

## *Clostridium butyricum* NCIB 9576에 의한 당으로부터 혐기적 수소생산

김미선\* · 문광웅 · 이인구 · 이태진 · 성창근<sup>1</sup>

한국에너지기술연구소 바이오매스연구팀, <sup>1</sup>충남대학교 농과대학 식품공학과

**Hydrogen Gas Production by Fermentation from Various Sugars Using *Clostridium butyricum* NCIB 9576.** Kim\*, Mi-Sun, Kwang-Woong Moon, In-Gu Lee, Tae-Jin Lee, and Chang-Keun Sung<sup>1</sup>. Korea Institute of Energy Research, Taejon 305-345, Korea, <sup>1</sup>Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea - *Clostridium butyricum* NCIB 9576 evolved hydrogen gas and produced various organic acids from glucose, lactose, starch, and glycerol. Total amount of hydrogen gas produced from 1 and 2% glucose were 630 and 950 ml H<sub>2</sub>/l-broth, respectively, for the first 24 hrs of incubation and the maximum hydrogen production rates were 42 and 94 ml H<sub>2</sub> /hr/l-broth, respectively. The initial pH 6.8 decreased to 4.2~4.5 during the first 12~16 hrs of fermentation when the pH was not controlled, resulting in ceasing the cell growth and hydrogen evolution and in degradation of 82 and 40% glucose after 24 hrs of incubation from 1 and 2% glucose, respectively. When pH was controlled to 5.5, glucose was consumed completely and resulted in increasing hydrogen production approximately 38~50% compared to the experiments without the pH control. *C. butyricum* NCIB 9576 produced hydrogen gas approximately 644, 1,700 and 3,080 ml H<sub>2</sub>/l-broth with 0.5, 1 and 2% lactose, respectively and the maximum hydrogen production rates were 41, 141 and 179 ml H<sub>2</sub>/hr/l-broth, respectively. All of the lactose added was degraded completely during fermentation even though pH was not controlled. *C. butyricum* NCIB 9576 produced 183 and 709 ml H<sub>2</sub>/l-broth with 0.1 and 0.5% starch for 48 hrs, respectively, when pH was not controlled. The maximum rates of hydrogen gas production were 43 and 186 ml H<sub>2</sub>/hr/l-broth, respectively and 80~100% of starch added was fermented. Approximately 107 ml H<sub>2</sub>/l-broth was produced using 1% glycerol by *C. butyricum* NCIB 9576 and the pH was maintained higher than 6.1 during fermentation without pH control. The degradation of glucose, lactose, starch and glycerol by *C. butyricum* NCIB 9576 were affected by the pH of fermentation broth and the organic acids released during fermentation. The pH of fermentation broth dropped to 4.2~4.6 after 12~14 hrs incubation when glucose was used as a substrate while pHs were maintained above pH 5 under the same experimental conditions when lactose, starch and glycerol were used. The organic solvents and acids produced during glucose fermentation were mainly ethanol, butyrate, acetate and a little of propionate, while butyrate was the main organic acids during the lactose, starch, and glycerol fermentation by *C. butyricum* NCIB 9576.

**Key words:** biological hydrogen, sugars, *Clostridium butyricum*, organic acids

화석연료는 그 부존의 편재성과 유한성으로 인하여 전 세계적으로 이미 수 차례 걸쳐 에너지 위기를 야기시킨 바 있으며 지금도 다양한 국제 긴장의 원인이 되고 있다. 뿐만 아니라 지구온난화, 산성비, 오존층 파괴, 엘니뇨 현상 등 화석연료 사용에 따른 전지구적 생태계 위기는 청정에너지 개발 문제와 함께 인류가 해결해야 할 최대의 당면과제라 할 것이다. 이같은 관점에서 볼 때 바이오매스 자원은 화석자원과는 달리 무공해 무편재성 에너지원임과 동시에 무한 재생성의 산업원료이기도 하다.

바이오매스로부터 생물학적으로 용이하게 생산되는

수소는 대량 연소 시에도 대기오염 유발이 없는 이상적인 미래 에너지 매체로 주목되고 있어 이미 오래 전부터 기초연구가 활발히 진행되어 왔으며, 일본 등 선진국에서는 수소를 중심으로 한 실용에너지 시스템 개발까지 진척되고 있다[9].

바이오매스 자원에서 유래하는 유기물질로부터 생물학적으로 수소를 생산하는 방법에는 크게 두 가지가 있는데, 그 하나는 빛이 존재할 때 광합성 박테리아를 이용하는 photoreduction 이른바 광 생물학적 수소생산 방법이고, 다른 하나는 빛이 없는 조건에서 수소생산 박테리아를 혐기 발효로 배양하여 수소를 생산하는 방법이다. 이 두 방법간에는 관여 미생물, 수소 발생 기작, 배양조건 및 기질이용 효율 등에서 상당한 차이가 있다[3, 13]. 혐

\*Corresponding author  
Tel. 82-42-860-3554, Fax. 82-42-860-3132  
E-mail: bmmkim@sun330.kier.re.kr

기 발효 수소생산은 빛이 없는 조건에서 이루어지므로 옥외 배양 시 태양광 유무에 관련없이 24시간 지속될 수 있으며, 배양장치의 대형화가 광합성 반응기보다 쉽게 이루어질 수 있다. 또한 발효산물로 생산되는 다양한 유기산은 광합성 박테리아에 의해 수소생산의 기질로 이용되어서 혐기발효와 광합성 배양을 계속적인 이상(two-phase)으로 하거나, 해당 미생물을 동시 배양할 때 유기물질로부터 수소생산을 최대화 할 수 있다[1, 11, 12].

수소생산 박테리아는 혐기발효 조건에서 탄수화물을 이용하여 배양액 중에 각종 유기산, 유기용매를 축적하고 동시에 수소와 이산화탄소를 발생한다. 생성되는 발효산물의 종류와 비율은 초기 배양조건인 pH, 온도, 기질의 종류와 농도, 무기물의 농도 등에 영향을 받을 뿐만 아니라, 이미 발효과정에서 생성된 대사산물인 유기산과 유기용매에 의해서도 수소생성에 영향을 받는다[4, 14]. *Clostridium butyricum*, *Cl. pasteurianum*, *Cl. acetium*, *Cl. kluyveri* 및 *Enterobacter aerogenes*는 가장 잘 알려진 혐기발효 수소생성 박테리아로서, 현재 이들을 이용한 수소생산에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 이들 혐기성 박테리아를 이용하여 고농도 유기폐수를 청정 에너지와 여러 가지 산업원료 물질로 전환시키는 연구가 선진국에서는 다각도로 시도 되고 있는데, 대개는 수소생산능 개선을 위한 균체 고정화기술[10]이나 혼합배양, 반응기 형태, 폐수 이용[6, 13] 등의 연구에 주력하는 경향이다. 그러나 식품산업 및 농·수·축산분야의 고농도 유기폐수는 그 성상 자체가 복잡할 뿐더러 공정이나 배출 계절에 따른 특성차이도 크기 때문에 폐수별 균종별 기질반응 특성에 관한 보다 심도있는 기초연구가 절실하다.

본 연구에서는 당 성분이 포함된 바이오매스 자원의 폭넓은 이용을 목적으로 *Clostridium butyricum* NCIB 9576이 glucose, lactose, starch, glycerol 등을 탄소원으로 이용할 때 수소생산성 및 발효중의 변화와 생성되는 유기산의 변화를 고찰하였다.

### 재료 및 방법

#### 균주 및 배양조건

본 연구에 사용된 균주는 중온 혐기성 세균인 *Clostridium butyricum* NCIB 9576이며 modified PYG 액체 배지[8]로 2주마다 계대 배양하여 4℃에서 보관하였다. 발효실험에도 동일한 배지를 이용하였으며, 탄소원으로 첨가된 glucose, lactose, starch 및 glycerol은 각각 멸균 후 따로 첨가하였다. 50 ml 용량 serum 병에 40 ml의 배지를 넣고, 약 3-4일간 중 배양한 균체를 660 nm에서 흡광도가 0.1 되도록 첨가하였다. 중 배양에 사용된 serum 병은 고무마개와 알루미늄 덮개로 밀폐하였으며, 본 배양에서는 1 l 배양액을 약 1.3 l 용량 아크릴 반응기에 주

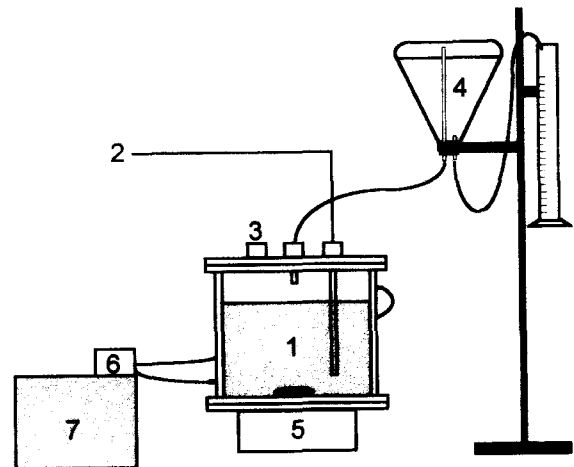


Fig. 1. Schematic diagram of the experimental apparatus for the hydrogen production.

1. 1.5 l reactor with a water jacket, 2. sampling port, 3. gas sampling port, 4. gas collector, 5. magnetic stirrer, 6. water circulator to control the temperature, 7. water bath.

입, 실리콘 마개로 밀폐한 후, 아르곤 가스를 흘려서 혐기 조건을 만들었다. 중 배양은 37℃에서 정지 배양하였고, 24시간 마다 교반하여 균체를 배양액과 섞어 주었다. 본 배양은 Fig. 1과 같은 실험장치로써 37℃에서 120 rpm으로 교반하였다. Glucose를 탄소원으로 이용하는 경우 초기 pH는 6.8로 맞추었으며 배양중 pH 조절을 하지 않은 실험과 pH를 5.5 및 6.5로 조절한 실험을 수행하였다. lactose, starch 및 glycerol을 탄소원으로 이용하는 실험은 초기 pH 6.8로 맞추었으며, 배양중 pH는 조절하지 않았다.

#### 가스분석

배양 중 발생되는 전체 가스는 acetic acid buffer (pH 3)를 담은 삼각 플라스크에 포집하였으며(Fig. 1), 수소 함량은 발효조 내 head space 가스를 gas-tight microsyringe로 100 µl 채취하여 gas chromatography (Shimadzu 14-B)로 분석하였다. 사용된 column은 3 mm × 2 mm ID glass로 molecular sieve 5A를 충전물질로 사용했으며, thermal conductivity detector(TCD)로 분석하였다. 발생가스 중 수소 가스 정량을 위한 GC의 조건은 column 온도 80℃, injector 온도 100℃, detector 온도 120℃이었으며, carrier 가스는 아르곤이며, flow rate 35 ml/min을 유지하였다.

#### 유기산 분석

발효산물은 발효액을 일정시간 간격으로 채취하여, 균체와 상등액을 분리한 후 상등액 400 µl을 5N HCl 50 µl로 산성화 한 후, internal standard 물질로 1% 1-propanol 40 µl를 첨가하였다. Porapak QS를 충전 물질로

하는 3 m×2 mm ID column을 이용해서 gas chromatography(Shimadzu 14-B)를 flame ionization detector (FID)와 연결하여 분석하였다. 분석조건은 column 온도 230℃, injector 온도 220℃, detector 온도 220℃이며, carrier 가스는 질소를 flow rate 50 ml/min로 사용하였다.

기타 분석

배양액 중의 glucose와 lactose 농도는 dinitrosulfuric acid(DNS) 방법[7]으로 환원당을 정량하였다. 또한 starch의 농도는 5.5N HCl 0.2 ml과 2 ml 시료를 약 30분간 끓는 물에서 가열한 후 중화하여, DNS 방법으로 정량하였다. 배양액의 pH는 적절한 시간에 pH meter(Orion, model 420A)로 실온에서 측정하였다. 균체농도는 일정 시간 간격으로 채취한 발효액을 UV-visible spectrophotometer(Hewlet Packard, 8452A Diode Array Spectrophotometer)로 파장 660 nm에서 각각 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

Glucose로부터 수소생산

*Clostridium butyricum* NCIB 9576은 혐기배양 24 시간 동안 1 및 2% glucose로부터 총 630 ml 및 900 ml 수소/day/1-배양액을 각각 생성하였으며 최대 수소 생산율은 각각 42 및 94 ml/시간/1-배양액 이었다. 첨가된 기질 중 glucose는 82 및 40% 만이 각각 이용되었다(Fig. 2). 배양액 분석 결과, 각종 유기산 및 유기 용매가 축적되었는데 acetate, butyrate가 주로 생성되었으며, propionate와 유기용매로는 acetone, ethanol 등이 소량 검

출되었다. 배양 중 pH는 외부로부터 조절되지 않았으며, 배양 12~16시간 동안 초기 pH 6.8에서 4.2~4.5로 낮아졌고 배양 24시간 이후 균체 성장 및 수소 생산은 거의 정지하였다. 탄소원으로 첨가된 glucose는 배양액의 pH가 5 이상으로 유지될 때까지만 *C. butyricum* NCIB 9576에 의해 효과적으로 이용이 가능한 것으로 추정된다. 특히 2% glucose를 첨가하였을 경우 배양 24 시간 후 배양액의 pH가 4.5 이하로 낮아졌고, 동시에 균체 성장 및 glucose 분해 정지가 일어나서, 최종적으로 약 60% glucose가 배양 중에 남아 있었다. 반면 이와 같은 *C. butyricum* NCIB 9576에 의한 glucose의 낮은 분해율은 배양기간 중 배양액의 pH를 5.5 및 6.5으로 조절함으로써 증가되었다(Fig. 3). 즉, 배양액의 pH를 5.5로 조절하였을 경우, 약 18~20 시간후 첨가된 1% glucose 전량이 분해되었으며, 이때 발생된 수소의 총 양은 약 870~945 ml/day/1-배양액이었다. 이는 pH를 조절하지 않은 경우보다 약 38~50% 수소 생성량이 증가한 것이다. 또한 발효 중 배양액을 pH 6.5으로 조절하였을 경우는 첨가된 glucose 100%가 분해되는데 약 14-15시간이 소비되었고, 배양 24시간 동안 수소는 약 940~1,000 ml/day/1-배양액 발생하였다. 또한 배양액의 pH 조절로 인하여 수소가스 발생은 48시간까지 계속적으로 증가하였으나, 증가량은 배양 24~48시간 사이 각각 62 ml 및 190 ml에 그쳤다. 배양액을 pH 6.5로 조절하였을 경우 5.5로 조절하였을 때 보다 약 6~8% 가량 높은 수소 생산을 보였으나, 실질 폐수를 생물학적 수소생산 기질로 이용할 경우는 환경에 존재하는 메탄 박테리아를 비롯한 수소 소비 박테리아의 활성을 최소화하기 위해 pH 5.5로 조절하는 것이 바람직하다고 사료된다. 균체 증식량은 배양 15~17시간에 최대이었으며, 그후 수소생산 박테리

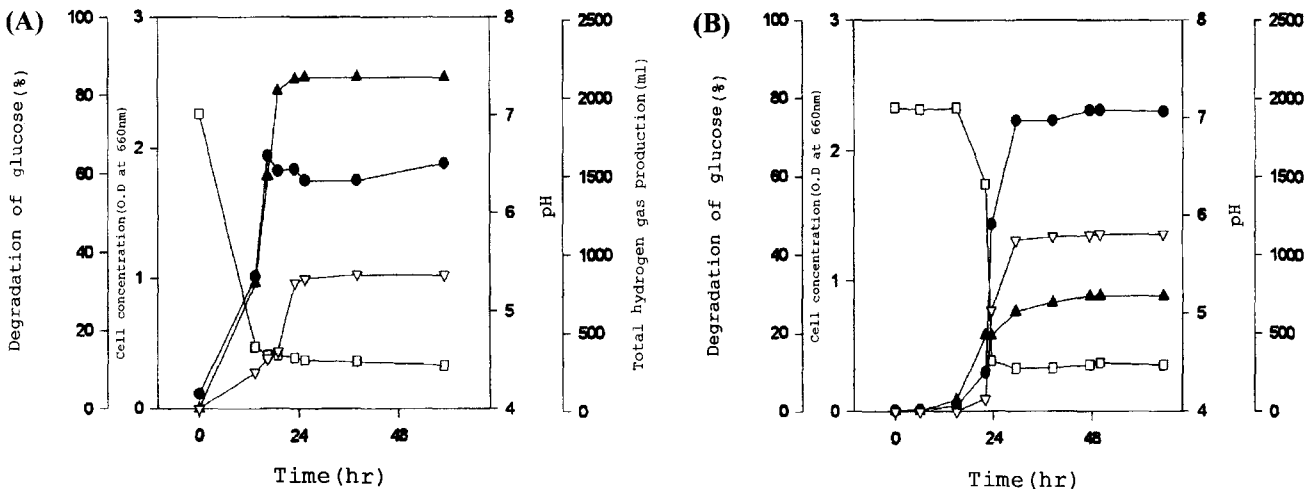
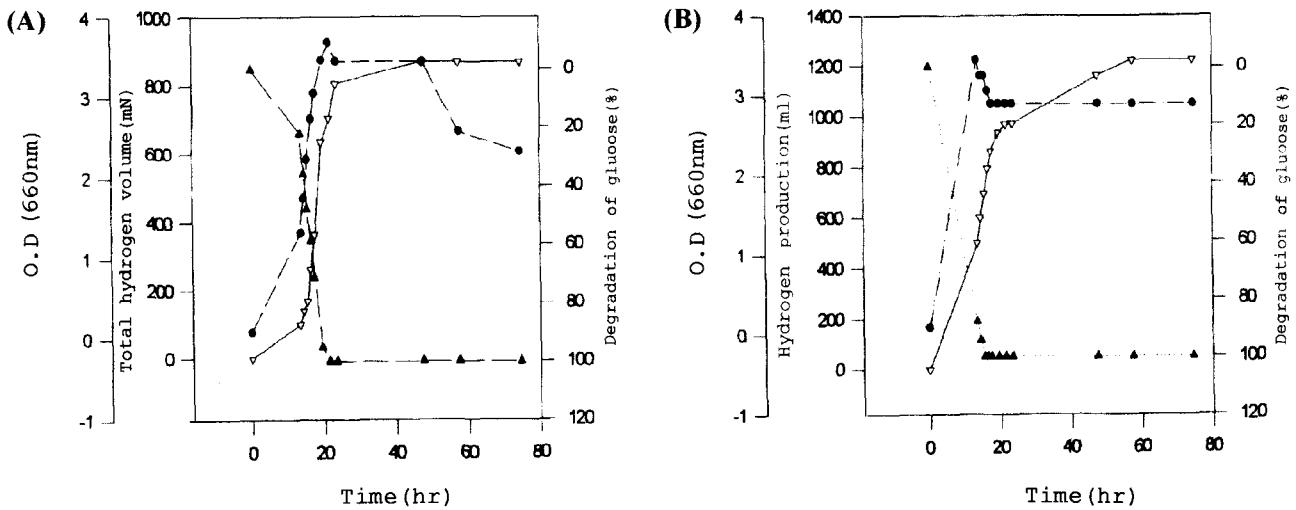


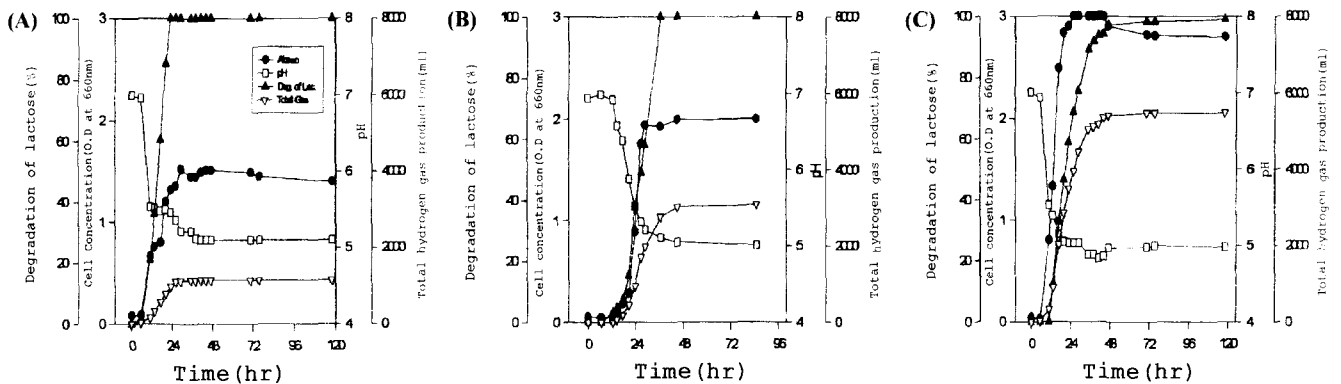
Fig. 2. Anaerobic fermentation patterns of *Clostridium butyricum* NCIB 9576 using glucose as a carbon source. Cultures were anaerobically grown in 1.3 l reactor containing 1,000 ml of modified PYG media at 37℃.

(A) 1% glucose; (B) 2% glucose, ●- cell concentration abs. 660 nm; □- pH; ▲- degradation of glucose; ▽- total H<sub>2</sub> gas



**Fig. 3.** Effect of pH on the glucose consumption and hydrogen gas production during the anaerobic fermentation of *Clostridium butyricum* NCIB 9576.

Cultures were anaerobically grown in 1.3 l reactor containing 1 l of modified PYG media containing 1% glucose as a carbon source and pH was controlled to 5.5 (A) and 6.5 (B) —●—, Cell concentration abs. at 660 nm; —▲—, Degradation of glucose; —▽—, Total H<sub>2</sub> gas



**Fig. 4.** Anaerobic fermentation patterns of *Clostridium butyricum* NCIB 9576 using lactose as a carbon source. Cultures were anaerobically grown in 1.3 l reactor containing 1,000 ml of modified PYG media at 37°C.

(A) 0.5% lactose, (B) 1% lactose, (C) 2% lactose. Legends are same as in Fig. 2.

아의 lysis가 현저하여 발효 60시간 경과 후에는 최대 균체 생산 시기에 비해 약 17-23% 가량의 균체농도가 감소하였다. 이와 같은 균체 용해 현상은 발효산물에 의해서 발효말기에 일어날 수 있는 현상으로, 본 균주의 경우 잘 알려져 있지 않지만, pH 6.5로 유지할 때는 이와 같은 현상이 거의 발생하지 않았던 것으로 미루어 배양액의 pH에 영향을 주는 발효중 생성된 유기산의 영향으로 사료된다.

**Lactose로부터 수소생산**

0.5, 1 및 2% lactose를 탄소원으로 이용할 때, 이 균주는 약 644, 1,700 및 3,080 ml 수소/1-배양액을 각각 생산하였으며, 최대 수소 생산율은 각각 41, 141 및 179 ml/시간/1-배양액이었다(Fig. 4). 0.5% lactose를 탄소원으로 이용할 때는 약 28~29시간 동안에 수소생산량이

최대가 되었으며, lactose도 100% 발효되었다. 첨가된 lactose의 양이 2%까지 증가 되었을 때, 배양 시간도 지연되어 약 48시간 경과시에 최대의 수소생산에 도달하고, 약 72시간에 첨가된 lactose가 모두 분해되었다. 또한 배양액 pH는 glucose를 탄소원으로 이용할 때와는 달리 초기 pH 6.8로부터 발효가 진행됨에 따라 5.2-5.3까지 감소하였으나, 더 이상 감소하지 않고 이후에도 5 이상으로 유지 되었다. 이러한 배양액의 pH 5 이상의 유지는 배양중 생성된 발효 산물에 의해 유지되는 것으로 사료되나 정확한 기작 및 원인 물질은 밝혀지지 않았지만, 배양액 중의 휴식기의 균체를 사멸시키지 않고, 대사중의 수소 생산 및 유기산 생산 효소계를 안정화하여 기질의 분해와 아울러 수소생산을 유도하였다고 분석된다. *C. butyricum* 및 *Enterobacter aerogenes* 등과 같이 수소를 생산하는 혐기성 박테리아는 수소생산 기작이 광합성 박

테리아와는 다르다. Jungermann 등[5]은 NADH로부터 전자의 역방향 흐름에 의해 proton까지 전달되어 수소가 발생하며, 이때 동시에 acetyl-CoA 및 *Clostridia*에서 추출된 조효소액, 즉, hydrogenase가 이에 작용한다고 밝혔다. 이후 Tanisho 등[11, 12]은 이와 같은 전자의 역흐름을 배양액 pH와 수소 발생력과의 관계로서 열역학적으로 설명하고 있는데, 즉, 세포막 내면에서 NADH가 산화되어 이때 발생한 proton이 세포막에 결합된 hydrogenase에 의해 세포막 외부면에서 환원되어 수소가 발생한다고 밝혔다. 이들은 또한 *Enterobacter aerogenes*의 균체 성장은 pH 5~7 사이에 직선적으로 증가하고, 수소 발생율은 convex형의 증가를 보이나, 수소생산은 pH 5.8에서 최대를 보였다고 보고하였다. Glucose를 탄소원으로 이용한 본 실험에서는 *C. butyricum* NCIB 9576도 배양액 pH가 5이하로 유지될 때 수소의 생산율은 낮았으며, 기질의 소비도 낮았는데 이같은 현상은 Tanisho 등[11]의 *Enterobacter aerogenes* 결과와 일치하였다. *C. butyricum* NCIB 9576이 lactose를 탄소원으로 이용할 때 균체의 성장 및 수소 발생은 lactose의 첨가 농도와 일치하여 비례하였다. 즉, 균체량 생산은 각종 농도의 lactose 첨가시 배양 26~29시간 이후에 최대이었으며, 2% lactose를 탄소원으로 할 때는 0.5% lactose 첨가보다 약 2배 가량의 많은 균체가 생겼다. 수소 생성량도 이와 같은 직선적 관계를 나타내어, 1 l 배양액으로부터의 총 수소생산량이 0.5, 1 및 2% lactose 첨가시 각각 약 644, 1,700 및 3,080 ml에 달하였다. *C. butyricum* NCIB 9576이 glucose와 lactose를 탄소원으로 이용하여 나타내는 pH값은 전술한 바와 같이 균체의 생육과 수소 생산량에 상당한 차이를 나타내지만, 생성된 유기산에는 커다란 차이점을 관찰할 수 없었다. 발효액 중에 축적되는 유기산 및 유기용매를 가스 크로마토그래피로 분석한 결과 배양액 중에 acetate와 butyrate가 주로 축적되었

으며, lactose를 탄소원으로 이용하였을 때는 배양액 중에 propionate의 함량이 높았다. 유기용매로는 주로 ethanol이 축적되었으며, acetone도 소량 생겼다. Lactose를 탄소원으로 이용할 때 *C. butyricum*은 발효 후기에 acetate와 propionate가 검출되는 peak사이에서 분해산물이 축적되었으며, 이 peak가 검출될 때 butyrate 축적량은 glucose를 기질로 이용할 경우와 비교하여 다소 낮았다. Van Andel 등[14]은 *C. butyricum*이 혐기 발효 중 생산하는 발효 산물의 양은 pH, 균체 성장율, glucose 농도 및 배양기내의 가스 조성 등에 의해 좌우된다고 보고하였다. 즉, 배양액 pH가 6.8 이상이고, 배양액중의 glucose 농도가 증가할 때, acetate/butyrate 비율이 증가하였으며, 배양기내의 수소의 분압이 감소할 때도 같은 현상이 관찰되었다고 보고하였다. Heyndrickx 등[4]은 *Clostridium* 속의 균주들이 glucose를 기질로 수소 및 유기산을 생산할 때 발효 성상 및 균체증식의 최적 pH 범위는 균주가 갖는 고유의 특성이라고 보고하였다. 그러나 일반적으로 발효액의 pH가 높을수록 수소 생성량은 많았고, acetate와 butyrate의 생성이 높았다. 특히 pH가 5.5에서 8.0으로 증가할 경우 대부분의 균주가 acetate/butyrate가 1 이상 생성되었다고 보고하였다.

*C. butyricum* 및 *C. pasteurianum*은 대표적인 butyrate 생산 균주로 glucose가 Embden Meyerhoff 경로 및 이로부터 분지된 발효 경로를 거쳐 주로 acetate, butyrate, 수소 및 이산화탄소를 생성한다. 이론적으로 이 균주는 glucose 1 mol 당 3~4 mol의 ATP를 생성하며, 이는 생성물로 acetate가 생기는가 butyrate가 생기는가에 따라 좌우된다. 그러나 일반적으로 glucose로부터 butyrate와 acetate가 모두 발효산물로 발생하고 이 비율은 성장조건에 따라 달라진다. 이때 생성되는 유기산의 비율은 균주에 따라 다르지만, glucose 1 분자가 acetate로 전환될 때는 4 분자의 수소가 발생하고, buty-

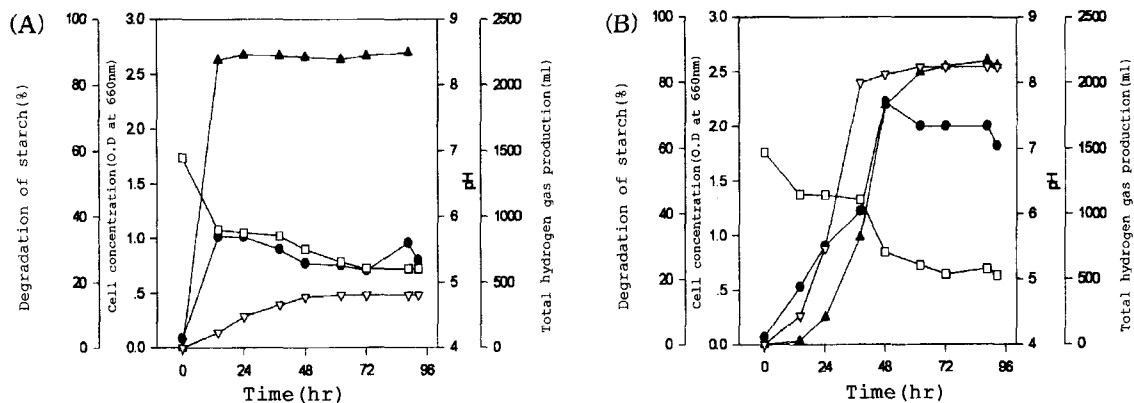


Fig. 5. Anaerobic fermentation patterns of *Clostridium butyricum* NCIB 9576 using starch as a carbon source. Cultures were anaerobically grown in 1.3 l reactor containing 1 l of modified PYG media at 37°C.

(A) 0.1% starch, (B) 0.5% starch, ●, Cell concentration abs. at 660 nm; ▲, Degradation of starch; □, pH; ▽, Total H<sub>2</sub> gas

rate로 전환될 때는 2 분자의 수소가 발생한다. 대사과정에서 수소 발생은 ferredoxin이 매개하는 NADH 산화 반응에 의한 것으로, 대사시 과량의 환원물질은 수소로서 제거되고 세포내의 redox balance가 결정된다.

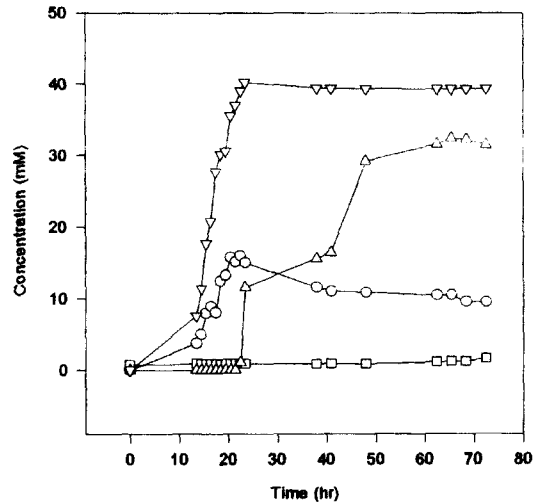
**Starch 및 glycerol로부터 수소생산**

*C. butyricum* NCIB 9576은 0.1% starch를 탄소원으로 이용하여 총수소 183 ml/l-배양액을 배양 24시간 동안 생산하였고 그 이후에는 수소생산이 거의 없었다. 0.5% starch로부터 약 709 ml 수소/l-배양액을 같은 배양시간 동안에 생산하였다(Fig. 5). 최대 수소 생산률은 각각 43 및 186 ml/시간/l-배양액이고, 배양 후 11~12 시간 사이에 최대 생산을 보였으며, 이때 배양액의 pH는 5.0~5.5이었다. 배양 중 pH는 외부에서 조절하지 않았으며 배지 중에 포함된 phosphate buffer 외에 pH 완충제를 따로 첨가하지 않았으나, pH는 5.0 이상으로 유지되었다. 또한 같은 조건에서 0.1% starch로부터 생성된 수소량은 1% glucose로부터 생성된 양의 약 30%이었다. 0.5% starch로부터 생성된 수소의 양은 1% glucose로부터 발생된 수소량 보다 약 1.12배 높았다. 0.1% starch는 배양 13시간 이내에 모두 분해된 반면, 0.5% starch는 약 80% 가량이 분해되었으며, 수소생산 및 균체증식이 정지된 이후에는 더 이상 분해되지 않았다. Bae[1]는 1% glucose를 기질로 이용하여 *C. butyricum*과 광합성 미생물을 혼합 배양하여 유기산 및 수소생산을 측정하였다. 이들은 pH 완충제를 배양액 중에 첨가하여, 배양 말기의 pH가 5.6~5.7 이하로 강하하는 것을 방지하였으며, 그 결과로 기질의 90% 이상이 분해 되었으며 배양액 중에 생성된 유기산은 acetate와 butyrate가 대부분을 차지하였고, 1% starch를 탄소원으로 사용한 경우 수소 생성량이 1% glucose 경우보다 약 1.1배 가량 높았다고 보고하였다.

1% glycerol을 기질로 사용할 경우, *C. butyricum* NCIB 9576은 혐기 발효에 의해 약 107 ml 수소/l-배양액을 배양 24시간 동안에 발생하였으며, 배양 10시간에 최대 74 ml 수소/시간/l-배양액을 나타내었다. 배양액 pH는 발효중 6.0 이상으로 유지되었으며 유기산의 발생은 butyrate가 가장 많이 생성되었고, glucose를 기질로 이용할 때와는 달리 에탄올의 생성은 낮았다.

**유기산 생성**

혐기 발효중 생성된 유기산은 배양액의 pH 강하에 영향을 줄 뿐만 아니라, 직접적으로 세포막의 pH 구배에 영향을 주어서 최종적으로 배양액 중의 생성되는 유기산 비율에도 영향을 준다. pH가 6.5에서 8로 증가할 때 총 유기산 양이 1.7배 증가하며, 또한 각종 유기산 생산 비율도 변화하여, 배양액 중에 acetate/butyrate의 비율이



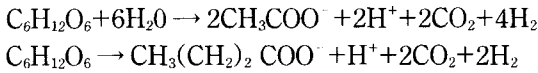
**Fig. 6. Production of organic acids and ethanol by *Clostridium butyricum* NCIB 9576 using 1% glucose as a carbon source.**  
 -▽-, Ethanol; -△-, Butyric acid; -○-, Acetic acid; -□-, Propionic acid.

pH가 낮아질수록 감소한다고 보고되었다[4]. 이와 같은 현상은 본 실험에서도 관찰되어 *C. butyricum* NCIB 9576은 starch를 기질로 이용할 때, glucose나 lactose의 경우보다 배양 중 발효액의 pH가 높게 유지되었으며, 이 때는 butyrate보다 acetate의 생성이 높았다. 또한 1% glucose를 탄소원으로 사용하여, 배양액 pH 5.5~6.0로 조절된 경우(Fig. 6) acetic acid는 최대 16 mM이 배양 20~24시간에 축적되고, 이후 감소하여 48시간에는 10 mM 가량 생성되었다. Butyric acid는 배양 초기 20시간까지는 거의 생성되지 않았지만, 그후 계속 증가하여 배양 40시간까지 최대 생성속도를 보였고, 배양 64시간 후 약 30 mM 가량 축적되었다. *C. butyricum* NCIB 9576은 또한 배양 중 propionate를 1~2 mM 소량 축적하였다. 그러나 에탄올은 배양 12-13시간 후부터 생성되어 배양 24시간에 최대 2.5 mM 정도를 생성하였다. 다섯 번에 걸친 반복 실험 결과 축적되는 에탄올은 매 실험때 마다 다소 차이가 있어서 약 2.5~4.0 mM을 배양 24시간 동안 축적하였으며 starch를 기질로 이용할 때 *C. butyricum*은 에탄올을 거의 생성하지 않았다. 또한 이외에도 formate와 아세톤도 소량 생성되었으나 매 실험마다 일정하게 생성 되지는 않았다. 이와 같은 여러 가지 유기산 생성량 및 종류 변화는 또한 수소생산량과 밀접한 관련이 있어서 포도당 한 분자가 acetate 또는 butyrate 어느 한쪽 산물만으로 전환될 때의 반응에서는 각각 4 mol 또는 2 mol의 수소가 각각 생성된다.

*C. butyricum*은 glucose로부터 butyrate를 주요 대사 산물로 축적하는 세균이며 Embden Meyerhoff 경로를 거쳐 수소, 이산화탄소, butyrate를 생성하며, 동시에

lactate, acetate, butanol, 에탄올도 생성할 수 있는 발효 경로를 갖는다. 위와 같은 대사 산물의 비는 배양조건에 따라 달라질 수 있으나 대사 과정에서 수소발생은 ferredoxin이 중재하는 NADH 산화 반응에 의한 것으로 총괄적인 산화환원 전위상태가 결정된다.

Acetate 및 butyrate가 생성될 경우를 각각 반응식으로 표시하면 다음과 같다.



즉, 혐기발효에 의한 수소생산은 2 mol acetic acid와 동시에 최대 4 mol 수소를 생산한다. 이는 glucose 1 mol로부터 생산할 수 있는 12 mol 수소 중 약 33%의 전환에 불과하지만, 이때 동시에 생성된 acetate는 광합성에 의한 수소생산 기질로서 적당한 광조건 하에서 광합성 박테리아에 의해 아래 식과 같이 높은 효율의 수소 발생을 유도 할 수 있다. 즉,  $2CH_3COOH + 4H_2O \rightarrow 4CO_2 + 8H_2$

혐기 발효 및 이와 같은 유기산으로부터 광합성에 의한 수소발생은 이론적으로 1 mol glucose로부터 최대 12 mol 수소가 발생하지만, 실질적으로 발효 중에 발생하는 pH 변화, 유기산 생성을 등은 수소생산 효율을 크게 좌우하고, 더욱이 제당, 식품 폐수를 이용할 경우 타 박테리아나 폐수 중에 존재하는 금속이온 및 질소원 종류 등이 수소생산에 영향을 준다. 따라서 기질로부터 수소 발생과 아울러 유기산의 축적을 최대화할 수 있는 발효 조건의 최적화는 더욱 연구가 요구된다.

*Clostridium* 속 세균은 절대 혐기 상태에서 환원당 뿐만 아니라 전분계 탄수화물 및 xylan, pectin, mannitol, sorbitol, glycerol, cellobiose, sucrose 등을 분해하여 수소로 전환 시키는 다양한 기질 이용성을 갖고 있어서 바이오매스 자원을 생물학적으로 전환시키는데 유용한 미생물이다. 이 중 *C. butyricum*은 대사 산물로서 유기산 및 알콜류를 생산하며, 높은 수소 생산 효율을 갖는 절대혐기 균주이다. 이 균주는 *C. acetium*과 *C. pasteurianum* 등에 비교해서 수소 생산에 높은 이용가치를 갖는다. 특히 *C. butyricum*은 수소 생산과 동시에 butyrate와 acetate 등의 유기산을 주로 축적하는 균주로서 발효에 의한 수소 생산에 가장 널리 이용되는 균주이며, 이 균주에 의해 축적된 유기산을 기질로 이용하여 광합성 세균에 의한 수소생산의 경우 약 75~80%의 수소 생산 효율을 갖는다. 이와 같은 *C. butyricum*과 광합성 세균의 two-phase 발효나 복합 배양은 생물학적으로 수소 생산을 최대화하여 경제성 있는 기술로 평가 되고 있다[2].

## 요 약

*Clostridium butyricum* NCIB 9576은 혐기 발효에서

glucose, lactose, 및 starch를 이용하여 복합 유기산 및 수소를 생산하였다. 1 및 2% glucose를 이용할 때, 총 수소 생산량은 초기 배양 24시간 동안 각각 630 및 950 ml 수소/1-배양액이며, 최대 수소 생산률은 각각 42 및 94 ml 수소/시간/1-배양액이다. pH를 조절하지 않았을 경우 배양 12~16시간 동안 초기 pH 6.8은 4.2~4.5로 낮아지고 배양 24시간 이후 균체 증식 및 수소생산은 거의 정지하였으며, 기질 소비율은 약 82 및 40%이었다. 배양 중 pH를 5.5로 조절하였을 경우, 배양 18~20시간 동안 기질 이용율은 100%로 증가하였으며, 총수소 발생량도 pH를 조절하지 않았을 때와 비교하여 약 38~50% 증가하였다. *C. butyricum*은 0.5, 1 및 2% lactose를 기질로 이용할 때 최종적으로 각각 약 644, 1,700 및 3,080 ml 수소/1-배양액을 생산하였으며, 최대 수소 생산율은 각각 41, 141 및 179 ml/시간/1-배양액이었다. 이때 첨가된 lactose는 배양액의 pH 조절없이 모두 분해되었다. 0.1 및 0.5% starch를 기질로 이용할 때, 48시간 동안 각각 183 및 709 ml 총 수소/1-배양액을 생산하였으며, 이때 최대 수소 생산율은 각각 43 및 186 ml/시간/1-배양액이었으며, 첨가된 0.1 및 0.5% starch는 각각 100%, 및 약 80% 분해되었다. 1% glycerol은 배양 24시간 동안 약 107 ml H<sub>2</sub>/1-배양액을 발생하였으며, pH는 발효 중 조절 없이 항상 6.1 이상으로 유지되었다. 발효 중 pH를 조절하지 않았을 경우, 기질로 이용한 glucose, lactose, starch의 분해율의 차이는 *C. butyricum*이 배양 중 생산하는 유기산의 축적으로 인한 배양액의 pH 변화에 기인하는 것으로 분석된다. 즉, glucose를 기질로 이용한 혐기 발효 12~16시간 동안 배양액 pH를 4.2~4.5로 변화시킨 반면, lactose와 starch로부터는 같은 배양조건에서 pH 5 이상으로 유지되었다. Glucose를 기질로 이용할 때 이 균주는 ethanol, acetate, butyrate를 배양액 중에 많이 축적하였고, propionate는 거의 축적하지 않았지만, lactose, starch, glycerol을 기질로 이용할 때는 butyrate가 주로 축적되었다.

## 감사의 말

이 논문은 산업자원부 대체에너지 기술개발 연구사업으로 수행된 연구 내용의 일부이며, 연구비 지원에 감사드립니다.

## REFERENCES

1. Bae, M. 1995. Production of bio-hydrogen from waste materials. Research Report, Ministry of Trade, Industry, and Energy, 941C401-364FP1.
2. Benemann, J. 1996. Hydrogen biotechnology: Progress and prospects. *Nature Biotechnol.* 14: 1101-1103.

3. Gray, C. T. and H. Gest. 1965. Biological formation of molecular hydrogen. *Science* **148**: 186–192.
4. Heyndrix, M., P. De Vos, B. Thibau, P. Stevens, and JI De Ley. 1987. Effect of various external factors on the fermentative production of hydrogen gas from glucose by *Clostridium butyricum* strains in batch culture. *System. Appl. Microbiol.* **9**: 163–168.
5. Jungerman, K., R. K. Thauer, G. Leimenstoll, and K. Decker. 1973. Function of reduced pyridine nucleotide-ferredoxin oxidoreductase in saccharolytic *Clostridia*. *Biochim. Biophys. Acta.* **305**: 268–280.
6. Lieno, Y., T. Kawai, S. Sato, S. Otsuka, and M. Morimoto. 1995. Biological production of hydrogen from cellulose by natural anaerobic microflora. *J. Ferm. Bioeng.* **79**(4): 395–397.
7. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426–428.
8. Mologoski, J. H. and M. J. Klug. 1976. Characterization of anaerobic heterotrophic bacteria isolated from freshwater lake sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **31**: 80–90.
9. Nagai, S., T. Kodama, K. Ohmiya, K. Miyamoto, S. Yokoyama, and H. Saiki. 1996. Interim evaluation report of development of environmentally friendly technology for the production of hydrogen. NEDO, Tokyo, Japan.
10. Suzuki, S., I. Karube, T. Matsunaga, S. Kuriyama, N. Suquki, N. Shirogami, and T. Takamura. 1980. Biochemical energy conversion using immobilized whole cells of *Clostridium butyricum*. *Biochimie* **62**: 26–31.
11. Tanisho, S. and Y. Ishiwata. 1994. Continuous hydrogen production from molasses by the bacterium *Enterobacter aerogenes*. *Int. J. Hydrogen Energy.* **19**(10): 807–812.
12. Tanisho, S., Y. Suzuki, and N. Wakao. 1987. Fermentative hydrogen evolution from various substrates by *Enterobacter Aerogenes*. *Hakkokogaku* **67**: 29–34.
13. Ueno, Y., S. Otsuka, and M. Morimoto. 1996. Hydrogen production from industrial wastewater by anaerobic microflora in chemostat culture. *J. Ferm. Bioeng.* **82**(2): 194–197.
14. Van Andel, J. G., G. R. Zoutberg, P. M. Crabbendam, and A. M. Breure. 1985. Glucose fermentation by *Clostridium butyricum* grown under a self generated gas atmosphere in chemostat culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 21–26.

(Received December 2, 1998)