



# 이산화탄소로부터 생물전기화학적 아세트산 생산을 위한 미생물 농화배양 및 군집 분석

김준형<sup>1)</sup> · 김영은<sup>1)</sup> · 박명화<sup>2)</sup> · 송영은<sup>3)</sup> · 설은희<sup>4)</sup> · 김종래<sup>5)</sup> · 오유관<sup>5)\*</sup>

## Microbial Enrichment and Community Analysis for Bioelectrochemical Acetate Production from Carbon Dioxide

Junhyung Kim<sup>1)</sup> · Young-Eun Kim<sup>1)</sup> · Myeonghwa Park<sup>2)</sup> · Young Eun Song<sup>3)</sup> ·  
Eunhee Seol<sup>4)</sup> · Jung Rae Kim<sup>5)</sup> · You-Kwan Oh<sup>5)\*</sup>

Received 13 November 2019 Revised 23 December 2019 Accepted 2 January 2020

**ABSTRACT** Microbial electrosynthesis has recently been considered a potentially sustainable biotechnology for converting carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) into valuable biochemicals. In this study, bioelectrochemical acetate production from CO<sub>2</sub> was studied in an H-type two-chambered reactor system with an anaerobic microbial consortium. Metal-rich mud flat was used as the inoculum and incubated electrochemically for 90 days under a cathode potential of -1.1 V (vs. Ag/AgCl). Four consecutive batch cultivations resulted in a high acetate concentration and productivity of 93 mmol/L and 7.35 mmol/L/day, respectively. The maximal coulombic efficiency (rate of recovered acetate from supplied electrons) was estimated to be 64%. Cyclic voltammetry showed a characteristic reduction peak at -0.2~-0.4 V, implying reductive acetate generation on the cathode electrode. Furthermore, several electroactive acetate-producing microorganisms were identified based on denaturing- gradient-gel-electrophoresis (DGGE) and 16S rRNA sequence analyses. These results suggest that the mud flat can be used effectively as a microbial source for bioelectrochemical CO<sub>2</sub> conversion.

**Key words** Bioelectrochemical system(생물전기화학 시스템), Carbon dioxide(이산화탄소), Acetic acid(아세트산), Mixed culture(혼합배양), Coulombic efficiency(쿨롱효율), Microbial community(미생물 군집)

- 1) M.S. Candidate, School of Chemical & Biomolecular Engineering, Pusan National University
- 2) M.S. Candidate, Department of Civil & Environmental Engineering, Pusan National University
- 3) Ph.D. Candidate, School of Chemical & Biomolecular Engineering, Pusan National University
- 4) Researcher, School of Chemical & Biomolecular Engineering, Pusan National University
- 5) Professor, School of Chemical & Biomolecular Engineering, Pusan National University

\*Corresponding author: youkwan@pusan.ac.kr

Tel: +82-51-510-2395 Fax: +82-51-512-8563

## Nomenclature

- BES : bioelectrochemical system  
 CE : coulombic efficiency  
 CV : cyclic voltammetry  
 HPLC : high-performance liquid chromatograph  
 MFC : microbial fuel cell  
 MES : microbial electrosynthesis  
 OD : optical density

## 1. 서론

전 세계적으로 기후위기(Climatic crisis)를 방지하기 위해 온실가스 이산화탄소(CO<sub>2</sub>)의 저감 및 전환을 위한 다양한 생물학 및 물리화학적 기술이 활발히 연구가 진행되고 있다<sup>[1,2]</sup>. CO<sub>2</sub>는 열역학적으로 매우 안정하며 산화된 상태이므로, 환원된 상태의 유용 화학물질 혹은 수송용 연료로 전환하기 위해서는 상당한 양의 에너지 투입이 필요하다. 일반적으로 광합성 생물(식물, 미세조류, 광합성 세균)이 태양 에너지를 이용하여 CO<sub>2</sub>를 고정화하지만<sup>[3]</sup> 낮은 태양광 전환효율, 광/암반응 주기 반복에 따른 비연속적인 CO<sub>2</sub> 전환, scale-up 어려움 등 실제 상용화에는 여러 문제점이 있다<sup>[4]</sup>.

미생물 전기합성(Microbial electrosynthesis, MES) 기술은 광합성과 달리 빛 에너지를 이용하지 않고 전극으로부터 전자를 환원력(Reducing power)으로 이용하여 CO<sub>2</sub>를 생물학적으로 고정화할 수 있어 최근 큰 관심을 받고 있다<sup>[5]</sup>. 산화전극(Anode)의 물 분해 반응으로 생성된 전자는 전압을 인가하는 전위가변기를 통해 환원전극(Cathode)으로 전달되면 '전기활성(Electroactive)' 미생물이 전자를 받아 CO<sub>2</sub>를 부탄올, 에탄올, 아세트산, 1,3-프로판디올(1,3-Propanediol) 등 다양한 화학제품으로 전환시킬 수 있다<sup>[6,7]</sup>. 따라서 태양광, 풍력 등 친환경 신재생에너지 기술로 생산된 전기를 에너지원으로 활용한 효율적인 CO<sub>2</sub> 전환 미생물 전기합성 기술이 개발된다면, CO<sub>2</sub> 감축 효과와 더불어 새로운 바이오산업기술의 확보가 기대된다<sup>[8]</sup>.

미생물 전기합성 효율은 생물촉매와 생물전기화학 시스템(Bioelectrochemical system, BES)의 다양한 운전인자(전극종류, 분리막, 반응기 형태, 인가전압, 전자매개체, pH, 온도 등)에 영향을 받는다. 이중 생물촉매 성능이 미생물 전기합성 기술의 핵심 인자로 평가된다<sup>[9]</sup>. 생물촉매는 크게 순수배양(Pure culture)과 혼합배양(Mixed culture)로 구분할 수 있다. 순수배양의 경우 전자전달 메커니즘 이해와 대사공학/합성생물학 기술을 이용한 목적 생산물 생산에 유리하나, 기술적 난이도와 함께 원료가스에 대한 민감성, 외부 미생물 오염문제 등으로 실용화에 상당한 시간이 소요될 것으로 판단된다.

혼합배양은 생산물의 스펙트럼을 다양화할 수 있으며, 산

업용 폐가스에 적용가능하고, 외부미생물 오염이 적고, 운전이 용이한 장점이 있다<sup>[10]</sup>. 그러나 목적 미생물 군집(Target microbial community)을 얻기 위해서는 적절한 접종 미생물원(Inoculum source) 선택과 농화배양(Enrichment culture) 최적화가 요구된다. 지금까지 혐기성 UASB(Upflow anaerobic sludge blanket) 반응기 슬러지<sup>[11]</sup>, 혐기성 소화조 슬러지<sup>[12]</sup>, 하수처리장 활성슬러지<sup>[13]</sup>, 연못 침전물<sup>[14]</sup> 등을 다양한 접종원으로 이용한 미생물 전기합성 기술이 보고되었다. 그러나 생산물 생산효율이 낮거나, 농화배양 후 미생물 군집에 대한 정보가 부족해 후속 생물공정 최적화에 많은 어려움이 있었다.

본 연구에서는 생물전기화학 시스템에서 금속이온이 상대적으로 높은 깃별 슬러지를 접종원으로 이용하여 전기활성 혼합미생물의 농화배양과 CO<sub>2</sub> 전환 생산물의 가능성을 조사하였다. 그리고 농화배양에 따른 미생물 군집 변화를 분자생물학적 DGGE(Denaturing gradient gel electrophoresis) 기법으로 분석하였고, 확인된 주요 미생물의 생리학적 특성 및 전기활성 가능성을 조사하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 식종 슬러지 및 배지 조성

본 실험에 사용된 식종 슬러지는 경남 창원시 봉암갯벌에서 채취하였다. 봉암갯벌은 산업단지 및 공장과 지리적으로 가까워 다양한 공업용 폐수에 노출되어 있으며, 다른 갯벌에 비해 철(Fe)과 같은 금속 농도가 상대적으로 높은 것으로 알려져 있다<sup>[15]</sup>. 채취된 슬러지는 사용 전까지 밀폐 용기에 담아 4°C 냉장고에 보관하였다. 생물전기화학 배양을 위해 Im 등이 제안한 무기염 영양배지를 사용하였다<sup>[12]</sup>. 주요 배지성분은 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(1.5 g/L), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(2.9 g/L), NaHCO<sub>3</sub>(2.0 g/L), NH<sub>4</sub>Cl(0.5 g/L), MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O(0.09 g/L), CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O(0.0225 g/L)이며, Wolfe's mineral solution과 Wolfe's vitamin solution을 각각 20 mL/L 씩 첨가하였다. 최종 배양배지는 HCl 용액으로 pH를 7로 맞춘 후 0.45 μm 멤브레인으로 여과하여 사용하였다. N<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>(72:20:8, v/v/v)의 혼합가스 상태의 혐기성 챔버(Vinyl anaerobic chamber type-B, Coylab, USA)

에서 영양배지 10 mL에 5 g의 슬러지 시료를 충분히 혼합하였다. 15분간 정치 후 상등액 10 mL을 1회용 멸균주사기로 생물전기화학반응기에 0.02 OD(Optical density) 수준으로 접종하였다.

## 2.2 생물전기화학 반응기 및 배양조건

본 연구에서는 두개의 250 mL Pyrex 재질 유리 반응기로 구성된 H-형태 이실형 생물전기화학 반응시스템(H-type two-chambered bioelectrochemical system)을 사용하였다(Fig. 1). 두 반응기는 부착된 연결관을 통해 양이온교환막(Cation exchange membrane, CEM; 50 mm × 50 mm; FKS-PE T-130, FuMA-Tech, Germany)과 고정 집게로 연결하였다. 환원전극은 graphite felt(높이 50 mm, 넓이 50 mm, 두께 5 mm; GF-20-5F, Nippon Carbon, Japan)를, 산화전극으로 carbon rod(길이 50 mm, 직경 5 mm; JC4, Ceramaterials, USA)와 50 g carbon granule(직경 2-5 mm)을 동시에 사용하였다. 전압인가를 위해 산화 및 환원 전극에 티타늄와이어(90 mm, 직경 1.6 mm; Ti R/B Gr2, Seoul Titanium CO., Korea)를 전도성 접착제(Silver paste, CANS, Japan)로 부착하였다. 기준전극으로 3 M의 NaCl이 포화된 Ag/AgCl 전극(RE-5B, BASI, USA)을 환원전극 반응기에 설치하였다.

산화전극 및 환원전극 반응기(각 250 mL)의 작용부피(Working vol.)는 200 mL로 동일하였고, 앞서 언급한 영양배지를 공급하였다. CO<sub>2</sub>로부터 메탄을 생성하는 메탄생성균(Methanogenic bacteria)의 생성을 억제하기 위해 5 mM의 2-bromoethanesulfonate를 환원전극 반응기에

첨가하였다<sup>[16]</sup>. 환원전극 반응기에는 무기탄소원 CO<sub>2</sub> 공급을 위해 CO<sub>2</sub>:N<sub>2</sub>(40:60, v/v) 조성의 혼합가스를 40 mL/min으로 연속적으로 공급하였다. 미생물의 전기환원 활성을 저해할 수 있는 미량 산소를 제거하기 위해 혼합가스는 300°C heating mantle(MS-EB, Misung Scientific co, Korea)에 설치한 구리입자(Copper granule, Junsei, Japan) 함유 유리관으로 통과시켰다. 산화전극 반응기에는 환원전극 반응기와 동일하게 40 mL/min으로 N<sub>2</sub> 가스(99.9%)를 연속적으로 공급하였다.

전압은 전위가변기(Potentiostat; WMPG-1000, Wonatech, Korea)를 사용하여 -0.7~-1.1 V(vs. Ag/AgCl 전극) 범위로 조절하였다. 환원전극 반응기는 원활한 영양분 혼합을 위해 자석교반기(IKA color squid, IKA, Germany)와 마그네틱 바로 200 rpm에서 교반하였다. 산화전극 반응기는 별도로 교반을 하지 않았다. 모든 생물전기화학 반응실험은 항온실(28~30°C)에서 진행하였다.

## 2.3 분석방법

균체성장 및 CO<sub>2</sub> 전환 대사산물 분석을 위해 1~3일 간격으로 환원전극 반응기의 샘플링 포트를 통해 시료를 1 mL 일회용 멸균주사기로 채취하였다. 균체농도는 UV-Vis 분광광도계(UV-Vis spectrophotometer; Optizen 3220UV, Mecasys, Korea)를 사용하여 600 nm 파장에서 흡광도(Absorbance)로 측정하였다<sup>[17]</sup>. 대사산물(유기산과 알코올)은 배양액을 0.2 μm 주사기필터(CA-CN, QingFeng Filter Equipment Co, China)로 여과한 후 DAD(Diode array detector)와 RID(Refractive index detector)가 설치된 고성능 액체크로마토그래프(High-performance liquid chromatograph, HPLC; Agilent 1100, Agilent Inc, USA)로 분석하였다. 분석칼럼은 Aminex HPX-87H ion exclusion column(300 mm × 7.8 mm)이었고, 이동상은 2.5 mM 황산용액을 사용하였다. 칼럼온도 및 주입부피는 각각 65°C 및 10 μl이었다.

## 2.4 순환전압전류 분석 및 쿨롱효율 계산

생물전기화학 반응기내 전극을 통한 산화, 환원 반응의 유무와 특성을 알아보기 위해 순환전압전류법(Cyclic

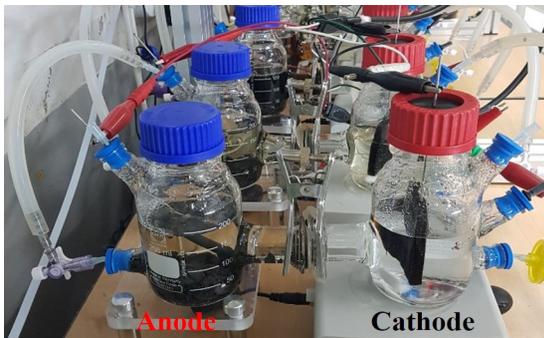


Fig. 1. Photograph of H-type two-chambered bioelectrochemical system

voltammetry, CV) 분석을 실시하였다. 전위가변기로 반응기의 인가전압을 -1.2 V~+0.2V 범위 내에서 10 mV/s 속도로 변화시켜 전류변화를 분석하였다. 산화반응은 인가전압이 증가하는 반응 사이클에서 양의 방향으로 곡선이 관찰되고, 환원반응은 인가전압이 다시 감소할 때 음의 방향으로 곡선이 나타난다<sup>[18]</sup>.

쿨롱효율(Coulombic efficiency, CE)은 아래 식과 같이 반응시간 동안 투입된 총 전하량(쿨롱) 대비 생산물 생성으로 회수된 전하량에 대한 비율로 계산하며, 전기활성 생물촉매의 효율지표로 사용된다<sup>[18]</sup>.

$$CE(\%) = \frac{n \times F \times m}{\int_0^t Idt} \times 100\% \quad (1)$$

총 전하량은 전위가변기를 통해 기록된 전류의 양(I)을 전체 반응시간으로 적분하여 계산한다. n은 1 mole 대사산물의 생성을 위해 필요한 전자 수, F는 패러데이 상수(96,485 C/mole of e<sup>-</sup>), m은 대사산물의 몰 생산량(mole)을 의미한다.

### 2.5 DGGE를 이용한 미생물 균집 분석

미생물 균집은 변성구배 젤 전기영동법(Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)으로 배양 초기(0일), 중간(60일), 종료(90일) 시점 등 세 차례 분석하였다. 혼합미생물 DNA는 DNA 추출키트(FastDNA SPIN Kit for Soil & Feces, MP Biomedicals, USA)로 추출하였다. 추출된 DNA로부터 16S rRNA를 증폭하기 위해 1차로 universal primer인 27F primer와 1492R primer를, 2차로 GC clamp가 부착된 341F-GC primer와 518R primer를 사용하였다<sup>[19]</sup>. 유전자 증폭은 PCR premix system (BioFACT, Korea)을 이용하여 수행하였다.

DGGE 분석을 위해 45~55%(변성제 농도 100%는 7 M urea와 40% formamide를 의미)의 농도구배가 있는 아크릴아마이드젤(Acrylamide gel)을 제조하여 사용하였다. PCR 산물을 젤에 주입한 후 Dcode™ Universal Mutation Detection system(Bio-Rad Laboratories, USA)에서 60°C에서 20 V에서 10분간, 60 V에서 16시간 동안 전기영

동을 수행하였다. DGGE band는 SYBR Gold staining (Invitrogen, USA) 시약으로 염색하였고, Molecular Imager Gel Doc™ XR+ System(Bio-Rad Laboratories, USA)으로 확인하였다. 시퀀스 분석을 위하여 HiGene™ Gel & PCR Purification System(BioFACT, Korea)을 사용하여 16S rRNA를 분리하였고, 분리된 유전자는 341F primer와 518R primer를 이용하여 재 증폭하였다. 증폭된 PCR 산물은 정제 후 All in One™ PCR Cloning Kit(BioFACT, Korea)를 이용하여 클로닝을 통해 시퀀스 분석을 하였다. 최종적으로 EzBioCloud(www.ezbiocloud.net) database에서 시퀀스 분석을 통해 미생물을 동정하였다<sup>[20]</sup>.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1 미생물 농화배양을 통한 전기활성 균체성장 및 아세트산 생산

Fig. 2는 독립영양조건에서 생물전기화학적 CO<sub>2</sub> 전환을 위한 전기활성 혼합미생물 농화배양 및 아세트산 생산 결과를 나타낸다. 철과 같은 금속 농도가 상대적으로 높은 봉암 갯벌에서 채취한 슬러지의 현탁액을 0.02 OD 수준으로 생물전기화학 반응기에 접종하였고, 90일간 3번의 계대배양을 실시하였다(Fig. 2, Stage I~IV). 반응기 운전동안 전압은 -1.1 V(vs. Ag/AgCl)로 고정하였고, 무기탄소원으

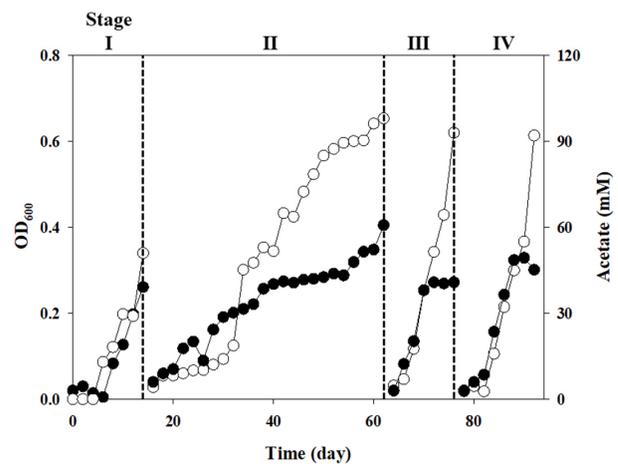


Fig. 2. Microbial enrichment and acetate production from CO<sub>2</sub> for 90 days using bioelectrochemical system, OD<sub>600</sub> (●) and acetate (○). Roman numbers represent repeated batch cultures at 1.1 V

로 CO<sub>2</sub>를 포함한 혼합가스(CO<sub>2</sub>:N<sub>2</sub>=40:60)를 연속 공급하였다.

접종초기 6일 동안 OD 증가가 없었으나, 이후 상당한 미생물 성장이 관찰되었다(Stage I). 배양액을 HPLC로 분석하였을 때 흥미롭게도 아세트산만이 생물전기활성 대사산물로 관찰되었다. 또한 아세트산은 균체농도 증가와 거의 비례적으로 증가하였다. 운전 14일 후 혼합미생물 및 아세트산 농도는 각각 0.26 OD 및 54 mmol/L이었다. 이러한 결과는 접종된 슬러지 미생물들이 전기활성 배양조건에서 성장하고 아세트산을 생산하는데 어느 정도 적응시간이 필요하다는 것을 나타낸다.

두 번째 배양은 전기활성 배양효율을 높이기 위해 두 가지 계대배양 방법의 효율을 조사하였다. 첫 번째로 앞서 14일간 운전한 생물전기화학 반응기의 환원전극을 혐기성 챔버에서 새로운 생물전기화학 배양기에 옮기고, 새로운 영양배지를 첨가하여 운전하였다. 그러나 12일 간의 장기간 배양에도 불구하고, 앞선 운전(Stage I, 54 mmol/L)보다 상당히 낮은 21 mmol/L의 아세트산 생산이 관찰되었다. 이 결과는 본 실험조건의 전기활성 미생물들이 생물막(Biofilm) 형태로 전극과의 직접적인 전자전달보다는 수소와 같은 전자전달 매개체에 대한 의존도가 높아 대부분 부유상태로 존재함을 나타낸다. 실제로 환원전극에서 생물막은 육안으로 관찰하기 어려웠다. 두 번째 방법으로 전기활성 배양액을 새로운 생물전기화학 반응기에 8%(v/v) 수준으로 접종하였다(Fig. 2, Stage II). 첫 번째 배양(Stage I)과 달리 접종 후 지체기 없이 균체성장이 관찰되었다. 균체성장은 총 46일간 꾸준히 증가하여 최종 OD는 0.41에 이르렀다. 아세트산 생산은 접종 후 약 10일간 느리게 증가하였지만, 이후 급속한 증가가 관찰되었다. 배양 46일 후 최대 아세트산 생산농도는 98 mmol/L이었다. 이후 농화 배양은 앞선 배양액 일부를 새로운 반응기에 접종하는 식(8%, v/v)으로 진행하였다.

세 번째와 네 번째 배양은 균체성장과 아세트산 생산이 미생물 접종 직후부터 바로 증가하였다(Fig. 2, Stage III과 IV). 세 번째와 네 번째 배양의 경우 배양기간이 일부 차이가 났지만 최종 균체농도와 아세트산 농도는 각각 약 0.3 OD 및 90 mmol/L로 유사하였다. 아세트산 생산속도는 6.37~7.35 mmol/L/d 범위로 stage I, II(2.04~3.64

mmol/L/d)에 비해 2배 이상 증가하였다. 이는 본 생물전기화학 조건에서 CO<sub>2</sub> 전환 전기활성 미생물들의 농화 배양이 적절히 진행되었음을 나타낸다.

### 3.2 전기 이용 아세트산 전환 효율

Fig. 3은 전기활성 혼합미생물의 네 차례 농화배양동안 투입전기(전자)의 아세트산 전환 쿨롱효율을 나타낸다. 첫 번째 배양의 쿨롱효율은 52%이었고, 두 번째는 다소 낮았지만 이후 계대배양에 따라 쿨롱효율이 증가하는 경향이 관찰되었다. 최대 쿨롱효율은 4차 배양 후 68%로 가장 높았고, 첫 번째 배양 대비 29% 증가하였다. 이는 앞선 아세트산 생산속도의 증가와 함께 CO<sub>2</sub>를 아세트산으로 전환하는 미생물 군집이 전체 배양액 내 우점종이 되고 있음을 나타낸다.

Table 1은 본 연구에서 관찰된 쿨롱효율과 아세트산 농도 및 생산성을 다양한 미생물 접종원을 사용한 문헌과 비교한 결과를 나타낸다. CO<sub>2</sub> 전환 생물전기화학 성능은 미생물축매의 전기활성 뿐만 아니라 다양한 반응기의 운전조건(이온교환막, 전극 종류, 인가전압, 외부 전자매개체 공급 여부 등)에 따라 달라질 수 있으므로 단순비교는 어렵다. 그럼에도 불구하고 본 연구의 최대 아세트산 농도(93 mmol/L) 및 생산성(7.35 mmol/L/d)과 쿨롱효율(64%)은 여러 문헌<sup>[9,11,12,19]</sup>에 비해 전반적으로 우수한 것으로 판단된다. 이는 깃털슬러지가 생물전기화학 CO<sub>2</sub> 전환을 위한

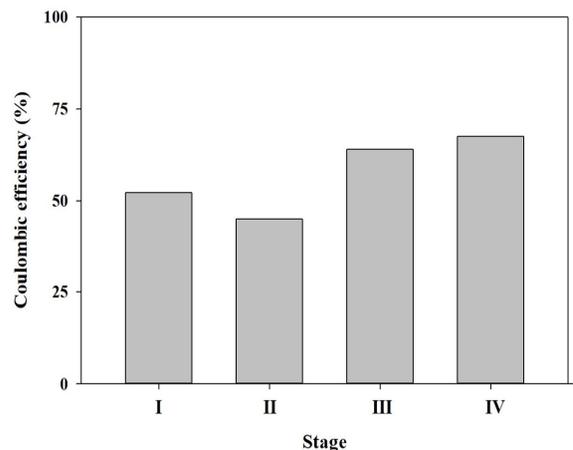


Fig. 3. Coulombic efficiencies of different culture stages during bioelectrochemical operation (See also Fig. 1 for stages I to IV)

Table 1. Comparison of acetate production from CO<sub>2</sub> using mixed culture in bioelectrochemical system

Inoculum source	Membrane*	Cathode	E <sub>cathode</sub> (V vs SHE)	Max. acetate titer (mmol/L)	Max. acetate production rate (mmol/L/d)	Coulombic efficiency (%)	Ref.
UASB sludge	CEM	Carbon felt	-1.26	21.9	1.00	58.0	[11]
Activated sludge from sewage treatment plant	CEM	Carbon felt	-0.95	1.59	1.59	28.4	[13]
Microbial consortium from pond sediment	CEM	NanoWeb-RVC	-0.85	27.5	0.50	70.0	[14]
Anodic effluent from MFC	PEM	3D graphene-nickel foam	-0.85	93.2	3.17	70.0	[19]
Anaerobic digester sludge from wastewater treatment	PEM	Graphite carbon felt	-0.91	86.3	9.51	82.0	[12]
Mud flat	CEM	Graphite carbon felt	-0.90	93.0	7.35	64.0	This study

\* CEM: Cation exchange membrane, PEM: Proton exchange membrane, BPM: Bipolar membrane, SHE: Standard hydrogen electrode

미생물 공급원으로 효과적으로 사용 가능하다는 것을 나타낸다. 아세트산 생산성 및 쿨롱효율의 최적화를 위해서는 혼합미생물의 생리학, 생화학, 분자생물학적 특성을 고려한 추가적인 공정최적화 연구가 필요하다고 판단된다.

### 3.3 순환전압전류 분석

Fig. 4는 미생물을 접종하지 않은 대조군(Abiotic)과 14일간 배양 후 전기활성 배양액(Biotic)에 대한 순환전압전류법(CV) 분석결과를 보여준다. Abiotic의 경우 인가된 전압 범위(-1.2~+0.2 V vs. Ag/AgCl)에서 뚜렷한 전류변

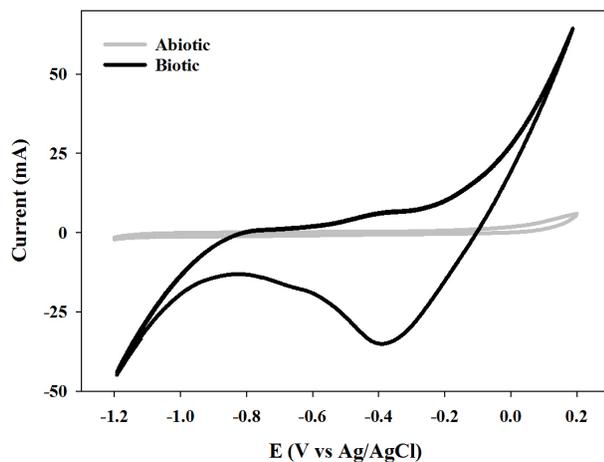


Fig. 4. Cyclic voltammograms (CVs) of biotic and abiotic cultures. CVs were measured at 14 days. The scan rate was 10 mV/s

화가 관찰되지 않았다. 반면 biotic 조건에서는 전압변화에 따라 전류변화가 큰 차이로 확연하게 관찰되었다. 인가전압이 증가하면서 전류변화의 양의 방향으로 나타나는 곡선은 산화반응을 의미하며 전압이 감소하면서 음의 방향으로 나타나는 곡선은 환원반응을 나타낸다<sup>[18]</sup>. 산화반응에 해당하는 곡선은 분명하지 않지만, 환원반응은 약 -0.4~-0.3 V 부근에서 크고 뚜렷한 환원전위 피크가 관찰되었다. 아세트산의 표준 환원전위는 -0.3 V로 알려져 있다<sup>[7]</sup>. 순환전압전류법 분석은 각 계대배양이 종료된 시점에 반복하여 수행하였으며, 동일하게 -0.2~-0.4 V에 부근에서 유사한 환원전위 피크가 관찰되었다. 이는 본 연구에서 농화배양된 혼합미생물이 환원전극 반응기 내에서 전극으로 부터 전자를 받아 CO<sub>2</sub>를 아세트산으로 환원하는 생물전기활성 반응을 일으키는 것을 나타낸다.

### 3.4 미생물 군집 변화

전기활성 혼합미생물의 농화배양에 따른 미생물 군집변화를 DGGE로 분석하였다. DGGE는 변성제로 농도구배를 형성한 젤 내에서 여러 유전자들을 분리하는 분석법이다<sup>[2]</sup>. 각 미생물의 염기서열은 고유한 용해특성을 가지므로 젤 상에서는 서로 다른 밴드로 분리된다. 분석시료는 접종 갯벌 슬러지(0일)와 배양 60일 및 90일차에 채취하였으며, Fig. 5에서 각각 S, M, F 라인으로 표현하였다. S 라인은 M과 F 라인에 비해 DGGE 밴드의 개수가 많고 연하였다. 또한

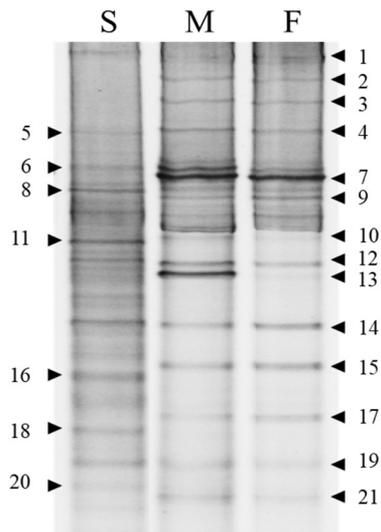


Fig. 5. DGGE profiles of 16S rRNA fragments. The fragments were PCR-amplified from the total DNA extracted from the cathodic microbial suspension. Lines: S, BES inoculum; M and F, microbial samples taken from the reactor at 60 and 90 days, respectively. Arrows indicate DNA bands that were extracted and analyzed for nucleotide sequences

각 밴드들이 비교적 균일한 세기로 나타났다. 이는 특정 우점종 없이 다양한 미생물들로 구성되어 생체량이 적은 군집임을 나타낸다.

두 번째 배양이 종료된 60일차 시료(M 라인)는 분석된 16개의 밴드 중 9개가 S 라인에 비해 진한 세기를 보였다. 진한 밴드는 *Dysgonomonas oryzae*(2번), *Thioclava pacifica*(3번), *Arcobacter* spp.(4번, 6번, 7번), *Acetobacterium malicum*(10번), *Sporomusa paucivorans*(12번), *Rhodobacter vinaykumarii*(13번), *Oscillospira guilliermondii*(15번), *Lentimicrobium saccharophilum*(17번) 종으로 확인되었다. *Sporomusa* 종은 전자공여체를 이용하여 CO<sub>2</sub>를 고정하고 아세트산을 생산하는 독립영양 미생물로 알려졌다<sup>[22]</sup>. *Arcobacter butzleri*의 경우 미생물연료전지(Microbial fuel cell, MFC)에서 처음 분리되었으며 exoelectrogenesis 활성이 보고되었다<sup>[23]</sup>. *Arcobacter cryaerophilus* 역시 putative exoelectrogen으로 분류되었으며<sup>[24]</sup>, MFC에서 부유 상태로 중요한 역할을 한 것으로 보고되었다<sup>[25]</sup>. *R. vinaykumarii*는 M 라인에서 밴드 세기가 가장 선명하게 관찰되었다. *R. vinaykumarii*는 purple non-sulfur bacterium으로 아세트산과 같은 유기물(탄소원)을 전자공

여체로 사용하여 성장하는 미생물로 알려져 있다<sup>[26]</sup>. *D. oryzae*의 경우 혼합미생물을 이용한 MES 시스템의 환원전극 반응기<sup>[27]</sup>와 산화전극 반응기<sup>[28]</sup> 모두에서 발견되었으므로 외부 전자전달 활성을 보유할 가능성이 높을 것으로 판단된다.

네 번째 배양이 종료된 90일차 시료(F 라인)에서는 60일차 시료(M 라인)와 유사한 DGGE 밴드 패턴을 보였으나, 특정 밴드들의 세기가 증가 또는 감소하였다. 배양시간이 지남에 따라 세기가 강해진 밴드들은 *Acetobacterium wieringae*(9번), *Sporomusa sphaeroides*(14번), *Oscillospira guilliermondii*(15번), *Lentimicrobium saccharophilum*(17번)이었다. Homoacetogen에 속하는 *S. sphaeroides*는 Fe(0)로부터 전자를 받아 CO<sub>2</sub>를 이용하여 아세트산을 생산할 수 있는 종으로 알려져 있다<sup>[29]</sup>. 또한 Nevin et al.<sup>[30]</sup>은 *S. sphaeroides*가 환원전극으로부터 전자를 받아 아세트산을 생성하는 것을 보고하였다. *Oscillospira guilliermondii*와 *Lentimicrobium saccharophilum*도 MFC의 산화전극 반응기에서 발견된 보고가 있다<sup>[23,26]</sup>. 이 외에도 아세트산 생성 미생물인 *Acetobacterium* spp.(1번, 9번, 10번)가 발견되었다. *R. vinaykumarii*는 밴드 세기가 M 라인보다 F 라인에서는 다소 감소하였다. CO<sub>2</sub> 이용 전기활성이 있을 것으로 추정되는 *D. oryzae*(2번)도 확인되었다.

전기화학 조건에서 90일간 농화배양된 미생물 군집을 DGGE로 분석하였을 때 전체적으로 아세트산을 생산하는 acetogen으로 알려진 미생물들이 우위를 차지함을 확인하였다. 그러나 본 생물전기화학 시스템에서 아세트산 외 다른 대사물질들이 관찰되지 않았지만, 군집 내 다양한 미생물간의 공생관계(Syntrophic association)의 가능성도 있을 것으로 판단된다. 즉 CO<sub>2</sub>로부터 아세트산을 주요 산물로 생산하는 독립영양 미생물들과 함께, 이들 미생물이 생산하는 수소, 유기산, 에탄올 등의 대사산물을 이용하여 성장하는 종속영양 미생물들도 복잡한 영양관계를 가지고 군집을 형성할 수 있다<sup>[31]</sup>. 따라서 생물전기화학 유용물질 생산기술의 효율 최적화를 위해서는 미생물 공생관계 및 군집형성에 대한 생리학, 생화학 및 분자생물학적 특성에 대한 추가연구가 필요하다.

Table 2. BLAST analysis results comparing DGGE band–sequence similarities to those in database

Band no*	Best match in BLAST analysis (Accession no.)	Similarity (%)	Taxonomic description (class)
1	<i>Acetobacterium tundrae</i> DSM 9173 (AJ297449)	99	Clostridia
2	<i>Dysgonomonas oryzae</i> (AB547446)	99	Bacteroidia
3	<i>Thioclava pacifica</i> DSM 10166 (AUND01000024)	99	$\alpha$ -proteobacteria
4	<i>Arcobacter cryaerophilus</i> strain L406 305 (LRUV01000021)	99	$\epsilon$ -proteobacteria
5	Uncultured epsilon proteobacterium clone (JX570599)	99	$\epsilon$ -proteobacteria
6	<i>Arcobacter butzleri</i> RM 4018 (CP000361)	100	$\epsilon$ -proteobacteria
7	<i>Arcobacter cryaerophilus</i> CCUG 17081 (L14624)	99	$\epsilon$ -proteobacteria
8	<i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b (ADVE01000118)	99	$\alpha$ -proteobacteria
9	<i>Acetobacterium wieringae</i> DSM 1911 (LKEU01000008)	100	Clostridia
10	<i>Acetobacterium malicum</i> DSM 4132 (X96957)	99	Clostridia
11	<i>Sulfurovum denitrificans</i> eps51 (LC322101)	100	$\epsilon$ -proteobacteria
12	<i>Sporomusa paucivorans</i> DSM 3697 (FR7499.9)	99	Negativicutes
13	<i>Rhodobacter vinaykumarii</i> DSM 18714 (jgi_1096505)	99	$\alpha$ -proteobacteria
14	<i>Sporomusa sphaeroides</i> DSM 2875 (AJ279801)	98	Negativicutes
15	<i>Oscillospira guilliermondii</i> OSC5 (AB040499)	100	Clostridia
16	Uncultured actinobacterium clone u72 (GQ850547)	95	Acidimicrobiia
17	<i>Lentimicrobium saccharophilum</i> TBC1 (DF968182)	92	Bacteroidia
18	Uncultured bacterium clone CI5cm, A08 (EF208679)	99	$\alpha$ -proteobacteria
19	<i>Sulfurimonas gotlandica</i> GD1 (ABXD01000011)	98	$\epsilon$ -proteobacteria
20	Uncultured bacterium clone P9X2b8E03 (EU491326)	99	$\gamma$ -proteobacteria
21	Uncultured gamma proteobacterium (AM882560)	99	$\gamma$ -proteobacteria

\* The bands are numbered according to Fig. 5.

#### 4. 결론

본 연구에서는 접종원으로 갯벌 슬러지를 이용하여 생물 전기화학반응 시스템에서 CO<sub>2</sub> 전환 전기활성 혼합미생물의 농화배양 및 미생물군집 분석을 수행하였다. 접종 후 90일간 3번의 계대배양을 통해 93 mmol/L 및 7.35 mmol/L/d의 우수한 아세트산 농도와 생산성을 얻었다. 이 때 전자의 아세트산 전환 쿨롱효율은 64%이었다. 순환전압전류 분석을 통해 아세트산 환원전위와 유사한 -0.2~-0.4 V 부근에서 뚜렷한 환원전위 피크가 관찰되었다. 분자생물학적 DGGE 분석결과는 농화배양을 따라 미생물군의 조성 및 농도가 상당히 바뀌었음을 나타낸다. 이들 결과들은 금속이온이 풍부한 갯벌슬러지가 생물전기화학 CO<sub>2</sub> 전환을 위한 미생물 공급원으로 효과적으로 사용 가능하다는 것을 나타낸다.

#### 감사의 글

본 연구는 한국에너지기술연구원의 주요사업(B9-2442-04)과 과학기술정보통신부 한국연구재단(NRF-2019R1A2C1003463)의 지원을 받아 수행하였습니다.

#### References

- [1] Zhu, Q., 2019, "Developments on CO<sub>2</sub>-utilization technologies", *Clean Energy*, **3**(2), 85-100.
- [2] Seo, H., Kim, H., and Jeon, E., 2019, "Environmental improvement effect and social benefit: Focusing on bio-heavy oil power generation", *New. Renew. Energy*, **15**(3), 85-92.
- [3] Kim, B., Praveenkumar, R., Kim, D.M., Lee, K., Lee, Y.C., and Oh, Y.K., 2016, "Magnesium aminoclay

- enhances lipid production of mixotrophic *Chlorella* sp. KR-1 while reducing bacteria populations”, *Bioresour. Technol.*, **219**, 608-613.
- [4] Oh, Y.K., Hwang, K.R., Kim, C., Kim, J.R., and Lee J.S., 2018, “Recent developments and key barriers to advanced biofuels: A short review”, *Bioresour. Technol.*, **257**, 320-333.
- [5] Rojas, M.D.P.A., Zaiat, M., Gonzalez, E.R., De Wever, H., and Pant, D., 2018, “Effect of the electric supply interruption on a microbial electrosynthesis system converting inorganic carbon into acetate”, *Bioresour. Technol.*, **266**, 203-210.
- [6] Rabaey, K., and Rozendal, R.A., 2010, “Microbial electrosynthesis-revisiting the electrical route for microbial production”, *Nat. Rev. Microbiol.*, **8**(10), 706-716.
- [7] Xiang, Y., Liu, G., Zhang, R., Lu, Y., and Luo, H., 2017, “High efficient acetate production from carbon dioxide using a bioanode microbial electrosynthesis system with bipolar membrane”, *Bioresour. Technol.*, **233**, 227-235.
- [8] Byun, Y.H., and Park, N., 2018, “Analysis of international joint research into new and renewable energy technology”, *New. Renew. Energy*, **14**(1), 4-11.
- [9] Karthikeyan, R., Singh, R., and Bose, A., 2019, “Microbial electron uptake in microbial electrosynthesis: a mini-review”, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **46**(9-10), 1419-1426.
- [10] Bajracharya, S., Yuliasni, R., Vanbroekhoven, K., Buisman, C.J.N., Strik, D.P.B.T.B., and Pant, D., 2017, “Long-term operation of microbial electrosynthesis cell reducing CO<sub>2</sub> to multi-carbon chemicals with a mixed culture avoiding methanogenesis”, *Bioelectrochemistry*, **113**, 26-34.
- [11] Patil, S.A., Arends, J.B.A., Vanwonterghem, I., Van Meerbergen, J., Guo, K., Tyson, G.W., and Rabaey, K., 2015, “Selective enrichment establishes a stable performing community for microbial electrosynthesis of acetate from CO<sub>2</sub>”, *Environ. Sci. Technol.*, **49**(14), 8833-8843.
- [12] Im, C.H., Song, Y.E., Jeon, B.H., and Kim, J.R., 2016, “Biologically activated graphite fiber electrode for autotrophic acetate production from CO<sub>2</sub> in a bioelectrochemical system”, *Carbon. Lett.*, **20**(1), 76-80.
- [13] Jiang, Y., Su, M., Zhang, Y., Zhan, G., Tao, Y., and Li, D., 2013, “Bioelectrochemical system for simultaneously production of methane and acetate from carbon dioxide at relatively high rate”, *Int. J. Hydrogen. Energy*, **38**(8), 3497-3502.
- [14] Jourdin, L., Freguia, S., Donose, B.C., Chen, J., Wallace, G.G., Keller, J., and Flexer, V., 2014, “A novel carbon nanotube modified scaffold as an efficient biocathode, material for improved microbial electrosynthesis”, *J. Mater. Chem. A.*, **2**(32), 13093- 13102.
- [15] Hwang, D.W., Lee, I.S., Choi, M., Kim, C.S., and Kim, H.C., 2015, “Evaluation of pollution level for organic matter and trace metals in sediments around Taehwa river estuary, Ulsan”, *Korean. J. Fish. Aquat. Sci.*, **48**(4), 542-554.
- [16] Wang, L., Trujillo, S., and Liu, H., 2019, “Selective inhibition of methanogenesis by acetylene in single chamber microbial electrolysis cells”, *Bioresour. Technol.*, **274**, 557-560.
- [17] Jiao, Y., Kappler, A., Croal, L.R., and Newman, D.K., 2005, “Isolation and characterization of a genetically tractable photoautotrophic Fe (II)-oxidizing bacterium, *Rhodospseudomonas palustris* strain TIE-1”, *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**(8), 4487-4496.
- [18] Mayer, F., Enzmann, F., Lopez, A.M., and Holtmann, D., 2019, “Performance of different methanogenic species for the microbial electrosynthesis of methane from carbon dioxide”, *Bioresour. Technol.*, **289**, 1-10.
- [19] Muyzer, G., De Waal, E.C., and Uitterlinden, A.G., 1993, “Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA”, *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**(3), 695-700.
- [20] Yoon, S.H., Ha, S.M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., and Chun, J., 2017, “Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies”, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **67**(5), 1613-1617.
- [21] Song, T.S., Fei, K., Zhang, H., Yuan, H., Yang, Y., Ouyang, P., and Xie, J., 2018, “High efficiency microbial electrosynthesis of acetate from carbon dioxide using a

- novel graphene-nickel foam as cathode”, J. Chem. Technol. Biotechnol., **93**(2), 457-466.
- [22] Zhang, T., Nie, H., Bain, T.S., Lu, H., Cui, M., Snoeyenbos-West, O.L., and Lovely, D.R., 2013, “Improved cathode materials for microbial electrosynthesis”, Energy Environ. Sci., **6**(1), 217-224.
- [23] Fedorovich, V., Knighton, M.C., Pagaling, E., Ward, F.B., Free, A., and Goryanin, I., 2009, “Novel electrochemically active bacterium phylogenetically related to *Arcobacter butzleri*, isolated from a microbial fuel cell”, Appl. Environ. Microbiol., **75**(23), 7326-7334.
- [24] Beecroft, N.J., Zhao, F., Varcoe, J.R., Slade, R.C.T., Thumser, A.E., and Avignone-Rossa, C., 2012, “Dynamic changes in the microbial community composition in microbial fuel cells fed with sucrose”, Appl. Microbiol. Biotechnol., **93**(1), 423-437.
- [25] Shimoyama, T., Yamazawa, A., Ueno, Y., and Watanabe, K., 2009, “Phylogenetic analyses of bacterial communities developed in a cassette-electrode microbial fuel cell”, Microbes. Environ., **24**(2), 188-192.
- [26] Srinivas, T.N.R., Kumar, P.A., Sasikala, C., Ramana, C.V., and Imhoff, J.F., 2007, “*Rhodobacter vinaykumarii* sp. nov., a marine phototrophic alphaproteobacterium from tidal waters, and emended description of the genus *Rhodobacter*”, Int. J. Syst. Evol. Microbiol., **57**(Pt 9), 1984-1987.
- [27] Kumar, S.S., Basu, S., and Bishnoi, N.R., 2017, “Effect of cathode environment on bioelectricity generation using a novel consortium in anode side of a microbial fuel cell”, Biochem. Eng. J., **121**, 17-24.
- [28] Vassilev, I., Hernandez, P.A., Batlle-Vilanova, P., Freuia, S., Kromer, J.O., Keller, J., and Virdis, B., 2018, “Microbial electrosynthesis of isobutyric, butyric, caproic acids, and corresponding alcohols from carbon dioxide”, ACS. Sustain. Chem. Eng., **6**(7), 8485-8493.
- [29] Philips, J., Monballyu, E., Georg, S., De Paepe, K., PrevotEAU, A., Rabaey, K., and Arends, J.B., 2018, “An *Acetobacterium* strain isolated with metallic iron as electron donor enhances iron corrosion by a similar mechanism as *Sporomusa sphaeroides*”, FEMS Microbiol. Ecol., **95**(2), fty222.
- [30] Nevin, K.P., Hensley, S.A., Franks, A.E., Summers, Z.M., Ou, J., Woodard, T.L., Snoeyenbos-West, O.L., and Lovley, D.R., 2011, “Electrosynthesis of organic compounds from carbon dioxide is catalyzed by a diversity of acetogenic microorganisms”, Appl. Environ. Microbiol., **77**(9), 2882-2886.
- [31] Morris, B.E., Henneberger, R., Huber, H., and Moissl-Eichinger, C., 2013, “Microbial syntrophy: interaction for the common good”, FEMS Microbio. Rev., **37**(3), 384-406.