



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

Gluconacetobacter sp. NOK21

유래 섬유소막의
미생물연료전지에 이용 가능성

濟州大學校 大學院

食品工學科

吳 和 貞

2015年 2月

Gluconacetobacter sp. NOK21

유래 섬유소막의
미생물연료전지에 이용 가능성

指導教授 高 榮 煥

吳 和 貞

이 論文을 工學 碩士學位 論文으로 提出함

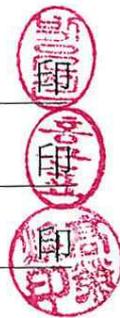
2015年 2月

吳和貞의 工學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 _____ 朴 恩 珍

委 員 _____ 洪 根 杓

委 員 _____ 高 榮 煥



濟州大學校 大學院

2015 年 2月

Application of cellulosic membranes
by *Gluconacetobacter* species to
microbial fuel cell

Hwa Jeong Oh
(Supervised by professor Young Hwan Ko)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for the
degree of Master of Engineering

2015. 02.

This thesis has been examined and approved.

Eun-Jin Park, Thesis director, Prof of Food Science and Engineering
Geun-Pyo Hong , Prof of Food Science and Engineering
Young-Hwan Ko, Prof of Food Science and Engineering

February 2015

Department of Food Science and Engineering
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

LIST OF TABLES	iii
LIST OF FIGURES	iv
Abstract	1
1. 서 론	3
2. 재료 및 방법	12
2.1. 균주의 배양 및 특성	12
2.1.1. 균주의 배양	12
2.1.2. 균주의 생리화학적 특성	12
2.2. 섬유소막의 합성에 미치는 포도당과 에탄올 농도의 영향	12
2.2.1. 포도당 농도의 영향	12
2.2.2. 에탄올 농도의 영향	12
2.3. Solid-state ¹³ C-NMR을 이용한 구조 분석	13
2.4. 섬유소막의 물성 분석	13
2.4.1. 섬유소막의 함수율 및 재수화율	14
2.4.2. 섬유소막의 기계적 강도 측정	14
2.5. 섬유소막의 주사전자현미경 분석	14
2.6. 미생물 연료전지의 구성 및 운전 조건	15
2.6.1. 미생물 연료전지 구성	15
2.6.2. 미생물 연료전지의 운전 조건	17
2.7. 통계분석	17
3. 결과 및 고찰	18
3.1. 균주의 배양 및 동정	18

3.2. 섬유소막의 합성에 미치는 포도당의 영향	20
3.3. 섬유소막의 합성에 미치는 에탄올 농도의 영향	20
3.4. 섬유소막의 구조	22
3.5. 섬유소막의 함수율 및 재수화율	25
3.6. 섬유소막의 기계적 강도 측정	26
3.7. 섬유소 피막의 구조	26
3.8. 섬유소막을 이용한 미생물연료전지	29
3.8.1. 섬유소막과 양이온 교환막의 투과성 비교	29
3.8.2. 양극의 표면적과 용존산소의 영향	31
3.8.3. 전자전달매개체의 영향	31
4. 요약	35
5. 참고문헌	37

[LIST OF TABLES]

Table 1. Utilization of various carbon sources by <i>Gluconacetobacter</i> species NOK21	19
Table 2. Effects of dextrose concentration on the production of cellulosic membranes by <i>Gluconacetobacter</i> species NOK21	21
Table 3. Effects of ethanol concentration on the production of cellulosic membranes by <i>Gluconacetobacter</i> species NOK21	21
Table 4. Water content and rehydration rate of cellulosic membranes by <i>Gluconacetobacter</i> species NOK21	25
Table 5. Basis weight of plastic membrane Neosepta CMX and cellulosic membrane of <i>Gluconacetobacter</i> species NOK21	27

[LIST OF FIGURES]

Fig. 1. Electron transport system in bacterial cells	5
Fig. 2. Types of microbial fuel cell systems	7
Fig. 3. Microbial fuel cell constructed in this study	16
Fig. 4. Morphology of an <i>Gluconacetobacter</i> species NOK21 in static liquid cultures	18
Fig. 5. Structure of cellulose polymers and their ¹³ C NMR spectra	23
Fig. 6. ¹³ C NMR spectra of cellulosic biopolymers obtained from <i>Gluconacetobacter</i> species NOK21 culture.	24
Fig. 7. Physical strength of cellulosic membranes by <i>Gluconacetobacter</i> species NOK21	27
Fig. 8. Scanning electron microscopic images of cellulosic membranes synthesized by <i>Gluconacetobacter</i> species NOK21	28
Fig. 9. Changes of electric currents in the microbial fuel cells using cation exchanger resin or cellulosic membranes as a proton exchange membrane	30
Fig. 10. Changes of electric voltages in the microbial fuel cell using cellulosic membranes as a proton exchange membrane depending upon surface area of anode and aeration of cathode chamber	32
Fig. 11. Effects of neutral red on electric power generation in the microbial fuel cell using cellulosic membranes as a proton exchange membrane.	33

Abstract

Biological energy ATP generated on oxidative degradation of organic matters is converted into electrical energy in microbial fuel cell(MFC) system. MFC is one of the methods for the production of sustainable clean energy. But it has some obstacles to overcome for the practical use, one of which is manufacture of cheap proton-exchange membrane. Utilization of biomembranes that is cheap though low in proton-selective permeability was considered in this study.

Bacterial celluloses with hydrogel structures were expected to have high proton-selective permeability in contrast to plant celluloses with highly ordered crystalline structure.

Gluconacetobacter species NOK21, a kind of acetic acid bacteria, was reported to form pellicles on the surface of liquid medium. The pellicle membranes were investigated for their potential uses as an alternative to proton exchange membranes in MFC system.

The strain, *G.* species NOK21, was not different from *G. hansenii* with respect to cell shape and size, and physiological characteristics. This supports the previous report that 1,380bp nucleotide sequences of 16S-rRNA gene from the *G.* species NOK21 showed above 99.7% similarity to many strains belonging to *G. hansenii*.

G. species NOK21 synthesized pellicles in the liquid medium containing 1~3% ethanol but not in the medium containing above 4% ethanol due to the tolerance limit of toxicity. Meanwhile glucose in the medium promoted pellicle synthesis in the range of 1%–5% concentrations, the maximum concentration 1.4877 g/L was obtained at 5%. Addition of ethanol to the liquid medium containing glucose increased the

concentration of cellulosic pellicles.

Solid state ^{13}C -NMR analysis of the pellicle revealed that its main body was a glucose polymer like a cellulose fiber and it has some carboxylate (COO^-) carbons. The bacterial pellicle through scanning electron microscopy (SEM) was shown to have multiple layers of net-like structures with random organization of cellulose fibers. The pellicle membrane maintained hydrogel property with high water content. Even though its physical strength was weaker than commercial cation exchanger membrane Neosepta CMX, it can be improved by conditioning bacterial cultures.

Positive data for the use of the bacterial cellulosic membranes in MFC was that the bacterial membrane had about 3-fold higher efficiency than plastic membrane Neosepta CMX in generation of electricity. MFC with dual chamber system constructed for this study responded normally to the change of anode surface area, the presence of electron mediator and aeration. Moreover $150\sim 200\text{ mW/m}^2$ (per anode surface area) of electrical power was generated stably in our MFC which had bacterial cellulosic membranes as proton exchange membranes. The power was considerable in comparison with those $18\sim 3,600\text{ mW/m}^2$ that were obtained by other researchers under similar conditions.

This study opened for the first time the possible use of bacterial celluloses from *G.* species NOK21 as an alternative to the proton exchange membrane in MFC.

1. 서론

화석연료 사용량 증가로 인하여 대기 중의 이산화탄소 농도가 증가하고, 이산화탄소의 온실효과로 지구온난화가 가속화 되면서 전 세계적으로 가뭄, 홍수 등의 기상이변으로 인한 자연재해가 발생하고 있다. 이러한 지구온난화를 완화하기 위한 노력의 일환으로 재생 가능한 바이오에너지(bioenergy)를 대체에너지로 이용하려는 노력이 이루어지고 있다.

바이오에너지는 지속가능한 바이오매스(biomass) 자원을 기질로 사용하여 생산되는 에너지로 친환경적이다. 바이오에너지 생산의 중심체는 미생물로 이들의 생리화학적 기능을 활용한 메탄(methane), 에탄올(ethanol), 부탄올(butanol), 바이오디젤(biodiesel) 그리고 미생물연료전지(microbial fuel cell, MFC) 등 다양한 형태의 에너지 활용 연구가 이루어져 왔다[1].

특히, 메탄은 인분, 축산분뇨와, 음식물 쓰레기 그리고 농산 부산물 등 저급의 폐자원을 활용하여 생산할 수 있다. 메탄 발효는 혐기적 분해과정으로 고분자 유기화합물이 일차적으로 저분자 화합물로 분해되고, 이차적으로 유기산과 이산화탄소로 변환된 다음 최종적으로 메탄이 생성된다. 유기물이 분해되어 메탄이 생산되는 과정은 메탄세균을 비롯한 여러 종류의 미생물들이 협동작용으로 이루어진다. 메탄가스의 생산은 고가의 시설이나 고도의 기술이 필요하지 않고, 관리운용도 간편해서 좋다. 그렇지만 에너지 생산용 시설보다는 가축분뇨를 처리하는 시설로 보다 적합하다[2].

연료용 바이오에탄올은 기원전부터 인류가 이용해 온 주류 양조 공정을 변형시킨 방법으로 포도당, 전분 등의 유기화합물을 원료로 사용하여 산업화시키는데 성공하였다. 그러나 생산 기질인 전분이 식량자원이라는 점에서 윤리적인 문제점이 제기되었고, 전분을 섬유소로 대체하려는 시도가 가시적인 성과를 거두고 있다[3,4].

부탄올은 절대 혐기성 세균인 *Clostridium acetobutylicum* 의 acetone-butanol-ethanol(ABE) 발효 작용으로 생산된다. 이런 부류의 세균은 전분이나 섬유소 등의 다당류를 기질로 사용하여 용매에 해당하는 아세톤(acetone), 부탄올(n-butanol), 에탄올(ethanol)과 이산화탄소와 수소가스를 부산물로 생산한다[5]. 부탄올의 발효생산에는 폐자원과 오수(폐수), 전분 등 저렴

한 기질이 사용될 수 있다. 연료로서 부탄올은 에너지 밀도가 높고 가솔린과 혼합될 수 있으며, 기존 휘발유 차량의 엔진을 개조하지 않고도 가솔린 대신에 사용될 수 있다. 뿐만 아니라, 에탄올과 달리 기존 연료의 수송·저장 인프라를 그대로 이용할 수 있는 장점도 갖고 있다[6].

바이오디젤은 식물성 또는 동물성 오일이 아니라, 세포내에 지질을 축적하는 종류의 미세조류(microalgae)를 배양하여 얻은 균체로부터 오일을 분리 정제하고, 가공하여 얻을 수 있는 연료이다. 미세조류는 이산화탄소를 탄소원으로 태양 에너지를 이용하여 자라면서 오일 등 각종 유기화합물을 만들어낸다. 이들 미세조류는 일반 식량작물보다 성장속도가 20~30배 빠르기 때문에 단위시간, 단위면적당 오일 생산량이 식물체에 비해서 10~300배 이상 많다[7].

미생물연료전지는 바이오매스를 기질로 사용하여 전기(electricity)를 생산 공급하는 시스템으로, 전지 안에서 미생물이 생육 중에 다양한 형태의 유기 및 무기 물질을 산화시키고, 이때 생기는 생물학적 에너지가 전기에너지로 전환된다.

대부분의 세균 세포는 유기물을 산화시킬 때 발생하는 전자를 세포막에 위치한 전자전달계(electron transport system, ETS)를 거쳐 제거하면서 에너지(ATP)를 생산한다(Fig. 1). NADH가 양성자(H^+ , proton)와 전자를 세포질에서 세포간극(periplasmic space)으로 운반해주고, 이어서 양성자는 세포막을 통과하여 세포 밖으로 배출되고, 전자는 일련의 단백질 분자의 매개로 세포막을 따라서 운반된다. 양성자가 세포 밖으로 배출됨으로써 세포막을 경계로 양성자 농도 구배가 형성되고, 양성자의 농도차(proton motive force)가 생물학적 에너지인 ATP 생산에 이용된다. 전자는 최종적으로 산소와 반응하고 양성자와 결합하여 물 분자가 생성된다. 이런 과정을 산화적 인산화(oxidative phosphorylation)라고 한다. 이와 같은 세균의 에너지를 생산하는 과정에 개입하여, 화학에너지인 ATP의 생산에 이용되는 힘을 가로채서 전기에너지 생산에 이용하는 장치가 미생물연료전지이다[8]. 최초의 미생물연료전지는 1911년 포터에 의해 연구되었지만 그 후 오랜 동안 1980년까지 주목받지 못하였다. 1990년 초에 연료전지에 높은 관심과 더불어 미생물연료전지의 연구도 활발하게 진행되었다. 21세기에 들어서 미생물연료전지의 실용화는 오페수의 처리과정에 일부 활용되는 정도에 그치고 있으며, 대중화를 위해서는 극복해야할 과제들이 많다.

Electron transport system in bacterial cell membrane

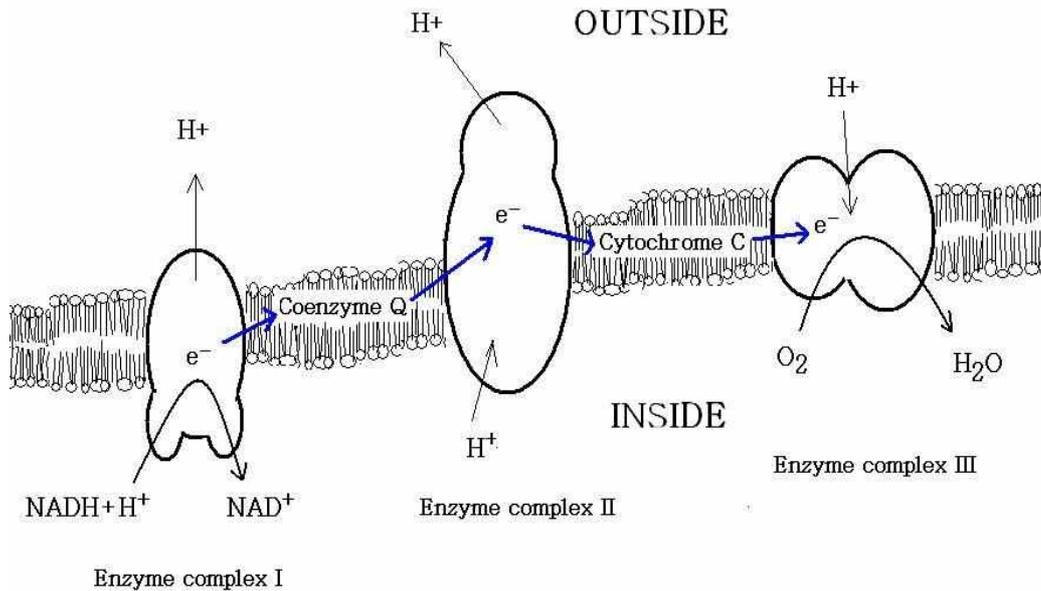


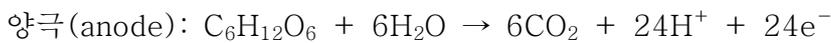
Fig. 1. Electron transport system in bacterial cells.

초기의 미생물연료전지는 전자를 전달할 수 있는 Fe(III) 등과 같은 화학물질인 전자전달 매개체가 필수적이었으나 1999년 Kim 등[9]에 의해 별도의 매개체 없이 전자를 생산할 수 있는 전자방출균(exoelectrogen)인 *Shewanella*속 세균의 발견으로 인하여 미생물연료전지는 급속도로 발전하였다. 특정 미생물은 전자를 세포 밖으로 이동시키는데 이를 전자방출균이라 한다. 이들은 직접 바이오필름을 형성하여 전극에 전달하는 전자 공여체 역할을 하게 되면서 특별한 별도의 장치 없이 전류를 생성할 수 있기 때문에 경제적이다[10,11].

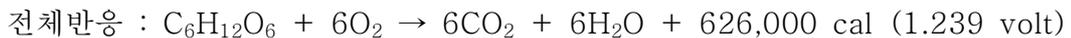
연료전지의 설계와 구조에 따라 운용조건과 전력생산 효율에 많은 변화가 있으나, 미생물 연료전지는 기본적으로 양극부(anode)와 음극부(cathode)로 나누어져 있으며, 양극부와 음극부 사이에는 양이온 교환막이 가로 놓여있는 구조를 이룬다. 양극부에서는 혐기성 미생물들이 유기물을 영양원으로 이용하여 생육하고 있는데, 혐기적인 조건에서 유기물들이 미생물에 의하여 산화된다. 산화반응에서 발생한 수소와 전자는 각각 양이온교환막과 외부전기회로를 통하여 음극부

로 전달된다. 음극부는 호기적인 조건을 유지하는데, 산화환원 화학반응을 촉진하기 위하여 용존산소의 농도를 높이려는 목적으로 폭기 장치가 부설된다. 음극부에서는 최종적으로 산소, 수소, 전자가 만나서 물 분자가 생성된다. 이와 같은 유기물의 산화와 그에 따른 전자와 양성자의 이동이 반복됨으로서 외부 전기회로에 전류가 흐르게 되어 전기에너지를 얻는다[12,13].

세균의 영양원인 유기물을 대표하는 포도당(glucose, $C_6H_{12}O_6$)를 기질로 이용할 경우 양극부와 음극부에서 일어나는 반응식은 다음과 같다.



위와 같이 포도당 1몰(mole)이 완전히 산화되는 경우 이론상 얻을 수 있는 에너지는 다음과 같다.



이런 산화환원 반응을 통하여 얻는 전기 에너지는 다음과 같이 계산된다.

$$\Delta G = -n \times F \times \Delta V$$

ΔG : 깁스자유에너지(Gibbs free energy, cal 또는 joule, 1cal = 4.184 Joule, Joule = Coulomb · Volt)

n: 전자의 몰 수(mol)

F: Faraday 상수(96,485 coulomb/mol)

ΔV : 전위차(volt)

미생물 연료전지의 구조는 크게 단일반응조 시스템(single chamber system)과 이중반응조 시스템(dual chamber system)으로 나뉜다(Fig. 2). 단일반응조는 분리되지 않은 하나의 반응조에서 산화환원 반응이 일어나게 되어있어서 양성자이온을 선택적으로 투과시키는 분리막을 필요로 하지 않는 장점이 있으나,

음극부에 들어있는 용존산소가 양극부로 전해지면 그곳에서 생육중인 전자방출균과 같은 혐기성미생물의 생육을 저해시키는 단점이 있다. 또한 양극부에 있어야 할 유기물들이 음극부 방향으로 이동할 경우에는 전자를 방출하고 전달하는 이외의 미생물들이 증식하여 전기에너지 생산에 부정적인 영향을 미칠 수 있다. 그런 이유로 단일반응조보다는 이중반응조 시스템이 많이 연구되고 있다[14].

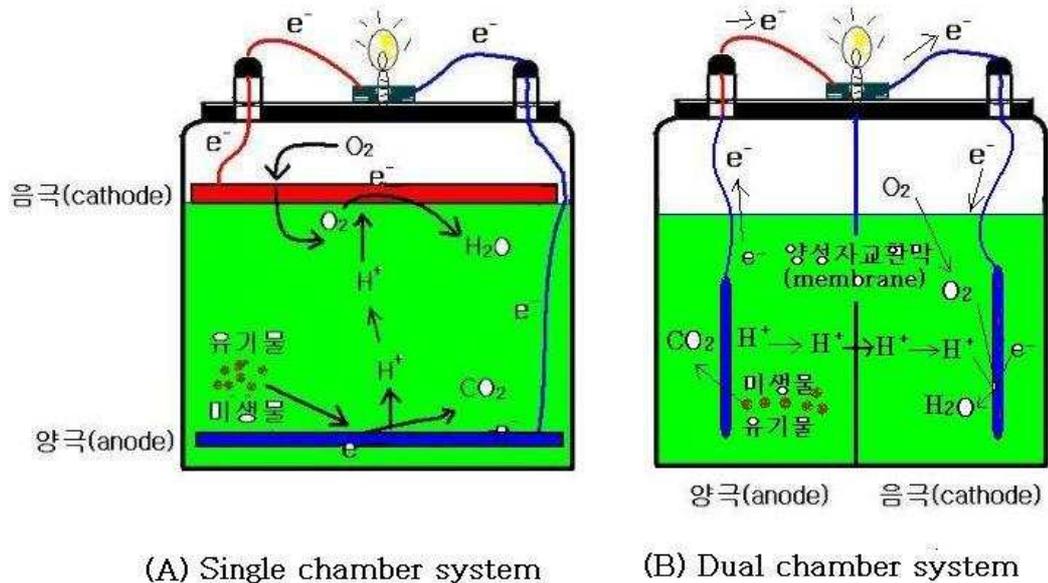


Fig. 2. Types of microbial fuel cell systems.

각각 양극부와 음극부에 들어있는 전극은 전자를 전달하는 역할을 하며 전극을 만든 재료에 따라 미생물연료전지의 성능이 달라진다. 전극이 갖추어야 할 조건으로는 전기 전도성이 뛰어나고 장기간 물속에서 사용되어도 부식되지 않아야 한다는 점이다. 구리, 철과 같은 금속이 높은 전도성을 나타내지만 물속에서 잘 부식되고 비용이 높기 때문에 실용가능성은 낮다. 그래서 최근에 성능은 낮지만 비용이 비교적 저렴한 탄소재질의 전극을 이용한 연구가 이루어지고 있다[15].

미생물 연료전지를 구성하는 부품 중 양극부와 음극부를 가르는 선택적 투과막은 수소 양이온(양성자)을 잘 통과시키되 다른 이온들의 통행을 제한하고, 양극부와 음극부의 물질이 서로 섞이지 않도록 아주 미세한 공극을 갖고 있어야 한다. 일반적으로 양성자만을 선택적으로 전달하기 위하여 양성자교환막(proton

exchange membrane; PEM)의 사용이 권장되나 이러한 특수용도의 막은 고도의 제조기술이 요구되는 고가의 막이다. PEM을 대체할 수 있는 양이온교환막(cation exchange membrane; CEM)은 비교적 저렴한 반면에 양성자 이외에도 여타 다른 양이온들을 투과시키는 특성을 갖고 있다. 그 이외에도 선택성 투과성은 떨어지나 양극성 교환막(bipolar exchange membrane)등이 사용되고 있으며, 부직포, 한외여과막, J-cloth 등도 이용 가능성이 확인되었다[16].

위와 같은 종류의 분리막(또는 교환막)은 사용 중에 오염되어 공극이 막히게 되고, 이로 인하여 양성자의 이동이 제한됨으로써 발생하는 전류량이 저하된다. 일단 공극이 막힌 분리막은 화학물질로 세척하여도 고유의 성능을 회복하기 어려워 일회성 사용에 그치게 되고, 운전 비용을 고려할 때 구입단가가 높기 때문에 실용화에 걸림돌이 되고 있다[17]. 따라서 이러한 분리막의 문제점을 해소하기 위하여 비용이 저렴하며 친환경적 분리막에 대한 연구가 필요한 실정이다.

분리막은 고분자(polymer) 화합물로 석유 화합물을 원료로 사용하여 만들어진 합성고분자(synthetic polymer)와 생물체 기원의 생물고분자(biopolymer)로 나뉜다. 합성고분자의 경우 석유자원의 고갈과 난분해성 그리고 지구 온난화를 부추긴다는 문제점을 갖고 있다. 이에 반해서 생물고분자는 무한정 지속적으로 재배 가능한 광합성 생물체를 원료로 사용하여 만들어지기 때문에 지속가능하고, 대기 중의 이산화탄소의 증가와 무관하며, 재생가능하다. 또한 생물고분자는 미생물의 작용으로 쉽게 이산화탄소와 물로 분해되는 생분해성이 있어서 플라스틱 합성고분자와 같은 환경오염의 문제를 일으키지 않는다.

다수의 생물고분자가 유기물을 기질로 이용한 미생물의 생리작용으로 합성된다. 미생물이 생산한 생물고분자는 배양 및 생산조건에 따라 구성성분, 반복단위체, 분자량, 결합양식, 결합위치 및 곁가지가 다른 다양한 형태로 존재한다. 그중에서도 산업적으로 유용한 고분자화합물로 dextran, pullulan, xanthan gum, levan, gellan gum, poly- β -hydroxyalkanoate (PHA) 및 polyglutamic acid(PGA), curdlan, wellan, rhamsan 등이 있다[18]. 이들은 해조류 또는 식물기원의 고분자 고갈로 중요성이 더해지고 있다. 특히 생물고분자의 종류에 따라 그 활용 분야가 다양하고, 유전자 조작을 통한 균주의 개량으로 수율의 증대와 분자구조의 변경 등이 용이하며, 발효법을 이용하여 때와 장소에 구애 받지

얇고 대량생산될 수 있다[19].

본 연구에서 미생물전지용 선택적 투과막으로 사용한 섬유소 막(cellulosic membrane)은 비교적 오랜 연구 역사를 갖고 있다. 초산균이 포도당과 산소가 있는 환경에서 얇은 피막을 만드는 현상이 Brown(1886년)에 의해 발견되었고, 1950년대에 들어서 배양액의 상층부에 생기는 피막의 정체는 섬유소라는 사실이 Schramm과 Hestrin에 의해서 처음으로 입증되었다[20,21,22]. 섬유소는 식물체의 고유 구성분이라고 알려졌던 당시에는 획기적인 발견이었다. 그 이후에는 별로 연구자의 관심을 끌지 못하였으나, 2000년대에 들어서 세균성 섬유소의 가치는 재조명받고 있다. 초산발효 또는 양조 과정 중에 초산균의 오염으로 발효액의 상층부에 피막을 형성하는 현상이 관찰되어, 이 피막이 식물 세포벽의 성분인 cellulose와 동일하다고 보고되었다[23].

Cellulose 피막을 형성하는 대표적인 균주로는 초산발효세균의 일종인 *Gluconacetobacter xylinum* (과거에는 *Acetobacter xylinum*으로 분류되어 왔음)이 잘 알려져 있으며, 이 외에도 식물과 공생관계를 맺고 있는 *Rhizobium*속과 *Agrobacterium*속 세균들이 보고되어 있다. 식물의 cellulose는 lignin과 hemicellulose인 heteropolysaccharide로 이루어진 1차구조의 β -1,4-glucan으로 이루어져 있는 반면에 미생물이 생산하는 cellulose는 99%이상 포도당(glucose)의 순수한 β -1,4 결합으로 이루어져 있는 나노(nanometer) 크기의 3차원 망상구조를 가지고 있다. 이러한 구조로 인하여 세균성 섬유소는 흡착성, 보수성, 현탁 안전성, 결합성 등의 물리적 성질이 우수하다. 그와 더불어 사용목적에 적합한 형태의 섬유소막을 생산할 수 있기 때문에 인공피부, 방탄조끼, 스피커의 진동판, 식이섬유 등 다방면으로 활용되고 있다[24,25].

*Gluconacetobacter*속 세균은 $0.6\sim 1.2\times 1.0\sim 3.0\ \mu\text{m}$ 크기의 단간균으로 그람음성이며 세포 단독으로 존재하거나 몇몇 세포가 이어져 짧은 사슬을 형성한다. 주모성 편모를 갖고 있어 운동성을 나타내며 내생포자는 만들지 않는다. 산소를 최종전자수용체로 이용하는 절대호기성인 *Gluconacetobacter*속 세균은 전자전달계에 참여하는 유비퀴논이 Q_{10} 형이며, 세포막을 구성하는 지방산은 주로 직쇄 불포화산인 C18:1 ω -7(vaccenic acid)이다. 에탄올을 산화시켜 초산을 만들뿐만 아니라 초산을 더 산화시켜 물과 이산화탄소를 생성함으로 에탄올 발효

또는 초산발효를 방해할 수도 있다. 이러한 섬유소 막의 생성, 에탄올의 산화 그리고 초산의 과산화는 세균 중에 따라 다르다. 이들 세균의 주요 탄소원은 포도당, 에탄올, 초산이며, 각각의 농도에 따라 생육 양상은 다르게 나타난다. 생육에 가장 적합한 온도는 30℃이며, pH 범위는 2.5~6.0이다. 이들은 자연발효 식초, 차, 사탕수수, 꽃, 과일 등에서도 발견되며 주로 음료나 알코올을 포함한 액체에 오염을 일으킨다[26]. 세균의 이러한 생육적 특성을 고려하여 섬유소피막을 생산하기 위하여 인공 배양할 때, 잡균의 오염을 방지하기 위한 특수한 설비나 균체의 생육을 위한 특수한 영양분이 요구되지 않을 것으로 판단된다.

또한, *Gluconacetobacter*속 균주는 포자를 생성하지 않지만 다양한 방법으로 장기간 보존이 가능한 것으로 알려져 있다. 한천고체배지에 배양하여 4℃에 보관하면 3주 이상 유지할 수 있다. 동해방지제인 glycerol을 섞으면(24%) -75℃에서 장기간 보존 가능하며, 동결 건조시켜서 보관한 후에도 균의 재생이 가능하다. 또 다른 방법은 액체질소를 이용하는 방법으로 균을 AE 액체배지(0.5% glucose, 0.2% yeast extract, 0.3% peptone, 4% acetic acid, 3% ethanol)에 배양하여 대수증식기 후에 10℃에서 ×3,000 rpm으로 원심분리한 후, 균체를 회수하고 20% 맥아추출물에 현탁시킨 후, 액체질소 탱크에 넣고 냉동시켜 장기간 보관할 수 있다[26].

*Gluconacetobacter*속 세균 중에서도 특히 *G. hanseni*는 *G. xylinum*처럼 섬유소성 고분자 생산 능력이 뛰어난 것으로 알려져 있다[27]. *G. hanseni* 세포의 형태나 집락의 특성은 다른 *Gluconacetobacter*속 세균과 같으며, 포도당이외에도 잘 이용하는 탄소원으로는 glycerol, D-mannitol 그리고 sorbitol이 있다. 배지중에 탄소원으로 에탄올만 존재할 경우에는 세포 증식이 불가능하다. 대부분의 균주는 포도당으로부터 2-keto-gluconic acid를 생성하며, 초산은 ethanol, n-propanol, n-butanol, D-mannose, D-glucose 등이 산화되어 생성된다[26].

*G. hanseni*에 의한 섬유소막의 생산은 영양요구조건이 매우 단순하며, 비교적 순도가 높은 섬유소막을 다양한 형태로 만든다. 또한 미생물의 순수 배양 중에 발생하는 가장 심각한 문제인 잡균에 의한 오염도 이 세균의 배양에서는 심각한 장애가 되지 않는다. 에탄올을 함유한 산성의 배지에서 곰팡이의 생육을 저지함

으로서 단순한 영양원과 배양시설을 이용하여 섬유소막을 대량 생산할 수 있는 장점이 있다. *G. hansenii*로 추정되는 *Gluconacetobacter* species NOK21 (*G. species* NOK21) 균주를 이용한 기존의 연구[28]에 이어서, 섬유소 막 (cellulose membrane) 제조를 위한 생산조건을 파악하고자 하였다. 또한, 이 세균성 섬유소 막을 미생물연료전지용 양이온교환막으로 활용하고자 물리, 화학적인 구조 및 성질을 조사하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 균주의 배양 및 특성

2.1.1. 균주의 배양

섬유소 막을 제조하기 위하여 제주대학교 식품생명공학과에서 분리한 *G. species* NOK21 균주[28]를 사용하였으며, 균주의 배양에는 기본적으로 SH(Schramm-Hestrin)배지(20 g/L dextrose, 5 g/L yeast extract, 5 g/L bactopectone, 2.7 g/L Na₂HPO₄, 1.15 g/L citric acid)[20]를 사용하였고, 배양온도는 28.5℃였다.

2.1.2. 균주의 생리화학적 특성

분리된 균주의 생리화학적 특성을 확인하기 위하여 API(Analytical Profile Index) 50CHB/E kit(Biomérieux Co., France)를 사용하였다. 제조사의 권장 방법에 따라 균체를 접종하였고, 28.5℃에서 24시간과 48시간 배양 후에 색상의 변화를 기록하였다.

2.2. 섬유소 막의 합성에 미치는 포도당과 에탄올 농도의 영향

2.2.1. 포도당 농도의 영향

SH 배지 조성 성분 중에서 *G. species* NOK21 균주의 영양원으로 작용하는 포도당을 각각 1%, 2%, 3%, 4%, 5% 농도로 달리하여 만들고 300 ml씩 삼각 플라스크에 넣었다. 사전에 준비해두었던 건강한 상태의 *G. species* NOK21 배양액을 각각 1 ml씩 섞어서 배지에 접종하였다. 접종된 배지를 8일 동안 29℃로 정치배양 시킨 후에 생성된 섬유소막을 회수하여 증류수로 3회 세척하였으며, 50℃ 건조기에서 12시간 건조시켜 무게를 측정하였다.

2.2.2. 에탄올 농도의 영향

SH배지를 멸균시킨 후 94% 에탄올을 섞어서 배지 중의 에탄올 최종농도가

1~8% 되도록 만들었다. 에탄올 함유 SH배지를 각 100 ml씩 삼각플라스크에 넣고, 사전에 준비해두었던 *G. species* NOK21 배양액을 각 1 ml씩 접종하였다. 접종된 배지를 10일 동안 29°C로 정치배양 시킨 후 생성된 섬유소막을 회수하여 증류수로 3회 세척하였으며 50°C 건조기에서 12시간 건조시켜 무게를 측정하였다.

2.3. Solid-state ^{13}C -NMR을 이용한 구조 분석

초산발효과정에서 생긴 피막(pellicle)이 어떤 종류의 생물고분자(biomembrane)인지 확인하고자 하였다. *G. species* NOK21을 SH배지에 정치배양 하였을 때 표면에 생성된 불용성 피막을 회수하여 90°C에서 1시간 동안 0.5 M NaOH 용액에 담가서 부착된 세포를 분해시킨 후, 세척액의 pH가 7.0에 도달할 때까지 과량의 증류수에 침지 후 짓는 방법으로 3회 이상 세척하고, 이어서 90°C에서 12시간 건조시켰다(A). 또한 위와 같은 방법으로 균주를 배양하고 피막을 회수한 후 여분의 증류수에 침지 후 저으면서 수차례 세척하여 불용성 협착물과 가용성 성분을 제거한 후 동결건조기에서 12시간 동결 건조시켜서(B), 두 종류의 피막시료를 얻고, 각각의 시료를 고체 ^{13}C -NMR spectroscopy로 분석하고 비교하였다[29]. ^{13}C -NMR 분석에 사용된 기기는 400MHz Solid-state NMR (한국기초과학지원연구원 서울서부센터)이며, ^{13}C CP/MAS (cross-polarization/magic-angle spinning) 방법으로 분석하였고, 운용조건은 다음과 같다: spinning rate, 8 kHz; delay time(d1), 3 sec; contact time(p15), 2 ms; radio frequency, 100.623 MHz; calibration, TMS(tetramethylsilane) (0 ppm).

2.4. 섬유소 막의 물성 분석

G. species NOK21를 SH배지에 배양하여 생성된 섬유소 피막을 수거하여 과량의 증류수로 씻고, 70% 에탄올에 1시간 침지 후 살균시켰다. 피막에 남아있는 에탄올을 제거하기 위해서 증류수로 충분히 세척한 후 0.5 M NaOH 용액에 1시간 동안 침지하여 세균 세포를 제거하였다. 세척액의 pH가 7.0에 도달할 때까지 증류수로 수차례 반복해서 세척한 후 물성 분석용 시료로 사용하였다.

2.4.1. 섬유소막의 함수율 및 재수화율

위와 같이 준비된 섬유소 피막의 함수율과 이에 따른 복원율을 알아보기 위해 초기 무게를 측정 후 건조기에서 12시간 동안 70℃로 건조 후 무게를 측정하였다. 재수화율은 건조된 시료를 증류수에 12시간 침수 후 무게를 측정하였으며, 다음 식과 같이 계산했다.

$$\text{함수율(\%)} = (W_1 - W_2) / W_1 \times 100$$

W_1 : 초기 시료 무게 W_2 : 건조 후 시료 무게

$$\text{재수화율(\%)} = (W_3 - W_4) / W_3 \times 100$$

W_3 : 재흡수 된 시료 무게 W_4 : 건조 후 시료 무게

2.4.2. 섬유소막의 기계적 강도 측정

위와 같이 준비된 섬유소 피막을 12시간 동안 70℃에서 건조시켜서 기계적 강도를 측정하기 위한 시료로 사용하였으며, 수 처리에 사용되는 양이온교환막을 비교 대상으로 사용하였다. Rheometer(compac-100II, Sun scientific, Japan)를 이용하여 probe의 진입에 소요되는 힘을 측정하였으며, 운용조건은 다음과 같다: table speed, 60 mm/min; load cell(max), 10 Kg(20 Kg); adaptor, penetration 5 mm.

2.5. 섬유소막의 주사전자현미경 분석

섬유소막의 형태를 관찰하기 위하여 주사전자현미경(Scanning Electron Microscopy, SEM) 분석을 실시하였다. *G. species* NOK21를 SH배지에 배양하여 얻은 섬유소막을 에탄올로 탈수시켰다. 탈수에 사용된 에탄올의 농도는 50%, 70%, 90%, 95%, 100%로, 낮은 농도에서 시작하여 점진적으로 높은 농도의 에탄올을 사용하였으며, 각각의 에탄올 용액에서 10분씩 탈수시켰다. 탈수 후 시료 중에 남아있는 에탄올은 isoamyl acetate로 치환시켜 제거하였다. 치환 과정은 isoamyl acetate와 ethanol의 비율을 농도별로 30%, 50%, 70%, 100%로 하여 각 용액에 10분씩 담가 순차적으로 처리하였다. 시료를 건조시키

는 마지막 단계에 임계점 건조기(critical point dry)로 건조시킨 후, 1 mA로 90초 동안 백금으로 시료의 표면을 코팅시켰다. 이와 같이 준비된 시료를 Field Emission SEM(JSM-6700F, JEOL Ltd, Japan)으로 1,000~35,000배 확대하여 관찰하였다.

2.6. 미생물 연료전지의 구성 및 운전조건

2.6.1. 미생물 연료전지 구성

본 실험에 사용된 미생물연료전지는 양극과 음극 두 개의 방으로 나누어진 이중반응조로 자체 제작하여 사용하였다(Fig. 3). 아크릴을 주재료로 사용하여 총 부피 80 L 크기로 제작하였고, 양극부와 음극부 각각 45 L, 35 L로 하였다. 각 방의 작업용량은 양극부는 20.7 L, 음극부는 13.8 L이다. 양극부와 음극부 상부에 원형의 밀봉 캡을 설치하여 구리선을 연결한 흑연전극(carbon plate, $200 \times 100 \times 1 \text{ cm}^3$, 표면적 = 460 cm^2)을 고정시켰다. 아크릴 판을 이용하여 양극부와 음극부를 분리하였으며, 양극 간에 이온교환막을 설치 및 교환할 수 있도록 직경 9 cm의 원통형 관을 가운데에 고정하였고, 누수를 방지하기 위해 고무 패키징을 이용하였다. 양전극을 연결한 구리선에 1Ω 의 외부저항을 연결하였으며 음극부에는 용존산소농도를 높이기 위해 폭기(aeration) 장치를 설치하였다. 이온교환막으로는 *G. species* NOK21 균주가 합성한 섬유소막과 양이온교환막(Neosepta CMX)을 사용하여 비교하였다. Neosepta CMX(Astom Co., Japan)은 물리적 강도가 높고 sulfonate($-\text{SO}_3^-$)를 작용기로 갖는 강력한 양이온선택성투과막으로 해수의 탈염 등 수 처리에 널리 사용되고 있다.

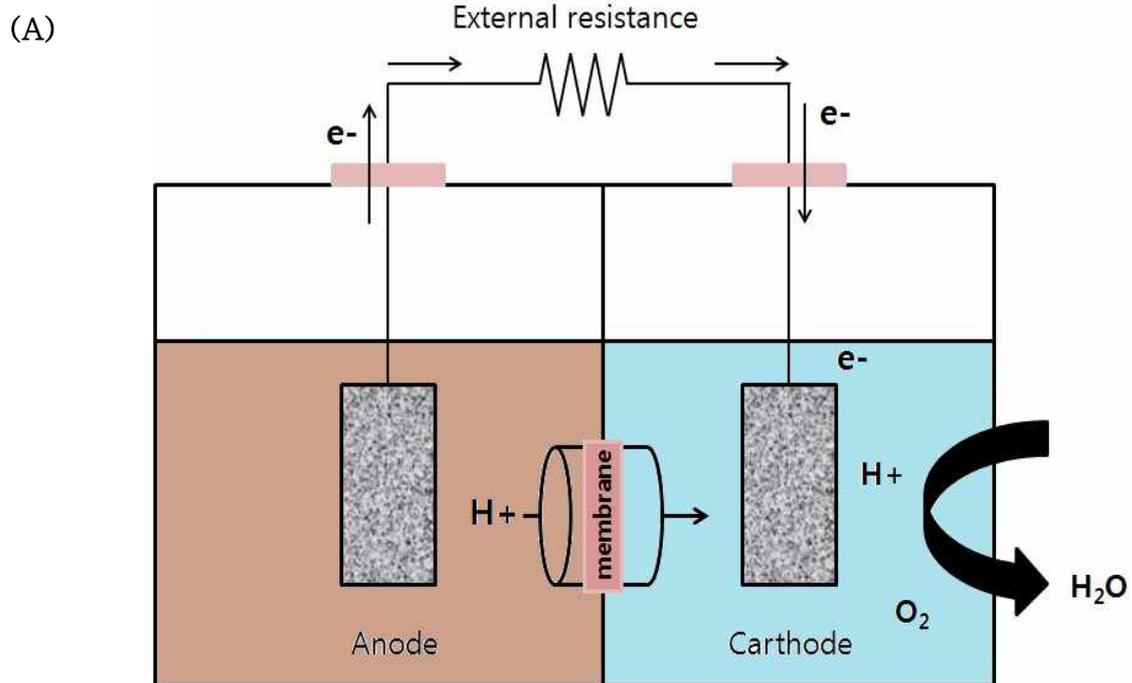


Fig. 3. Microbial fuel cell constructed in this study.

A, Schematic diagram of microbial fuel cell; B, A photograph of microbial fuel cell.

2.6.2. 미생물 연료전지의 운전 조건

미생물 연료전지에서 산화가 일어나는 양극부에 사용할 미생물로 저수지(애월읍 수산리 소재) 밑바닥의 퇴적토를 취하여 물과 3:1 비율로 혼합하여 식중하였다. 작업 용량의 2%에 상당하는 포도당을 투입하여 에너지 생산용 기질로 사용하였다. *G. species* NOK21 균주가 합성한 섬유소막의 성능을 조사하기 위하여 동일한 조건에서 직경 9 cm의 섬유소막과 양이온교환막을 각각 설치하여 장기간 전류의 변화를 측정하였다. 흑연전극의 표면적이 전력생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 양극부에 전극(carbon plate, 200×100×1 cm³)을 2개 또는 3개를 사용하는 방법을 선택하였다. 또한 음극부에서 용존산소의 농도가 전력생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 폭기 시킨 경우와 그렇지 않은 경우를 비교하였다. 그리고 세균 세포와 양극 간에 전자의 전달을 매개할 수 있는 neutral red가 전력생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여, neutral red를 최종 농도 1 μM 또는 100 μM이 되도록 양극부에 주입하여 전력의 변화를 측정하였다.

2.7. 통계분석

통계분석은 SPSS program (ver.18.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하였으며, 유의적 차이는 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 균주의 배양 및 동정

G. species NOK21 균주를 액체배지에 정지배양한 결과, 공기와 직접 접촉하는 배지 표면에 피막을 형성하였다(Fig. 4A). 배양 시간의 경과에 따라 피막의 두께가 증가하면서 배양액의 밑으로 가라앉으면, 표면에는 다시 새로운 피막이 생성되었고, 이러한 과정은 탄소원인 포도당이 전부 소모될 때까지 반복되는 것으로 확인되었다(Fig. 4B).

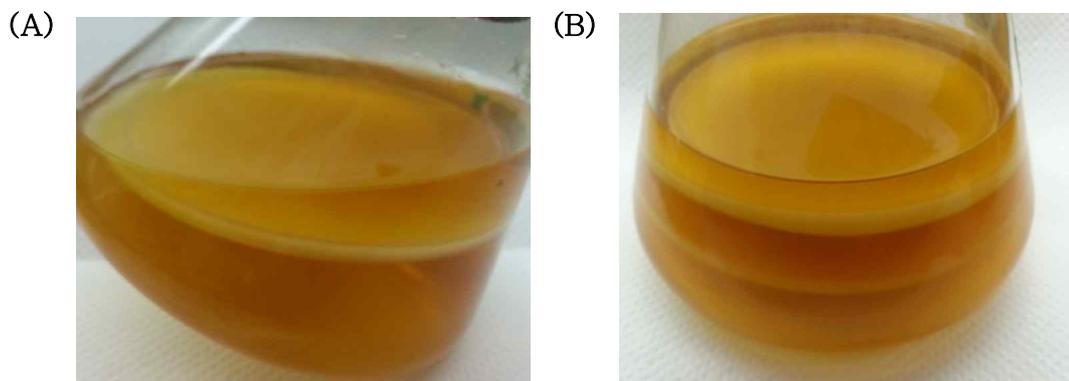


Fig.4. Morphology of an *Gluconacetobacter* species NOK21 in static liquid cultures.

A, a pellicle on surface of SH broth; B, pellicles submerged in SH broth.

G. species NOK21 균주의 각종 탄소원 이용 여부를 API 50CHB/E kit로 검사하였다. 그 결과, D-glucose, N-acetylglucosamine, potassium gluconate, 2-keto-gluconate, 5-keto-gluconate에서 양성반응이 나타났다(Table 1). 이 균주가 포도당 이외에 gluconate를 잘 이용하는 점은 *G. hansenii*의 특성과 같다[27]. 이는 *G. species* NOK21 균주의 16S-rRNA 유전자 일부 염기서열 (1,380bp)을 결정하고, 비교 분석하여, *G. hansenii*종들과 99.7% 이상 일치한다고 보고한 바 있다[28]. 각종 탄소원에 대한 반응을 해석하는데 있어서, 분석에 사용된 API 50CHB/E kit가 *Bacillus*속 세균 동정용으로 제작된 시험자재라는 점을 고려해야 한다.

Table 1. Utilization of various carbon sources by *Gluconacetobacter* species NOK21

Carbohydrate source		Result
Glycerol	D-Sorbitol	
Erythritol	Amygdalin	
D-Arabinose	Arbutin	
L-Arabinose	D-Celiobiose	
D-Ribose	D-Maltose	
D-Xylose	D-melibiose	
L-Xylose	D-Trehalose	
D-Adonitol	Inulin	
Methyl- β -D-xylopyranoside	D-Melezitose	
D-Galactose	D-Raffinose	
D-Fructose	Amidon (starch)	Negative
D-Mannose	Glycogen	(-)
L-Sorbose	Xylitol	
L-Rhamnose	Gentiobiose	
Dulcitol	D-Turanose	
Inositol	D-Lyxose	
D-Mannitol	D-Tagatose	
Methyl- α -D-mannopyranoside	D-Fucose	
Methyl- α -D-glucofuranoside	L-Fucose	
Esculin ferric citrate	D-Arabitol	
D-Lactose (bovine origin)	L-Arabitol	
D-Saccharose (sucrose)		
D-Glucose	N-Acetylglucosamine	Positive
Potassium gluconate	5-Keto-gluconate	(+)
2-Keto-gluconate		

3.2. 섬유소 막의 합성에 미치는 포도당의 영향

G. species NOK21 균주에 의한 섬유소막의 생성에 미치는 포도당 농도를 조사하였다(Table 2). 8일 동안 배양하였을 때, 포도당 농도 1%에서 섬유소막은 0.7547 g/L로 가장 적게 생성되었고, 5%농도에서는 1.4877 g/L로 가장 많이 생성되었다. 전반적으로 배지 중의 포도당 농도가 높아질수록 섬유소막의 생성량이 증가하는 경향을 보였다. 이는 섬유소막의 구성단위체가 포도당임을 고려할 때, 포도당의 농도 증가가 섬유소의 합성에 긍정적인 효과를 미치는 것으로 해석된다. 포도당, 과당, 맥아당 등의 탄소원을 2% 농도로 공급하여 *Gluconacetobacter medellensis*를 28℃에서 8일간 배양한 실험에서 0.1~3.0 g/L의 섬유소를 얻었다는 보고가 있다[30]. 섬유소 피막을 생성하는 *G. medellensis*를 여러 종류의 탄소원이 풍부한 배지에 배양하였더니, 포도당을 사용하였을 때 3 g/L로 가장 많이 생성되었으며, 반면에 자당배지에서는 2 g/L가 생산되었고 과당, 만니톨에서는 각 0.4 g/L로 적게 생산되어 과당, 만니톨은 탄소원으로 적합하지 않았다. 특히 다른 종류의 탄소원과는 달리 포도당은 에너지 원으로써 뿐만 아니라 고도의 구조를 가진 섬유소 복합체가 만들어지는데 전구 물질로써 이용되었으며 세균 배양에서 대부분 소모되었다.

3.3. 섬유소 막의 합성에 미치는 에탄올 농도의 영향

G. species NOK21은 에탄올을 산화시켜 초산을 생성하는 초산발효 세균의 일종이다. 이 세균은 에탄올에 대한 내성을 나타내며, 에탄올을 산화시켜 에너지를 획득하는 성질이 있다[28]. 그래서 배지 중의 에탄올 농도가 섬유소 막의 합성에 미치는 영향을 측정하였다(Table 3).

에탄올이 함유된 SH배지에 10일 동안 배양하였을 때, 에탄올 농도 1~3% 범위에서는 2.0~2.4 g/L에 상당하는 섬유소막이 형성된 것을 확인할 수 있었으나, 4% 이상에서는 섬유소막이 생성되지 않았다. 에탄올 농도 4% 이상에서는 에탄올의 독성으로 인하여 균의 생육이 저해된 것으로 보였다. 그러나 에탄올 농도 6%에서도 균체의 생육이 양호하였기에(미발표 자료), 에탄올에 대한 세균의 내성은 배양환경에 따라 다소 달라질 수 있으며, 5% 내외로 추정된다.

Table 2. Effects of dextrose concentration on the production of cellulosic membranes by *Gluconacetobacter* species NOK21

Dextrose concentration (%)	1	2	3	4	5
Cellulose membrane (g/L)	0.7547 ± 0.06 ^{a1)}	1.0393 ± 0.04 ^a	0.9663 ± 0.02 ^a	1.2547 ± 0.19 ^a	1.4877 ± 0.09 ^b

¹⁾Different letters in the same column mean significant differences at the $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

Table 3. Effects of ethanol concentration on the production of cellulosic membranes by *Gluconacetobacter* species NOK21

Ethanol concentration (%)	1	2	3	4	5	6
Cellulose membrane (g/L)	2.043 ± 0.03 ^{a1)}	1.956 ± 0.02 ^a	2.410 ± 0.04 ^a	– ²⁾	–	–

¹⁾Different letters in the same column mean significant differences at the $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

²⁾Not detected.

2%의 포도당을 함유한 SH배지에 에탄올을 혼합하여 배양했을 때 생성된 섬유질 피막은 2.0 ~ 2.4 g/L로 농도 간에 유의적인 차이는 없었다. 그렇지만 특이하게도 2%의 포도당만을 사용하여 배양했을 때의 약 1.0 g/L에 비해서 2배에 가까운 생산량 증가가 있었다. 이는 에탄올이 산화, 분해되어 세균의 생육에 활용되어서 포도당을 섬유소 합성에 보다 많이 투여할 수 있었기 때문인 것으로 해석된다.

3.4. 섬유소막의 구조

G. species NOK21 균주를 배양 후 얻어진 고분자 피막의 구조를 분석하고자 solid state ^{13}C -NMR spectroscopy로 구성 탄소원자를 분석하였다. 먼저 탈지면을 시료로 사용하여 구성 섬유소의 ^{13}C -NMR 스펙트럼을 얻었는데, 섬유소를 구성하는 단당체 포도당의 개별 탄소원자에 해당하는 스펙트럼을 확인할 수 있었다(Fig. 5) [29].

G. species NOK21 세균의 배양액 표면에 형성된 고분자 피막을 ^{13}C NMR로 분석한 결과, 순수한 섬유소의 ^{13}C NMR spectra과 거의 일치하는 양상을 보였다(Fig. 6). 생물고분자막 시료를 0.5M NaOH 용액으로 전처리하여 부착된 세균들을 분해하여 제거한 경우(Fig. 6A)에는 순도가 매우 높은 섬유소막이 얻어졌다. 또한 NaOH 용액을 사용하지 않고 증류수로 수차례 세척하기만 하여도, 비록 20~35 ppm 사이에 미량의 불순물이 검출되기는 했지만, 비교적 순도가 높은 섬유소막을 얻을 수 있었다(Fig. 6B). NaOH를 처리하지 않은 고분자막 시료의 경우에 174.2 ppm에서 피크가 나타났는데, 이는 carboxylate carbon에 해당된다[31].

Carboxylate(COO^-) 음이온은 섬유소 고분자막이 양이온 교환막으로 활용될 수 있음을 제시한다. *G. species* NOK21이 그람음성 세균으로 lipopolysaccharide와 같은 다당류 유도체 화합물과 인지질 등으로 구성된 외막을 가지고 있는 특성은 피막이 음전하를 띄는데 부가적으로 기여하며, 이는 피막에 존재하는 carboxylate(COO^-) 음이온과 더불어 미생물연료전지를 구성하는 양성자 투과성막으로 활용 가능성을 높여준다.

(A)

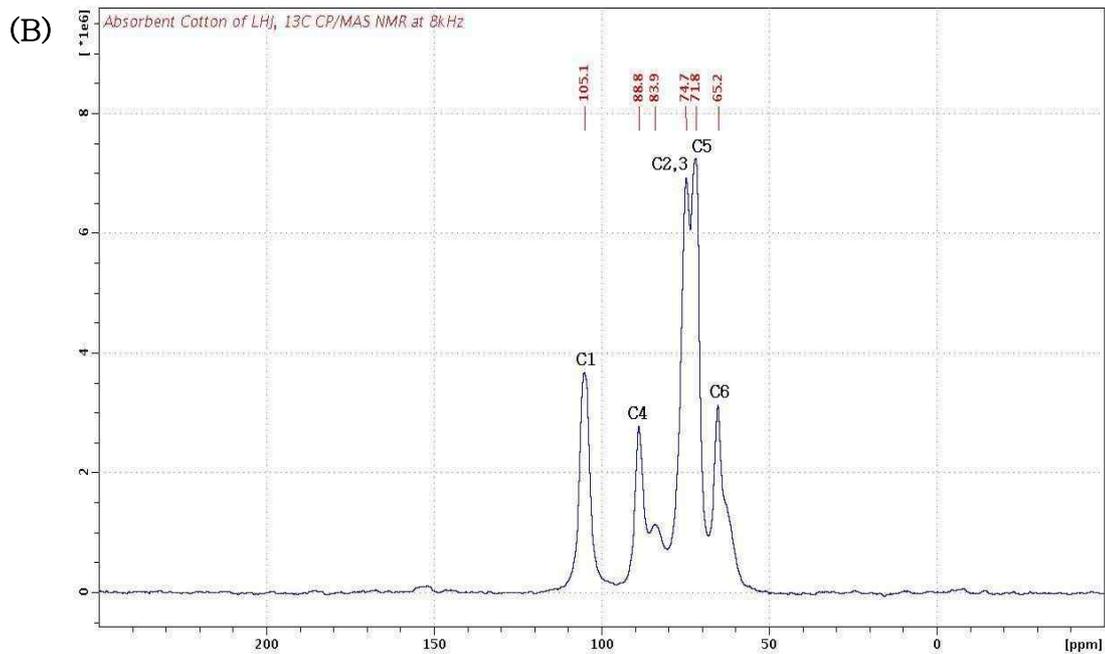
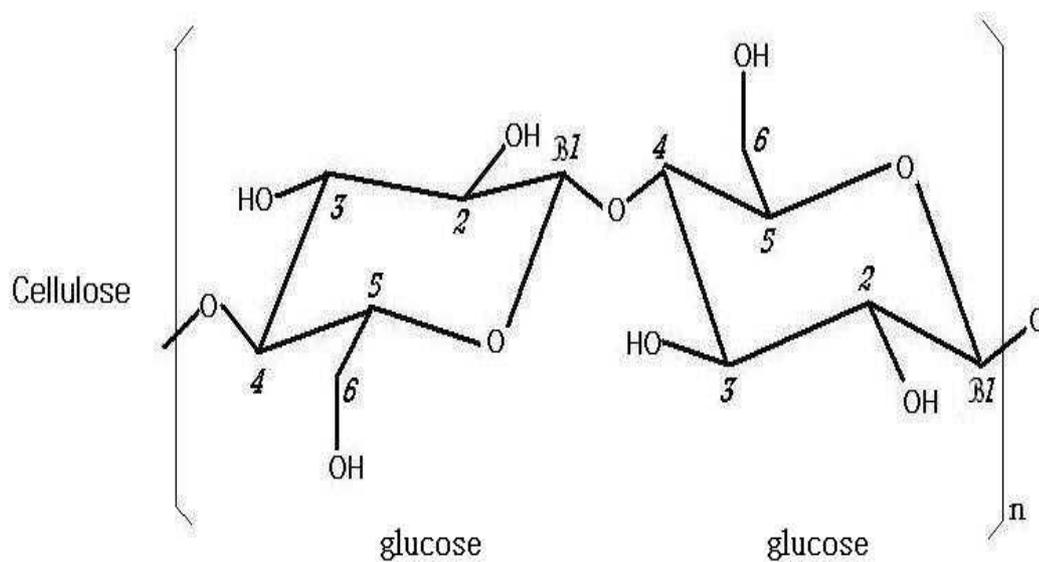


Fig. 5. Structure of cellulose polymers and their ^{13}C NMR spectra.
A, cellulose polymer structure; B, solid state ^{13}C NMR spectra of cellulose.

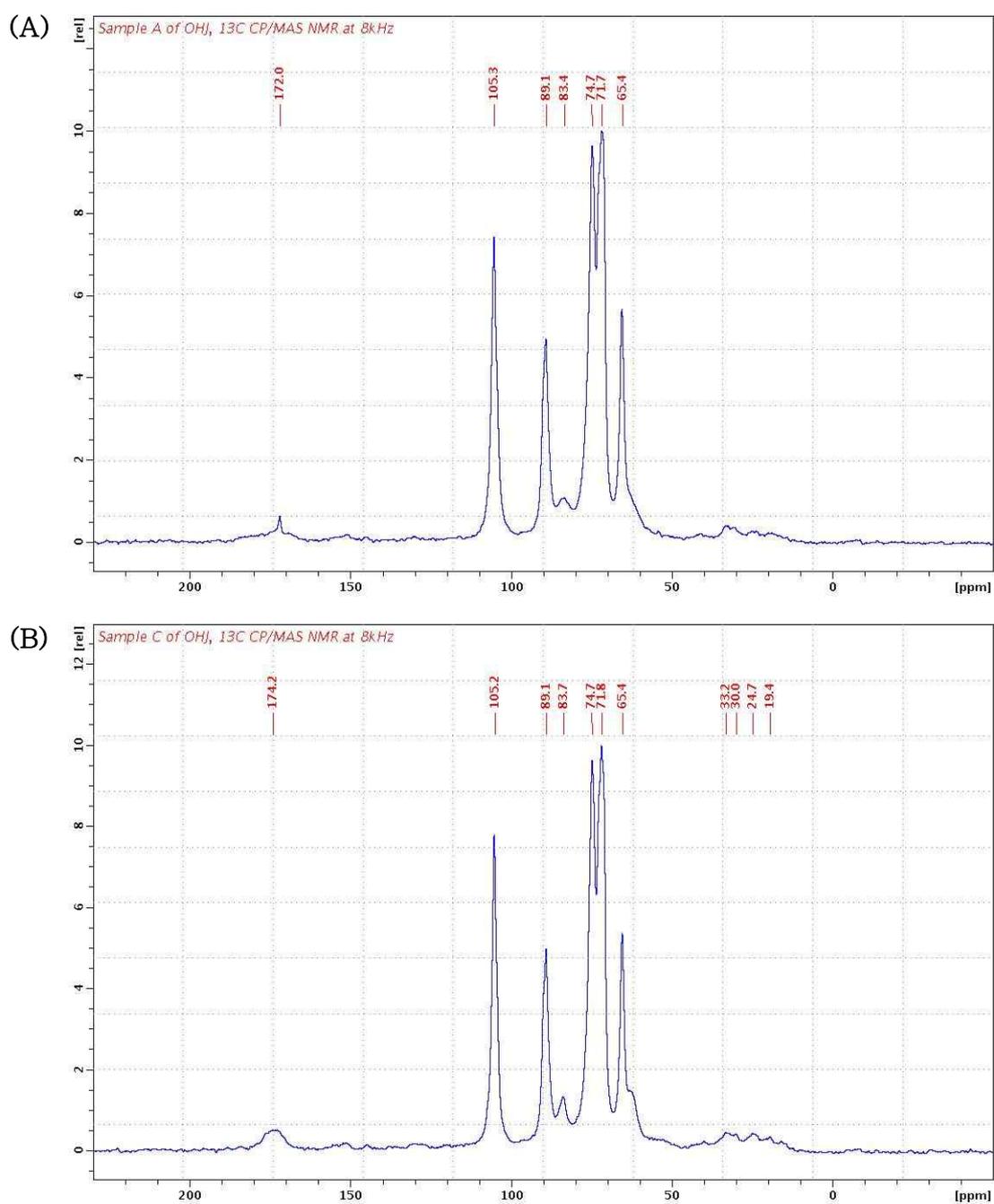


Fig. 6. ^{13}C NMR spectra of cellulosic biopolymers obtained from *Gluconacetobacter* species NOK21 culture.

A, biopolymers pretreated in 0.5 M NaOH solution and hot air-dried at 90°C; B, biopolymers cleaned off cellular debris in water and freeze-dried.

3.5. 섬유소막의 함수율 및 재수화율

G. species NOK21이 생산하는 섬유소막의 함수율 및 재수화율을 측정하였다 (Table 4). 재수화율은 섬유소막의 복원율과 밀접한 관련이 있다. 섬유소 막의 함수율은 98%이상으로 높게 나타나 친수성 하이드로겔(hydro-gel)임을 입증하였다. 막을 통한 양성자 전달 기전 중에 서로 수소결합을 하고 있는 물 분자의 연쇄사슬을 이용하는 방법이 있는데, 이에 따르면 수소 양이온(proton)이 물 분자와 결합하여 hydronium ion(H_3O^+)이 된다. 이어서 hydronium ion으로부터 새로운 양성자가 떨어져 나오고 인접한 다른 물 분자로 이동하며 결합하는데, 이러한 양성자 전달 기전을 Grotthuss mechanism이라고 한다[32]. 따라서 섬유소 막에는 다량의 물 분자가 존재함으로 수소 양이온의 이동속도도 높아질 것으로 판단된다.

막을 건조시키 후에 다시 물 분자를 흡수시켰을 때, 원래 수분함량의 67% 정도만 재흡수되는 것으로 나타났다. 이는 섬유소막의 건조 과정에 많은 물리적 변화가 일어났고, 복원율을 높이기 위해서는 동결건조 등 적절한 건조방법을 강구하여야 할 것이다.

Table 4. Water content and rehydration rate of cellulosic membranes by *Gluconacetobacter species* NOK21

Water content (%)	Water content after rehydration (%)	Rehydration rate (%)
98.58–98.42	66.05–65.84	67.00–66.90

3.6. 섬유소 막의 기계적 강도 측정

G. species NOK21이 생산하는 섬유소막의 기계적 강도를 측정하고, 시중에 널리 유통되는 양이온교환막과 비교하였다(Table 5; Fig. 7). 물리적 강도가 강하다고 알려진 Neosepta CMX 유기합성막의 평량(단위면적당 중량)은 0.0051 g/cm²이었고, 본 연구에서 제조한 섬유소막의 평량은 0.0025 g/cm²로 합성막의 50% 정도로 낮았다. 탐침의 진입에 따라서 조직이 파괴되는데 소요되는 힘을 비교하였을 때, 플라스틱 합성막에서는 2,500 g/cm²임에 비하여, 섬유소막은 500 g/cm²로 약 20% 수준이었다. Neosepta CMX 막의 평량이 섬유소 막의 2배 정도임으로 이를 반영해서 동일한 조건에서 비교해보면, 섬유소막의 강도는 플라스틱 합성막의 40% 수준에 상당하였다.

3.7. 섬유소 피막의 구조

Fig. 9은 *G. species* NOK21을 배양하여 얻은 섬유소 피막의 단면을 주사전자현미경(SEM)으로 관찰한 모습이다. 1000배로 확대하여 보았을 때, 섬유소 막의 표면은 다소 굴곡이 있으나 부드러워 보인다(Fig. 8A).

피막의 조직을 좀 더 확대하면(Fig. 8B), 고분자 피막을 구성하고 있는 nm 굵기의 섬유소 사슬들이 서로 뒤엉켜 망상구조를 이루고 있음을 관찰할 수 있다. Fig. 8C는 섬유소 피막의 횡단면을 절단하였을 때 나타난 모습으로, 섬유소막이 형성된 과정을 보여주고 있다. *G. species* NOK21은 다층구조의 섬유소막을 형성하는데, 개개의 섬유소 고분자 층을 순차적으로 쌓아서, 막의 두께가 커지는 것으로 관찰되었다. 이러한 다층구조의 막은 단일층 구조의 막과 구별되는 독특한 물리적 성질을 나타낼 것이다. 또한 섬유소막의 다층구조는 함수율을 높이는 요인으로 작용할 수 있다. 고배율로 확대하면(Fig. 8D) 섬유소막을 만든 *G. species* NOK21 세균 세포를 선명하게 볼 수 있다. *G. species* NOK21은 1.2x0.5 μm 크기의 간균으로 자신이 만든 섬유소 조직에 둘러 쌓여있다.

이러한 피막의 구조는 *Gluconobacter xylinum*이 만든 구조와 매우 유사하다 [33].

Table 5. Basis weight of plastic membrane Neosepta CMX and cellulosic membrane of *Gluconacetobacter* species NOK21

	Weight (g)	Area (cm ²)	Basis weight (g/cm ²)
Neosepta CMX	0.9270	178.8	0.0051
Cellulosic membrane	0.4448	182.0	0.0025

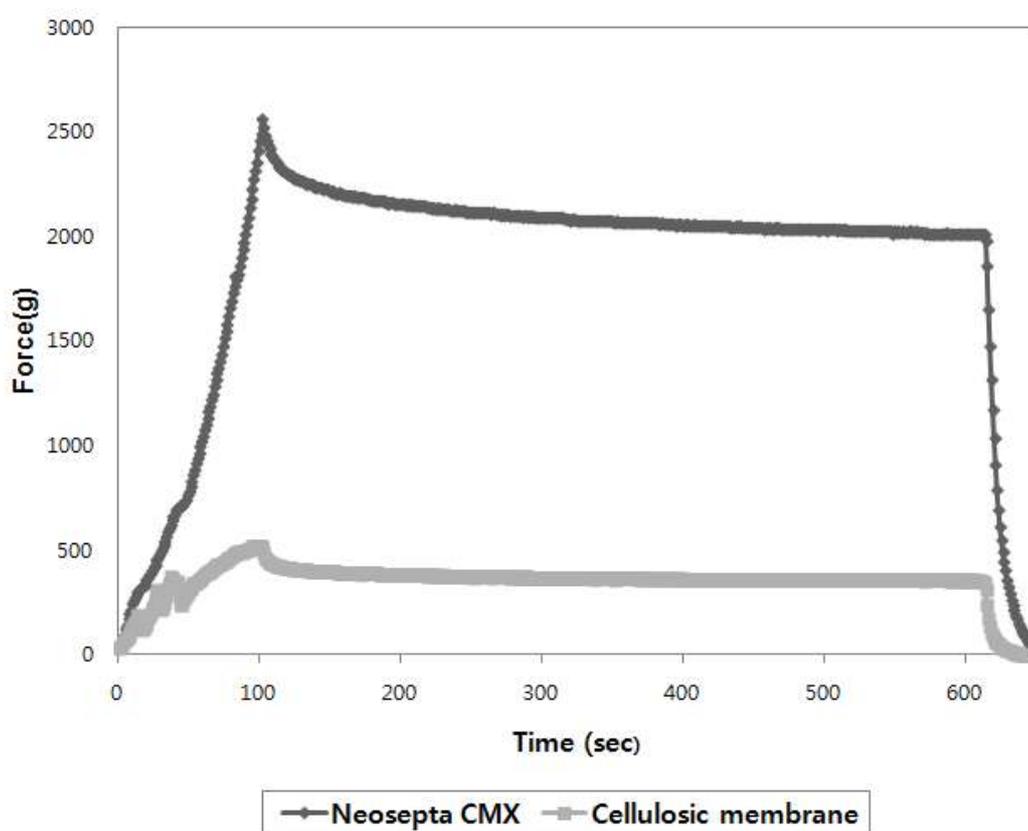


Fig. 7. Physical strength of cellulosic membranes by *Gluconacetobacter* species NOK21.

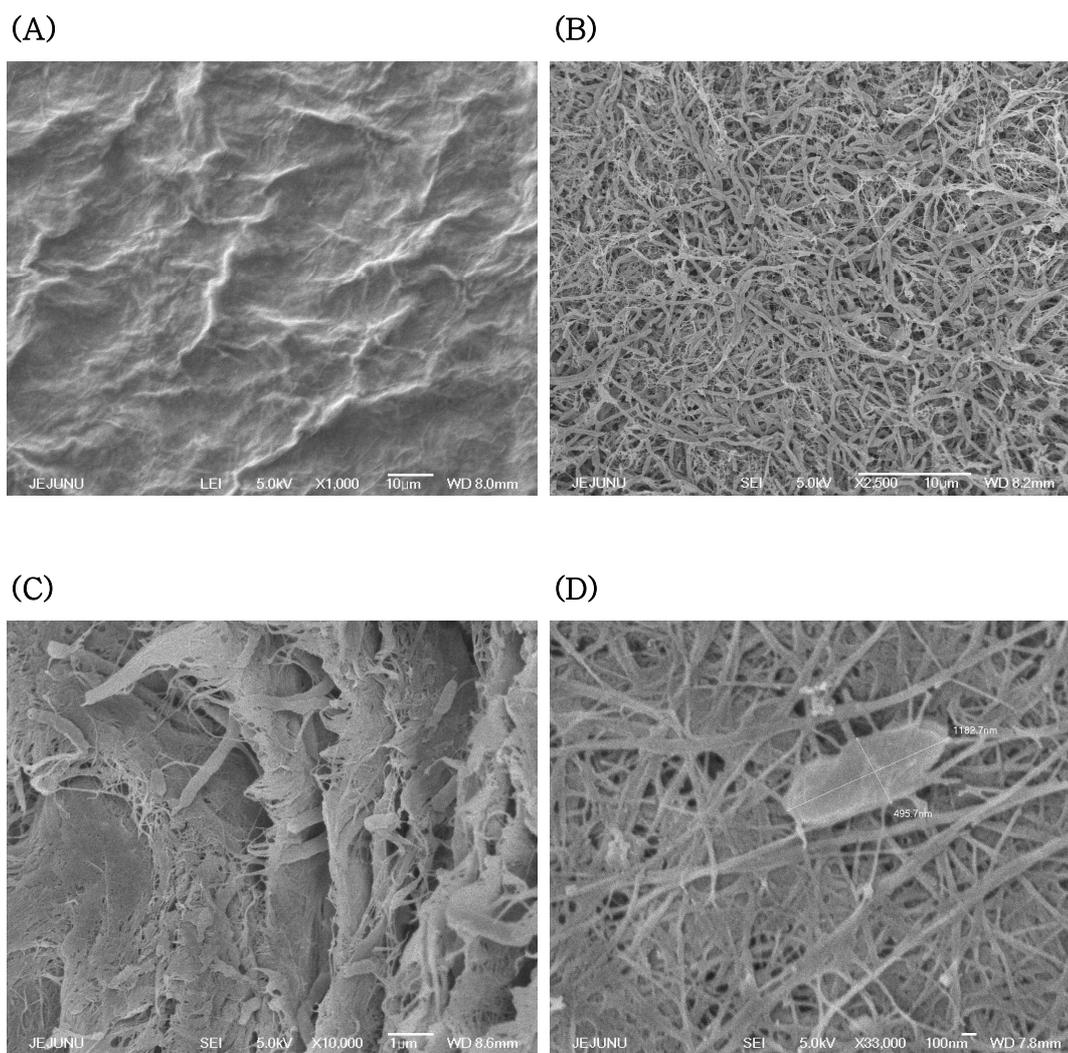


Fig. 8. Scanning electron microscopic images of cellulosic membranes synthesized by *Gluconacetobacter* species NOK21.

3.8. 섬유소막을 이용한 미생물연료전지

3.8.1. 섬유소막과 양이온 교환막의 투과성 비교

미생물연료전지의 핵심구조물인 양극과 음극을 분리하는 분리막은 일종의 반투성 막으로, 양성자는 통과시키되 양이온과 음이온의 출입은 제한시키는 특성이 요구된다. 양성자 선택성 막은 매우 고가이며 구입하기조차 어려운 실정이라서, 그 대신에 양성자를 포함한 양이온에 선택특이성을 갖는 양이온교환수지가 많이 사용된다. 본 연구에서는 시중에 유통되는 해수의 탈염용으로 많이 쓰이는 양이온교환수지와 *G. species* NOK21이 만든 섬유소막의 전기발생량을 동일한 조건에서 비교하였다(Fig. 9).

미생물연료전지에 직경 13cm의 양이온교환수지와 섬유소막을 각각 분리막으로 사용하여 양극부에 포도당을 2% 농도로 투입하였으며, 2일째부터 폭기를 시작하였다. 가동 초반보다 후반에 생성되는 전력량이 많았으며, 전류량의 완만한 증가 경향을 나타내었다. 이는 미생물상이 새로운 환경에 적응되는 과정에서 발생한 현상이라고 생각된다. 연료전지 가동기간 20여 일 동안에, 양이온교환수지 Neosepta CMX를 사용한 전지에서는 외부저항 1 Ω 이 걸렸을 때, 54.8 μA 내외의 전류가 흘렀으나, 섬유소 막을 사용한 전지에서는 125.5 μA 내외의 전류가 흘렀다. *G. species* NOK21이 만든 섬유소막이 Neosepta CMX보다 전력생산에 3배 정도 효율이 높게 나타났다. 이는 섬유소 막에 대한 양성자의 선택적 투과성이 Neosepta CMX에 대한 투과성보다 높음을 의미한다. 섬유소 막에 존재하는 carboxylate 작용기와 세균성 섬유소 특유의 hydrogel과 같은 물성이 양성자의 투과성을 높이는데 기여한 것으로 해석된다.

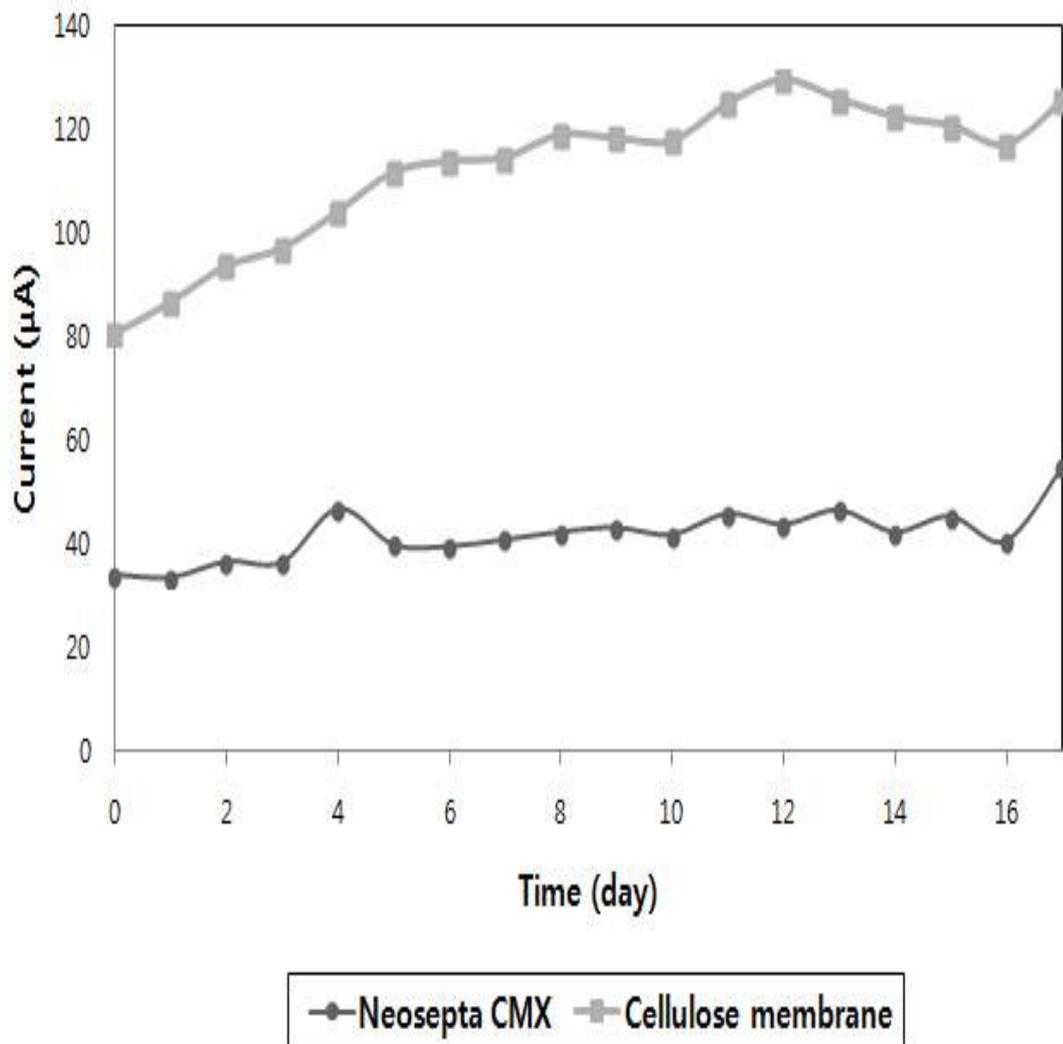


Fig. 9. Changes of electric currents in the microbial fuel cells using cation exchanger resins or cellulosic membranes as a proton exchange membrane.

3.8.2. 양극의 표면적과 용존산소의 영향

섬유소막을 사용했을 때 나타나는 미생물 연료전지의 성질을 파악하고자 가동 조건을 변화시키면서 그에 따른 전력 발생 추이를 측정하였다. 양극부에 서식하는 미생물에서 방출되는 전자는 반드시 양극으로 전달되어야 전력 생산에 쓰인다. 균체에서 양극으로 전자가 이동하는 방법에 차이가 있어도, 연료전지 구조상 양극의 표면적은 전자 전달에 긍정적인 영향을 끼친다. 양극의 표면적을 460 cm^2 에서 920 cm^2 로 2배 증가시켰더니, 발생 전압은 121.8 mV에서 139.3 mV로 약 20 mV 증가하였다(Fig. 10).

한편, 음극부에서는 산소와 양성자 그리고 전자가 만나 물 분자가 생성되는 곳으로 용존산소의 농도가 전력생산의 주요 변수로 작용한다. 연료전지 가동 14일 만에 폭기를 중지시켰더니, 그 후 약 10일 동안 전압이 지속적으로 감소하여 68.6 mV로 초기의 50% 수준에 불과하였다. 그 후에 다시 폭기를 재개하였더니, 전압이 점진적으로 증가하여 초기 수준인 137 mV에 도달하였다(Fig. 10).

위와 같이 양극의 표면적 또는 용존산소의 농도에 따라서 발생하는 전압의 변화는 본 연구에 사용된 연료전지시스템이 정상적으로 가동되고 있음을 보여주었다.

3.8.3. 전자전달매개체의 영향

양극부에서 기질을 산화시킬 때 발생하는 전자를 직접 양극으로 전달할 수 있는 미생물이 바람직하지만, 대부분의 미생물 세포들은 그렇게 직접적으로 전자를 전달할 수 없다. 그런 이유로 미생물 세포와 전극 간에 자유롭게 왕복하며 전자를 전달해줄 수 있는 전자전달매개체(redox mediator)는 전력 생산을 촉진시키는데 기여할 수 있다[34]. 전자전달매개체는 서식 미생물에 의해서 생산될 수 있으나, 외부에서 공급해주는 방법도 있다. 본 연구에서 제작된 연료전지시스템에서는 유기물을 산화시키는 미생물로 불특정 다수의 혐기성 세균을 사용하였기 때문에 전자전달매개체가 전력의 생산을 증가시킬 것으로 기대되었다. 구입과 사용이 간편하고, 저렴한 neutral red를 전자전달매개체로 사용하였다.

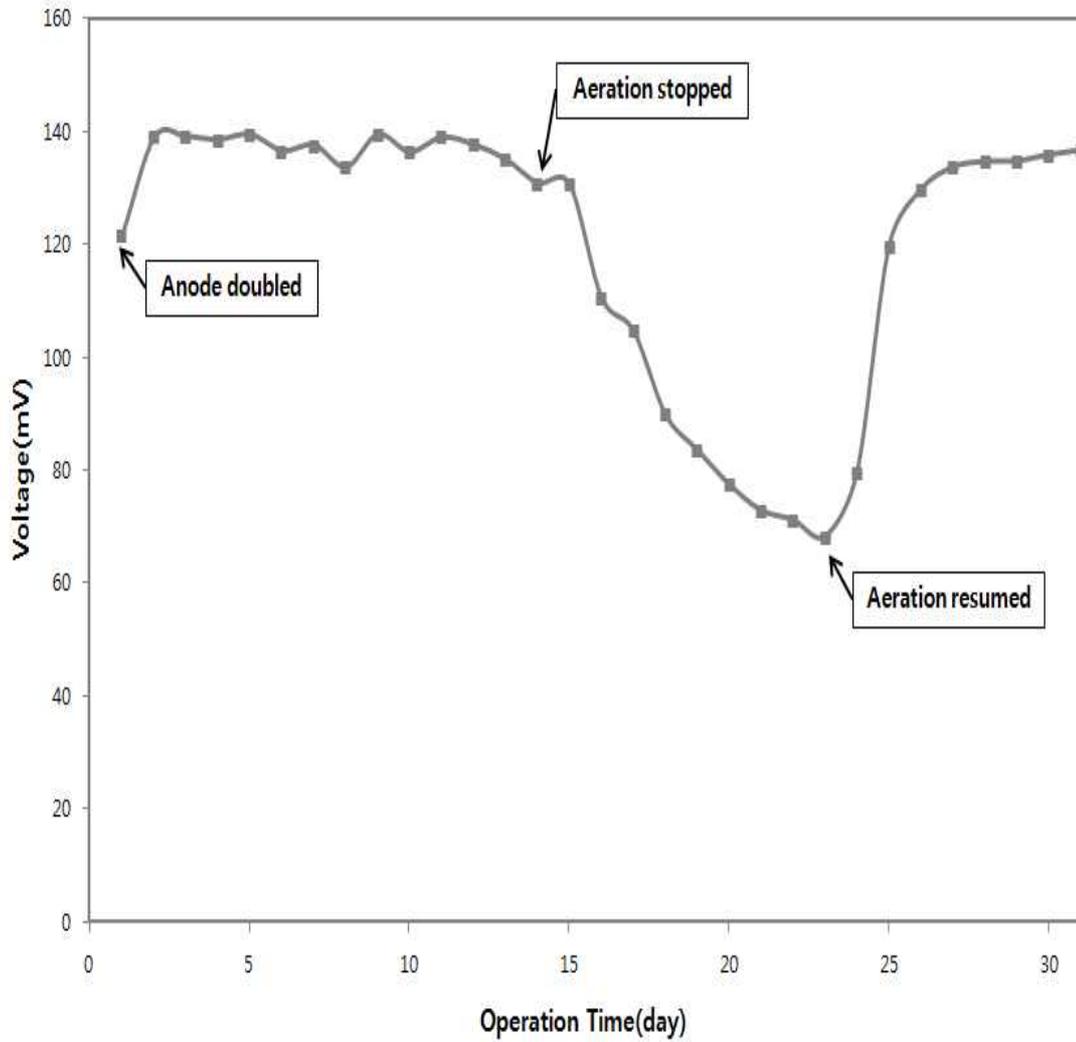


Fig. 10. Changes of electric voltages in the microbial fuel cell using cellulosic membranes as a proton exchange membrane depending upon surface area of anode and aeration of cathode chamber.

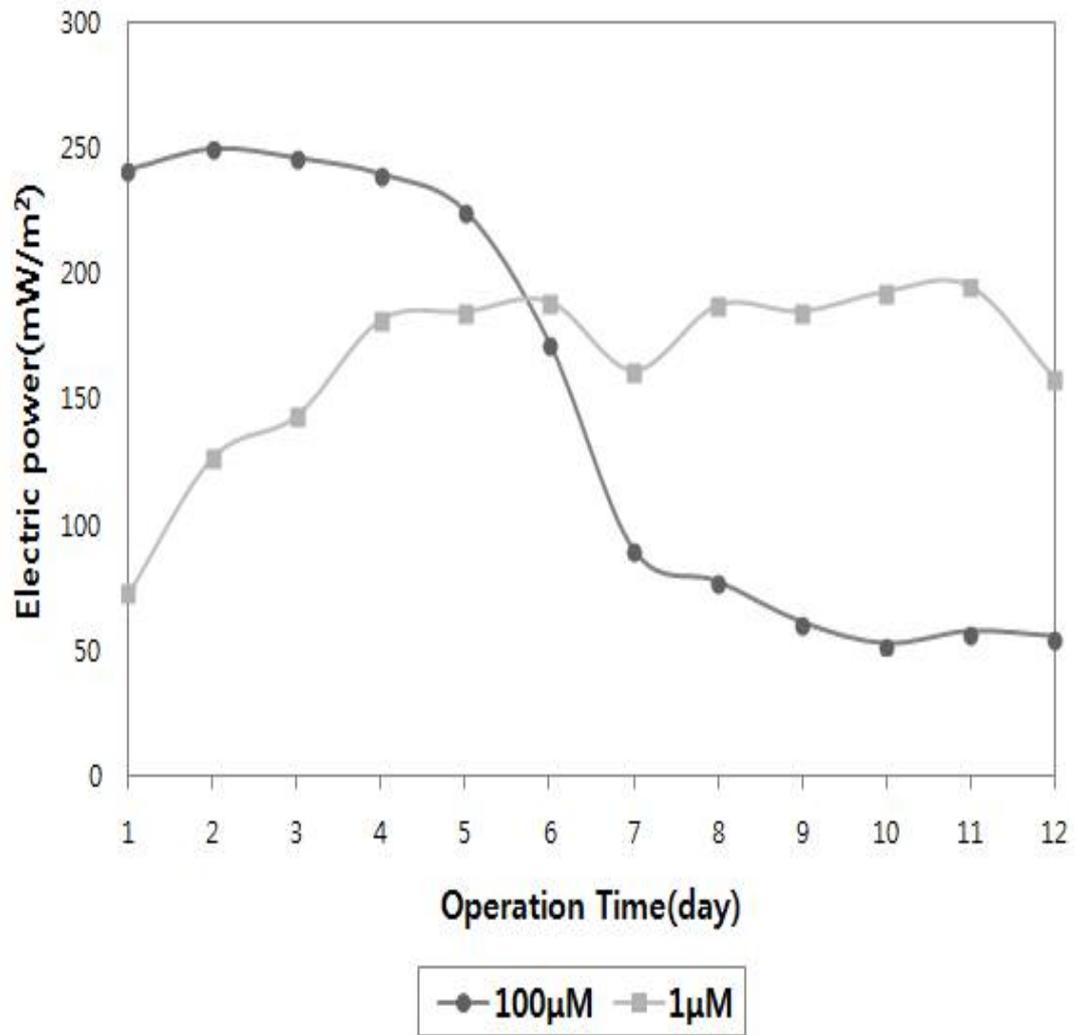


Fig. 11. Effects of neutral red on electric power generation in the microbial fuel cell using cellulosic membranes as a proton exchange membrane.

Neutral red는 지용성이며 세균의 세포막에 결합하는 특성과 NADH(-320mV)와 비슷한 -325 mV의 산화환원전위를 가지고 있어서 서로 간에 전자를 주고받기 쉽다.

섬유소 막을 사용한 미생물 연료전지의 양극부에 neutral red를 최종 농도100 μM 또는 1 μM 로 넣어서, 가동 기간에 따른 전력 발생량의 변화를 측정하였다 (Fig. 11). Fig. 11에서 neutral red를 100 μM 또는 1 μM 로 사용했을 때, 최초의 전력량이 242 mW/m^2 또는 73 mW/m^2 로 서로 다른 것은 미생물연료전지를 구성하는 양극부의 미생물상, 영양상태 등 최초 설정 조건이 서로 다를 것을 의미한다. neutral red를 100 μM 농도로 사용했을 경우에는, neutral red를 넣은 직후부터 수 일 내로 전력 발생량이 56 mW/m^2 로 급격하게 감소하였다. 이러한 감소는 neutral red가 불특정 미생물의 생육을 저해하는 독성에 기인한 것으로 보인다. neutral red는 양이온성을 화합물로 지질 성분의 세포막을 잘 통과하여 세포내에 축적된다. 세포내에 고농도로 축적된 neutral red는 세포의 생리 기능을 저해할 것이다[35]. 그와 반면에 매우 낮은 농도인 1 μM 에서는 미생물의 생육에 큰 영향은 없어 보였고, 전력 생산은 최고 195 mW/m^2 로 큰 폭으로 증가하였다. 이러한 현상은 *Escherichia coli*를 순수배양한 연료전지에서 관찰된 바와 같다[36].

자체 제작한 연료전지 시스템에서 양극의 표면 단위면적당 약 150~200 mW/m^2 의 전력이 안정적으로 생산되었다. 이는 기존의 연구자들이 흑연을 전극 재료로, 양성자 선택성 투과막 또는 양이온 교환용 투과막을 분리막으로, 포도당을 유기물로 사용하여 각종 미생물을 혼합 배양하였을 때 얻은 전력밀도 18~3,600 mW/m^2 와 크게 다르지 않다[37]. 이러한 연구결과는 *G. species* NOK21에 의해 합성되는 양이온 교환성 섬유소막이 미생물연료전지의 양성자 교환막으로 대체 사용될 수 있음을 처음으로 보여주었다.

4. 요약

각종 유기물이 분해될 때 발생하는 생물학적 에너지 ATP를 전기에너지로 바꾸주는 장치가 미생물연료전지이다. 미생물연료전지는 지속가능한 청정에너지를 생산하는 방법이나 실용화를 위해서 극복해야할 과제중의 하나는 저렴한 선택적 양성자투과성 분리막의 생산이다. 본 연구에서는 양성자투과 성능은 떨어지더라도 제조단가가 낮은 분리막을 사용하는 방법을 고려하였다. 결정형 구조가 매우 발달한 식물성 섬유소와 달리 세균이 합성하는 섬유소막은 친수성겔과 같아서 양성자 투과성이 높을 것으로 기대되었다.

초산발효세균의 일종인 *Gluconacetobacter* species NOK21을 액체배지에 정지배양하면 표면에 피막(pellicle)을 형성한다. 이 피막을 미생물연료전지용 분리막으로 활용하고자 가능성을 조사하였다. *G. species* NOK21은 세포의 모양과 크기 그리고 생리학적 특성상 *G. hansenii*와 일치하였다. *G. species* NOK21 균주의 16S-rRNA 유전자 일부 염기서열(1,380bp)을 분석하여 비교하였을 때, 99.7% 이상 일치하는 균주가 대부분 *G. hansenii*이었다는 기존의 보고와도 다르지 않다.

G. species NOK21은 배지 중의 에탄올 농도 1-3% 범위에서는 섬유소막을 만들었으나, 에탄올에 대한 내성의 한계로 4% 이상에서는 섬유소막을 만들지 않았다. 배지중의 포도당 농도는 1%에서 5%까지 농도가 높아질수록 섬유소막의 생성량이 증가하였고, 5% 농도에서 1.4877 g/L이었다. 포도당을 함유한 액체배지에 에탄올을 혼합하여 배양했을 때 섬유질 피막 생성량은 증가하였다.

G. species NOK21 균주의 피막을 NMR로 분석한 결과 포도당을 반복단위체로 이용하여 합성된 섬유소 성분으로 이루어져 있었으며, carboxylate(COO⁻) 작용기를 불특정위치에 갖고 있었다. SEM으로 분석한 섬유소는 섬유소 사슬이 무작위로 얽혀진 다층의 망상 구조를 가지고 있었으며, 함유율이 매우 높아서 친수성 겔의 형태를 유지하였다. 물리적 강도는 상용화된 유기합성 양이온 교환막 Neosepta CMX에 미치지 못하였으나, 세균의 배양조건을 조절함으로써 피막의 강도를 증가시킬 수 있을 것이다.

피막의 미생물전지에 활용가능성을 높여주는 요인으로 *G. species* NOK21이

합성한 세균성 피막이 Neosepta CMX보다 전력생산에 3배 정도 효율이 높게 나타난 점이다. 자체 제작한 이중반응조 시스템(dual chamber system)의 미생물연료전지는 양극의 표면적, 전자전달매개체인 neutral red의 사용 또는 폭기(aeration) 여부에 따라 전류의 흐름에 정상적인 변화를 나타내었으며, 양극의 표면 단위면적당 약 150-200 mW/m²의 전력이 안정적으로 생산되었다. 이는 기존 연구자들이 비슷한 조건에서 얻은 전력밀도 18~3,600 mW/m²와 크게 다르지 않았다. 이러한 연구결과는 *G. species* NOK21에 의해 합성되는 양이온 교환성 섬유소막이 미생물연료전지의 양성자 교환막으로 활용될 수 있음을 처음으로 보여주었다.

5. 참고문헌

- [1] 감상규, 고영환, 정선용, 강형일, 이동현. 유용미생물자원 산업화방안 마련 및 중장기 로드맵 수립. 제주녹색환경지원센터 최종보고서 유용미생물자원 발굴 및 중장기 발전계획 수립 I:117-169(2014).
- [2] Gunaseelan VN. Anaerobic digestion of biomass for methane production: A review. *Biomass Bioenergy*. 13:83-114(1997)
- [3] Gaspar M, Kalman G, Reczey K. Corn fiber as a raw material for hemicellulose and ethanol production. *Process Biochemistry*. 42:1135-1139 (2007)
- [4] Mishra MS, Chandrashekhar B, Chatterjee T, Singh K. Production of bio-ethanol from *Jatropha* Oilseed Cakes via dilute acid hydrolysis and fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Biotechnology Applications*. 3(1):41-47(2011)
- [5] Masayuki I, Masako Suda, Sakurako K, Kaori Y, Hiroaki S, Hiroshi T, Shogo Y, Shohei O, Nobuaki S, Hideaki Y. Expression of *Clostridium acetobutylicum* butanol synthetic genes in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 77:1305-1316(2008)
- [6] Congcong Lu. Butanol production from lignocellulosic feedstocks by acetone-butanol-ethanol fermentation with integrated product recovery. Ph.D. Dissertation, The Ohio State University (2011)
- [7] Chisti Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv*. 25:294-306(2007)
- [8] Logan BE. *Microbial Fuel Cells*. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ, USA (2008)
- [9] Kim BH, Kim HJ, Moon MS, Park DH. Direct electrode reaction of Fe(III)-reducing bacterium *Shewanella putrefaciens*. *J. Microbiol. Biotechnol*. 9:127-131(1999)
- [10] Yu JH, Lee CY, Kim SA, Cho HI, Cho SJ, Lee TH. Electricity generation and microbial community structure variation depending on separator types and cathode characteristics in air-cathode MFC. *Journal*

- of Korean Society of Environmental Engineers. 32: 113–120(2010)
- [11] Kwon JH, Choi SJ, Cha JH, Kim HS, Kim YJ, Yu JC, Kim CW. Electricity generation and microbial community variation in microbial fuel cell with various electrode combinations. Journal of Korean Society of Environmental Engineers. 32:1255–1264(2010)
- [12] Singh D, Pratap D, Baranwal Y, Kumar B, Chaudhary RK. Microbial fuel cells: A green technology for power generation. Ann. Biol. Res. 1(3): 128–138 (2010)
- [13] Choi TH, Kim HW, Park HB. Current research trends in microbial fuel cell based on polymer electrolyte membranes. Membrane Journal. 20(3):173–184(2010)
- [14] Choi MA, Lee KY, Lim KH. Electricity generation characteristics on the improvements of cathode using air–cathode microbial fuel cell. Journal of Korean Society of Urban Environment.12(1):67–72(2012)
- [15] Yu JC, Lee TH. Evaluation of single and stacked MFC performances under different dissolved oxygen concentrations in cathode chamber. Journal of Korean Society of Environmental Engineers. 31:249~255(2009)
- [16] Song YC, Woo JH, Yoo KS. Materials for microbial fuel cell: electrodes, separator and current collector. Journal of Korean Society of Environmental Engineers. 31:693–704(2009)
- [17] Choi MJ, Chae KJ, Ahayi FF, Kim KY, Yu HW, Kim CW, Kim IS. Effects of biofouling on ion transport through cation exchange membranes and microbial fuel cell performance. Bioresour. Technol. 102:298–303(2011)
- [18] Rehm Bernd HA. Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. Nature Reviews Microbiology, 1–15 (2010)
- [19] Lee SH, Son GM, Choi C. Rheological properties of biopolymer produced by *Bacillus coagulans* CE-74. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.

29(2):198–203(2000)

[20] Schramm M, Hestrin S. Synthesis of Cellulose by *Acetobacter xylinum*, 1. Micromethod for the determination of celluloses. Biochem J. 56:163–166(1954)

[21] Hestrin S, Schramm M. Synthesis of Cellulose by *Acetobacter xylinum*, 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. Biochem J. 58:345–352(1954)

[22] Schramm M, Gromet Z, Hestrin S. Synthesis of Cellulose by *Acetobacter xylinum*, 3. Substrates and inhibitors. Biochem J. 67:669–679(1957)

[23] Jeong YJ, Lee IS. A view of utilizing cellulose produced by *Acetobacter* bacteria. Food Industry and Nutrition. 5(1):25–29(2000)

[24] Kang TJ, Lee SJ, Choi DH. 미생물 셀룰로오스의 의료 제품이용. BioWave (<http://bric.postech.ac.kr/webzine>). 11(1):1–12(2009)

[25] Ko JY, Shin KS, Yoon BD, Choi WY. Isolation and identification of *Acetobacter xylinum* GS11 producing cellulose. Kor. j. Appl. Microbiol. Botechnol. 28(3): 139–146(2000)

[26] Garrity G, Bernner DJ, Krieg NR, Stakley JR. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume Two. Springer(2005)

[27] Lisdiyanti P, Navarro RR, Uchimura T, Komagata K. Reclassification of *Gluconacetobacter hansenii* strains and proposals of *Gluconacetobacter saccharivorans* sp. nov. and *Gluconacetobacter nataicola* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56:2101–2111(2006)

[28] 이현정. 생물고분자 생산 초산균과 에탄올 효모의 혼합배양. 제주대학교 대학원 석사학위논문 (2014)

[29] Nguyrn VT, Flanagan B, Gidley MJ, Dykes GA. Characterization of cellulose production by a *Gluconacetobacter xylinus* strain from Kombucha. Curr. Microbiol. 57:449–453(2008)

[30] Castro C, Zuluaga R, Alvarez C, Putaux L, Caro G, Rojas J,

Mondragon I, Gannan P. Bacterial cellulose produced by a new acid-resistant strain of *Gluconacetobacter* genus. Carbohydr. Polym. 89:1033–1037(2012)

[31] Habib HA, Hoffmann A, Hoppe HA, Janiak C. Crystal structures and solid-state CPMAS ¹³C NMR correlations in luminescent zinc(II) and cadmium(II) mixed-ligand coordination polymers constructed from 1,2-bis(1,2,4-triazol-4-yl)ethane and benzenedicarboxylate. Dalton Trans. 38:1742–1754(2009)

[32] Noam A. The Grotthuss mechanism. Chem. Phys. Lett. 244:456–462 (1995)

[33] Retegi A, Gabilondo N, Pena C, Zuluaga R, Castro C, Ganan P, delaCaba K, Mondragon I. Bacterial cellulose films with controlled microstructure-mechanical property relationships. Cellulose. 17:661–669 (2010).

[34] Tanaka K, Vega CA, Tamamushi R. Mediation effects of ferric chelate compounds in microbial fuel cells. J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem. 156:135–143 (1983)

[35] Repetto G1, del Peso A, Zurita JL. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. Nature Protocols. 3(7):1125–1131(2008)

[36] McKinlay1 JB, Zeikus JG. Extracellular iron reduction is mediated in part by neutral red and hydrogenase in *Escherichia coli*. Applied and environmental Microbiology. 70(6):3467–3474 (2004)

[37] Rabaey K, Verstraete W. Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation. Trends in Biotechnology, 23(6):291–298 (2005)

감사의 글

설렘을 안고 대학원을 입학한지 엇그제 같은데 벌써 이렇게 시간이 흘러 감사의 글을 쓰게 되었습니다. 돌이켜 보면 조교생활을 같이 하여 부족한 점이 많아 힘이 들기도 했지만 항상 주변에 힘이 되어주신 분들 덕분에 여기까지 올수 있었다고 생각합니다.

먼저 부족한 저를 이끌어주시고 새로운 분야에 대한 기초를 다질 수 있도록 아낌없이 지도해주신 고영환 교수님께 진심으로 감사드립니다. 또한 바쁘신 와중에도 많이 부족했던 논문을 일일이 확인해주시고 세심하게 지도해주신 박은진 교수님과 홍근표 교수님께도 정말 감사드립니다. 조교를 병행하며 부족했던 저에게 많은 가르침과 격려를 해주신 임상빈교수님, 김현정교수님, 송대진교수님, 김수현교수님, 강영주교수님, 하진환 교수님께도 정말 감사드리며 건강하시길 기원합니다.

대학원 생활을 하며 만난 인연으로 많은 힘이 되어주신 최영진 선생님, 문애경 선생님, 강운구 선생님, 김경민 선생님, 경렬언니, 수경언니, 재원, 만재오빠, 고재필 선생님, 한지령 선생님, 미옥, 효진에게도 감사의 마음을 전합니다.

여러 가지로 나의 멘토가 되어준 정하언니, 제 선임연구자로, 조교로 함께 지내며 많은 힘이 되어준 현정언니와 조교생활과 대학원생활을 병행하여 바쁨에도 불구하고 나의 부족한 부분을 채워준 소연이, 그리고 항상 힘들 때마다 파이팅을 외치며 옆에서 응원해 준 절친한 친구 수미, 현진, 안나에게도 고마움을 전합니다.

마지막으로 항상 믿음과 사랑으로 지켜봐 주시고 부족한 딸을 위해 매일 기도하며 격려해주신 아빠, 엄마, 오빠에게 말로 다 표현할 수 없는 사랑과 감사의 마음을 전합니다. 항상 건강하세요. 사랑합니다.