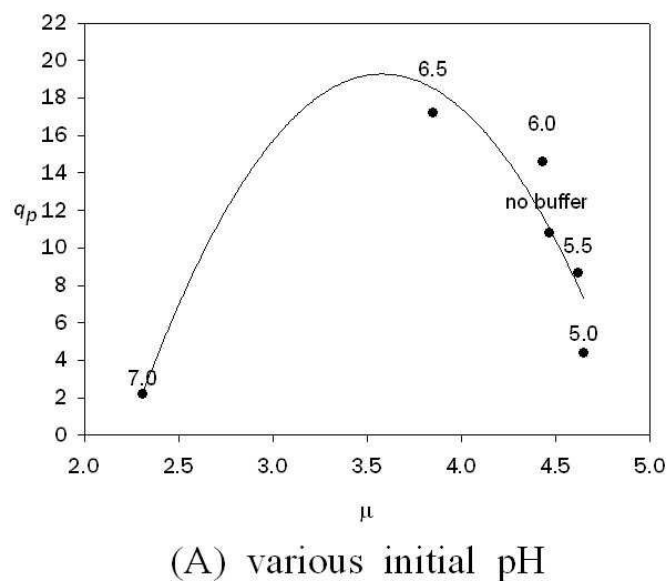
으로서 두 균주 간의 상호작용을 유도하였으며, 이러한 상호작용은 좀 더 높은 수소생산 수율을 나타낸다는 것을 확인하였다. 따라서 본 발명의 방법을 이용하면 수소생산 공정에서 생산효율성 향상을 이룰 수 있으며, 나아가 해당 산업의 발전에 기여할 것으로 판단된다.

도면의 간단한 설명

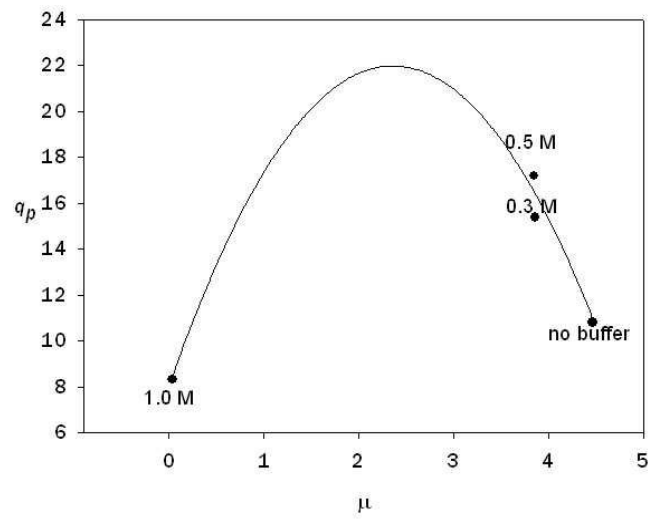
- <60> 도 1과 2는 buffer를 사용한 초기 pH 설정 배지와 buffer의 농도에 따른 배지에서 *Enterobacter aerogenes*의 비성장속도(μ)와 수소의 비생산속도(q_p)를 나타낸 그래프이다.
- <61> 도 3은 글루코오스와 수크로오스 배지에서 *Enterobacter aerogenes*의 수소생산 속도를 나타낸다.
- <62> 도 4는 글루코오스 배지에서 *Enterobacter aerogenes*의 누적 수소생산량을 나타낸다.
- <63> 도 5는 글루코오스 배지에서 *Enterobacter aerogenes*의 잔여 탄소원 양을 나타낸다.
- <64> 도 6은 다양한 질소원에서 *Enterobacter aerogenes*의 누적 수소생산량을 나타낸다.
- <65> 도 7은 배양과정에서 환원제(L-cystein)의 효과를 나타낸다.
- <66> 도 8과 9는 수소생산 공정에서 생산된 유기산의 생성·소비 패턴 및 전체 생산된 유기산을 나타낸다.
- <67> 도 10은 배지에서 각 균주들의 단독배양 및 혼합배양에 의한 누적 수소생산량을 나타낸다.
- <68> 도 11은 배지에서 각 균주들의 단독배양 및 혼합배양에 의한 수소생산 속도를 나타낸다.
- <69> 도 12는 배지에서 각 균주들의 단독배양 및 혼합배양에 의한 pH 변화를 나타낸다.
- <70> 도 13은 수소생산 배지에 두 균주를 농도비 1:1의 비율로 동시 접종한 결과이다.
- <71> 도 14는 그람 염색법을 설명하는 개념도이다.
- <72> 도 15는 혼합 균주의 배양에서 접종 후 6, 12, 18, 24 시간 경과 된 시점에서의 균주 성장 패턴을 나타낸다.
- <73> 도 16은 수소생산 배지에 *Clostridium butyricum*과 *Enterobacter aerogenes*를 단계적으로 접종하여 혼합배양한 결과를 나타낸다.

도면

도면1

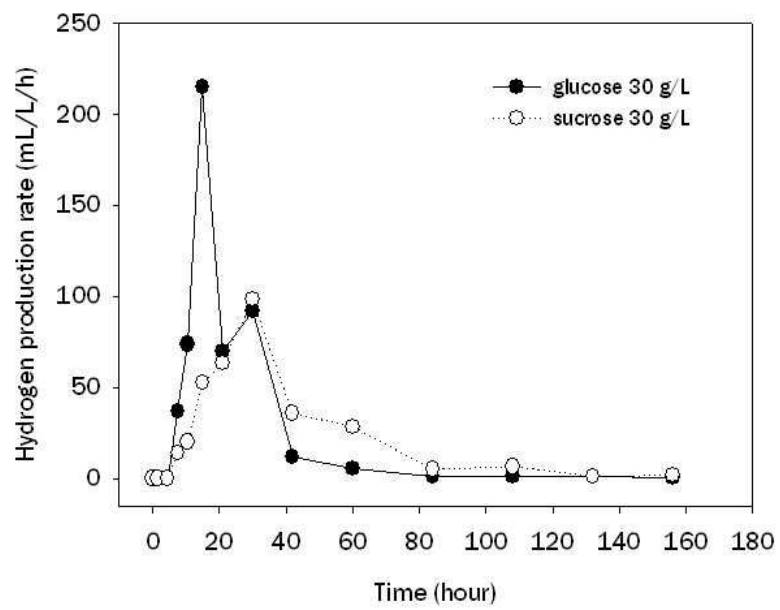


도면2

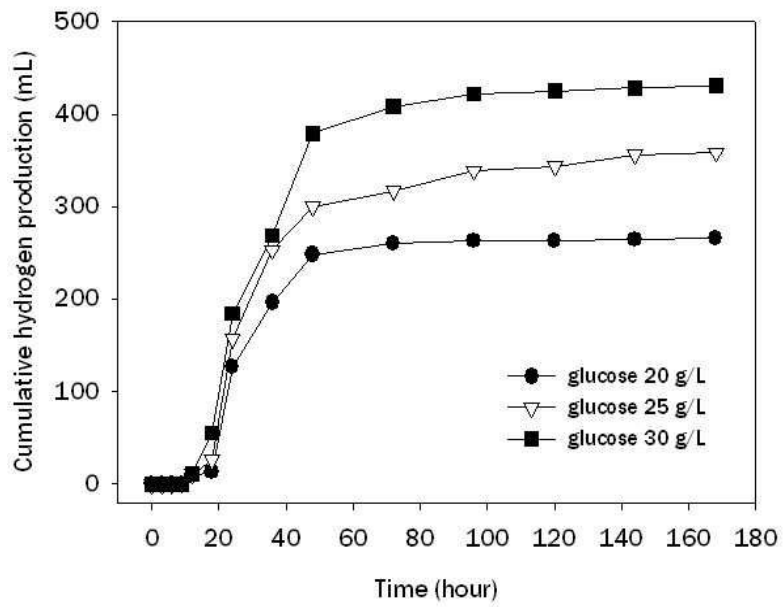


(B) various buffer concentration

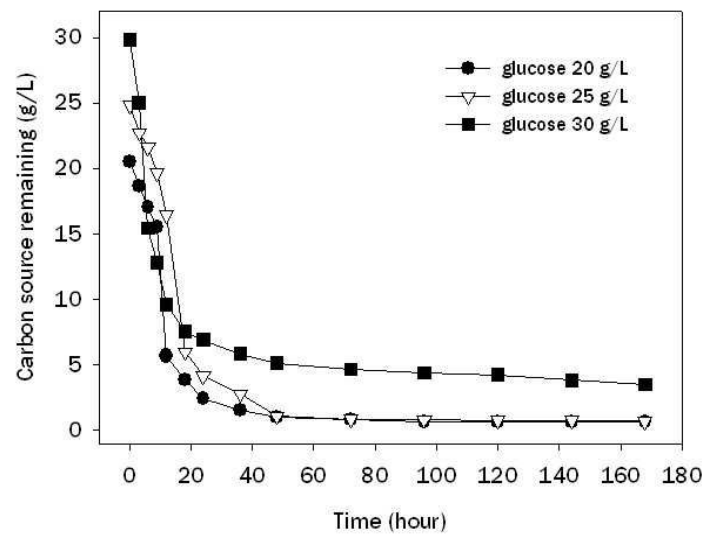
도면3



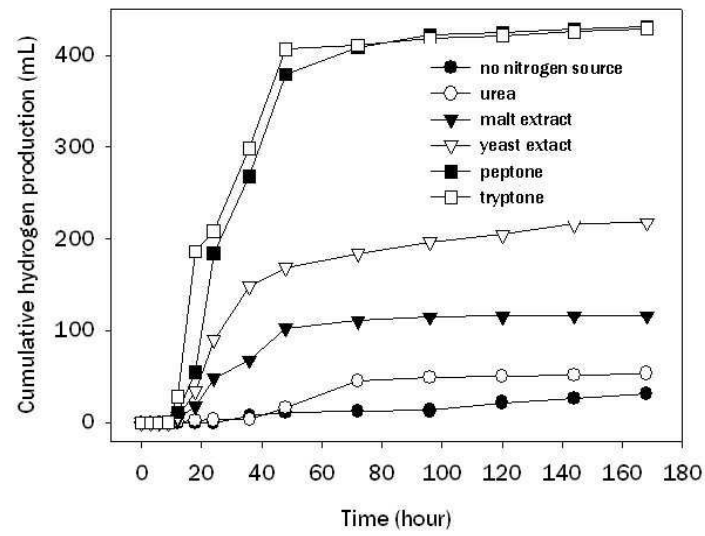
도면4



도면5

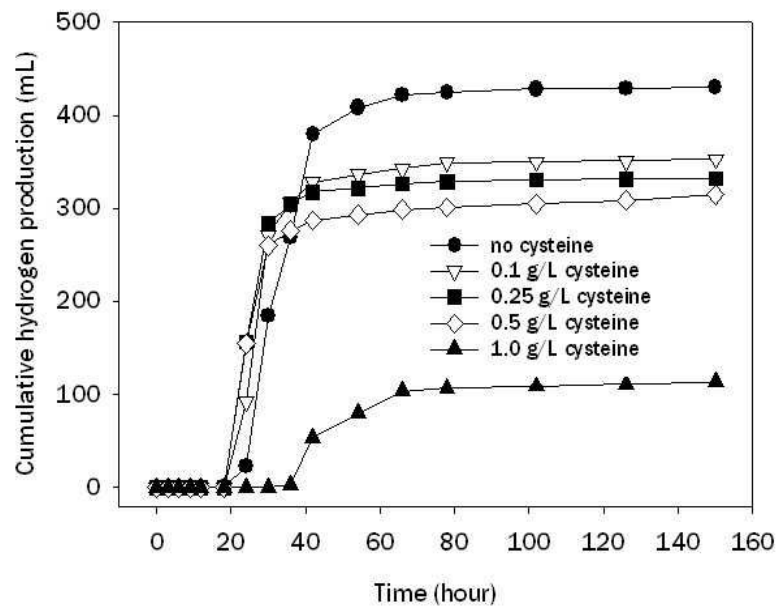


도면6

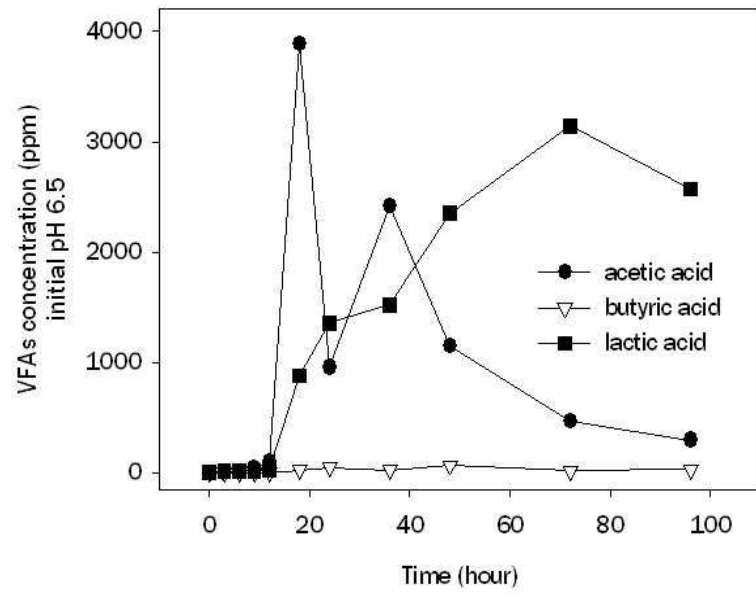


(C) various nitrogen source

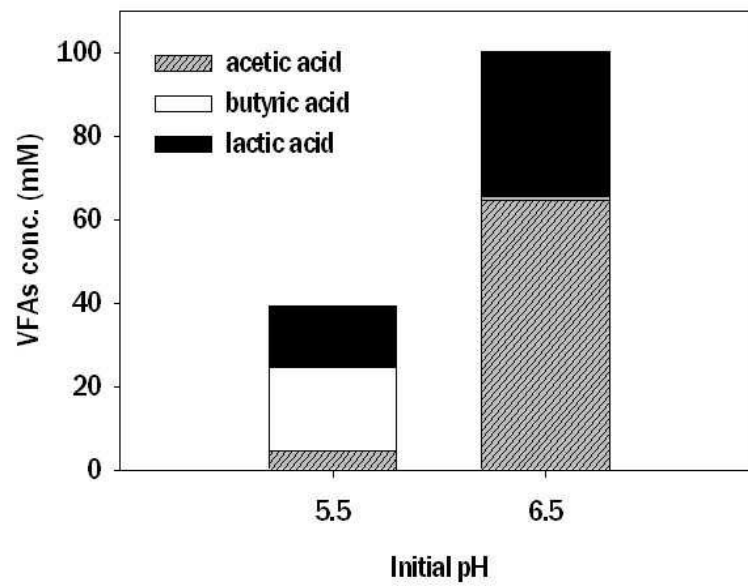
도면7



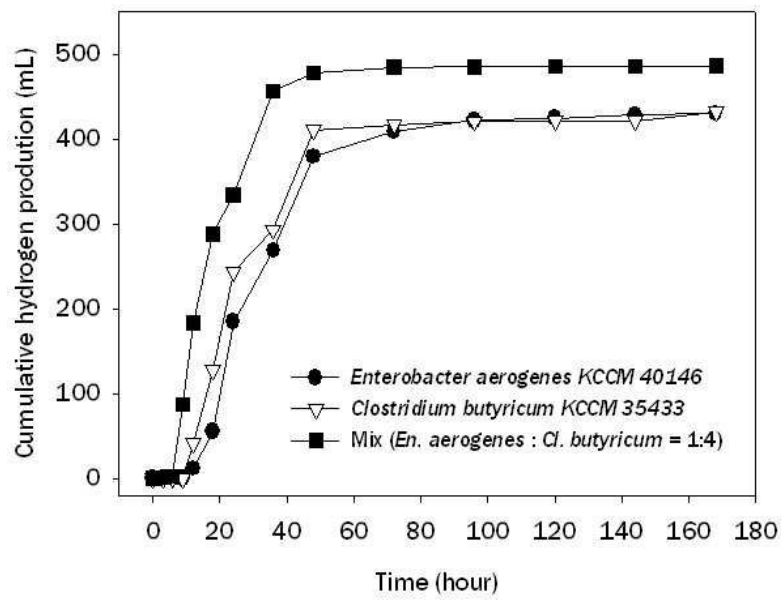
도면8



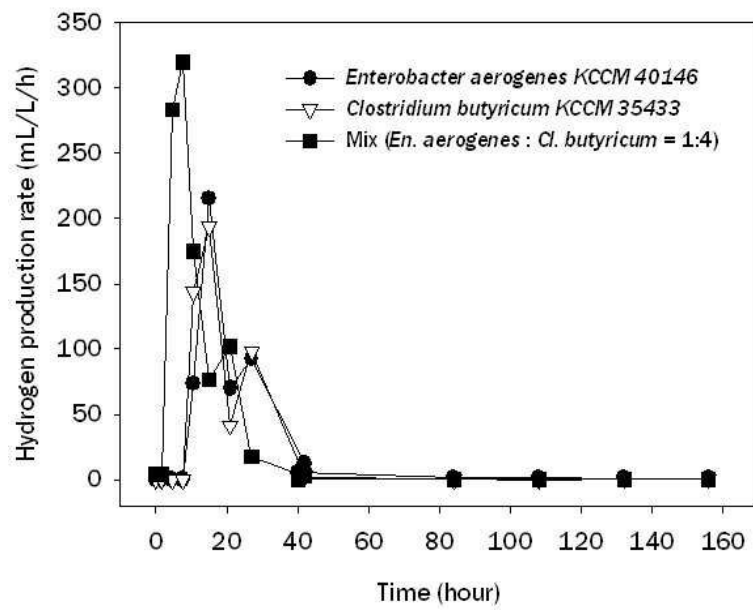
도면9



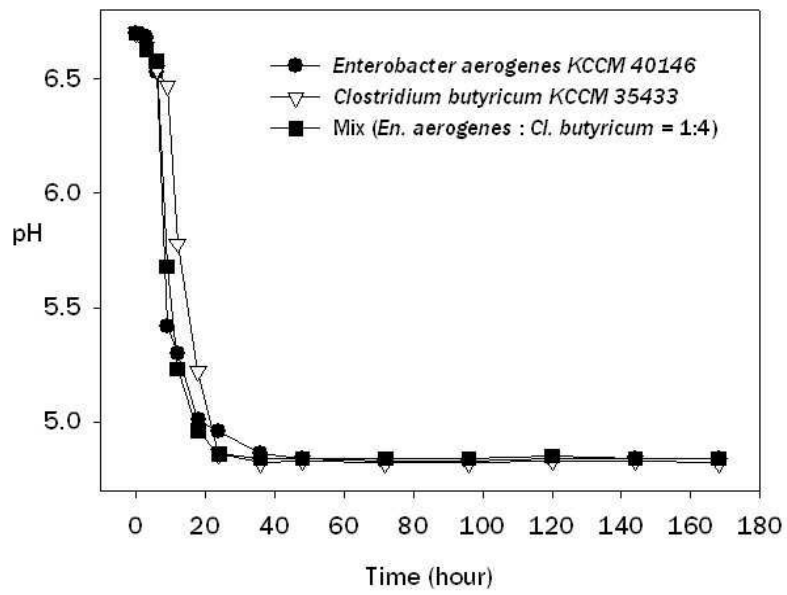
도면10



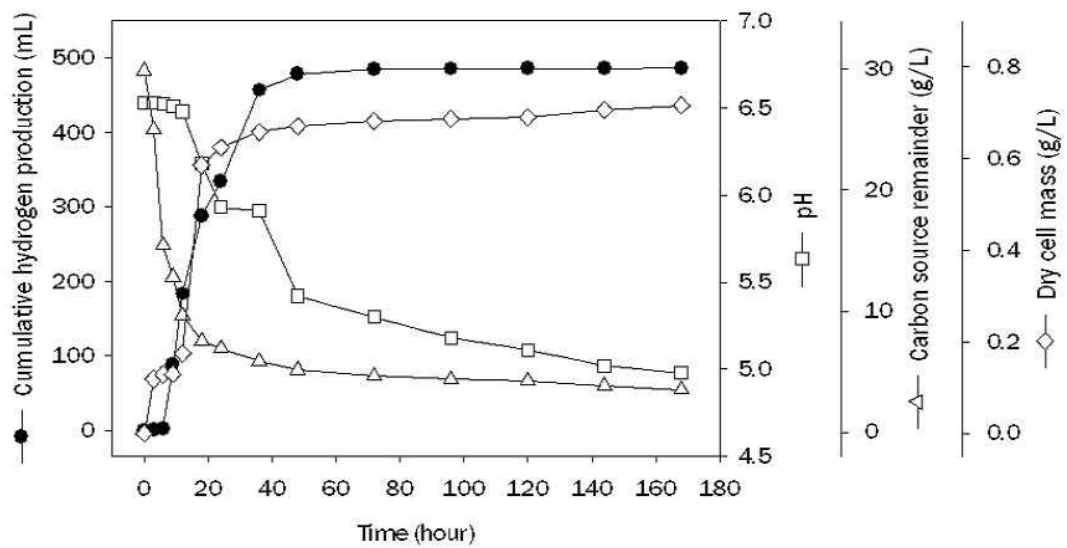
도면11



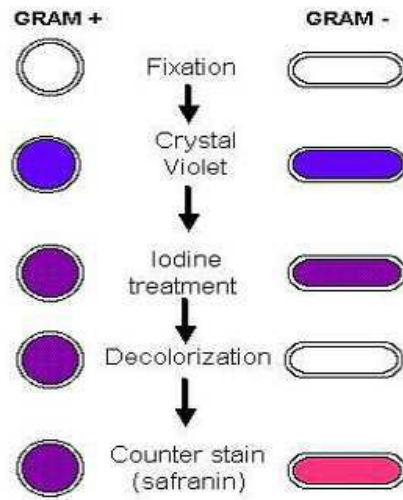
도면12



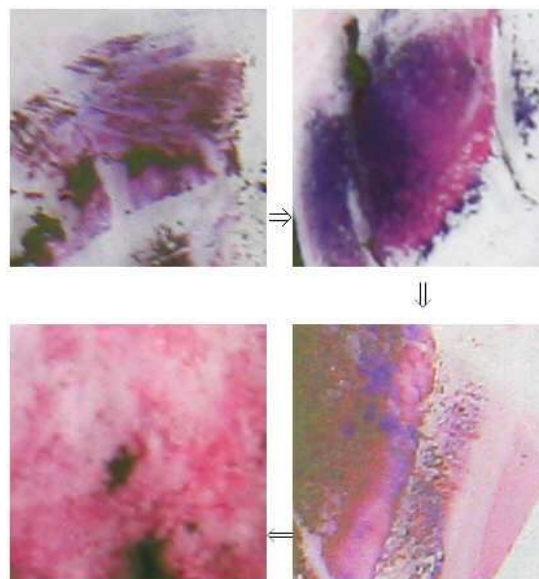
도면13



도면14



도면15



도면16

