

초고온성 고세균 *Thermococcus onnurineus* NA10에 의한 수소생산

김옥선^{*,**}, 나정걸^{*}, 김해진^{****}, 이영우^{***}, 김미선^{*†}

*한국에너지기술연구원 폐자원에너지센터, **충남대학교 화학공학,

녹색에너지기술전문대학원, *(주)엔솔테크

Hydrogen Production from Hyperthermophilic Archaeobacteria *Thermococcus onnurineus* NA1

OKSUN KIM^{*,**}, JEONGGEOL NA^{*}, HAEJIN KIM^{****}, YOUNGWOON RHEE^{***}, MISUN KIM^{*†}

**Wastes Energy Research Center, Korea Institute of Energy Research,
71-2 Jang-dong Yuseong-gu Daejeon 305-343, Korea*

***Chemical engineering, Chungnam National University, Yuseong-gu Daejeon 303-764, Korea*

****Graduate School of Green Energy Technology, Chungnam National University,
Yuseong-gu Daejeon 303-764, Korea*

*****Ensoltek, 925 Tannip-dong Yuseong-gu Daejeon 305-510, Korea*

ABSTRACT

A hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus onnurineus* NA1 was studied to investigate its fermentation characteristics using various carbon sources including formate, maltose and carbon monoxide during the anaerobic batch cultivation at 80°C. Formate was the best carbon source for cell growth and hydrogen production among others. In the batch culture on formate, it was found that the cell concentration increased exponentially by 12 hrs of culture, after which the cell growth and formate consumption was retarded. Hydrogen production was continued more than 24 hrs although the cell growth was ceased at 18 hrs. Hydrogen production rate was directly correlated with the cell growth and formate degradation up to 18 hrs, and the average hydrogen production yield was 1.05 mole-H₂/mole-formate. Cell growth and hydrogen production were optimized at the initial pH 6-7, while inhibited at the initial pH lower than 5 and higher than 9.

KEY WORDS : Hyperthermophilic archaeon(초고온성 고세균), *Thermococcus onnurineus* NA1(고세균), Formate(개미산), Anaerobic batch culture(회분식 혐기 배양), Hydrogen-production(수소 생산)

1. 서 론

생물학적 전환에 의한 수소생산 공정은 미생물의 다양한 메커니즘에 따라 이루어지며 화학공정에 비

[†]Corresponding author : bmmkim@kier.re.kr

[접수일 : 2011.2.8 수정일 : 2011.10.18 게재확정일 : 2011.10.21]

하여 온화한 조건에서 운전되고 부산물이 거의 없어 환경 친화적인 기술로 평가되고 있다^{4,5)}. 수소를 생산하는 미생물은 크게 광합성 세균, 혐기성 세균, 고세균, 조류 등으로 구분된다. 미생물이 갖는 수소생산 기작은 광원의 유무에 따라 수소생산 발생경로가 다를 뿐만 아니라, 기질의 종류 및 미생물 고유의 효소계에 의해 수소생산 기작이 달라진다. 이 중 혐기성세균이나 고세균은 광합성 세균과는 달리 빛이 없는 조건에서도 발효가 일어나므로 다양한 기질을 이용하여 밤·낮 구별 없이 수소를 생산할 수 있으며, 균체 성장속도가 빨라 연속 배양이나 대형 시설에 적용하기 편리하다^{2,10)}.

특히, 일부 고세균들은 높은 온도에서 기능할 수 있는 효소를 가지고 있고, 계면활성제 및 유기용매 등에 대한 안정성이 매우 우수하여 소량의 효소로도 장기간 사용이 가능하기 때문에 중온성 미생물의 단점을 극복할 수 있다²⁾. 학문적으로도 내열성의 원인 규명, 구조생물학 등의 재료로서 매우 중요하다. 또한 고온에서 성장하므로 실폐수나 폐기물을 이용할 경우 멸균 등의 전처리 과정 없이도 다른 박테리아에 의한 오염을 피할 수 있기 때문에 다양한 분야에서 산업적으로 이용하려는 연구가 활발히 진행되고 있다³⁾.

본 연구에서 대상으로 하는 수소생산 미생물은 고세균의 일종인 *Thermococcus onnurineus* NA1으로 파푸아뉴기니 해역의 열수구 지대에서 채취되었다^{6,7)}. NA1은 '*Thermococcus*'의 'Thermo-'라는 이름에서 알 수 있듯이 80°C 이상의 고온에서 서식하는 극한 미생물이다. NA1은 지금까지 알려진 미생물들 중 가장 많은 8개의 hydrogenase cluster를 보유하고 있으며, 특히 CO dehydrogenase와 formate dehydrogenase를 갖고 있는 특징이 있다^{9,14)}. 이러한 대사경로의 특징으로 절대혐기 조건에서 CO(carbon monoxide)와 formate, starch 등 다양한 기질로부터 수소를 생성할 수 있다.

본 연구에서는 다양한 기질을 이용하여 *T.onnurineus* NA1의 균체성장 및 수소생산을 확인하였으며, 그 중 가장 활발한 성장을 나타내는 formate를 이용하였을 때의 수소생산 특징을 살펴보았다. 초기 formate

농도와 pH를 각각 150 mM과 7.0으로 하여 80°C에서 24시간 동안 혐기조건에서 배양하는 과정 중 균체성장, 수소 생산량, formate 분해율을 관찰하였다. 또한 초기 formate농도 및 pH가 세포성장과 수소생산에 미치는 영향을 연구하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 배지조성

배양에 사용된 배지는 modified medium 1(mm1)^{12,14)}으로 조성은 다음과 같다(1L): NaCl 35g, KCl 0.7g, CaCl₂·2H₂O 0.4g, NH₄Cl 0.3g, NaHCO₃ 0.5g, Cystein-HCl 0.5g, Yeast extract 1g, MgSO₄ 3.9g, Na₂HPO₄ 0.15g, Na₂SiO₃ 0.003g, trace elements solution 1 ml, vitamin solution 1ml¹⁾. 탄소원으로는 sodium formate, carbon monoxide, maltose를 사용하였다. 초기 pH는 2 N HCl을 사용하여 7.0으로 맞추어 주었다.

2.2 배양조건

25ml serum bottle에 mm1배지를 10ml 넣고 균주를 접종(10% 접종)한 다음 고무마개와 알루미늄캡으로 막았다. 혐기상태로 만들어 주기 위하여 head space와 배지를^{12,13)} 알곤 가스로 10분 이상 충분히 치환을 시켜주었다. 탄소원으로 CO를 이용하였을 때에도 앞에서 말한것과 동일하게 head space와 배지를 CO를 이용하여 치환시켜 주었다. 배양은 80°C의 water bath(N-BIOTEK, INC.NB-302)에서 이루어 졌으며 모든 실험은 3회 반복하여 평균값을 기록하였다.

2.3 분석

배양액의 pH는 pH meter(TOA, model 30G)로 실온에서 측정하였고, 균체농도는 UV-VIS spectrophotometer (Shimadzu UV-1601)로 파장 660 nm에서 흡광도를 측정 후 건조 균체량과의 상관식으로부터 환산하여 계산하였다.

수소함량은 serum bottle head space의 gas를

Table 1 Analysis condition of gas chromatography

Detector		Thermal conductivity detector (TCD)
Column		Molecular sieve 5 A (supelco)
Carrier gas		Ar (flow rate : 60 ml/min)
Temp.	Detector	120℃
	Injector	100℃
	Column	80℃

gas-tight microsyringe로 100 μ l를 채취하여 gas chromatography(Shimadzu 14B)로 분석하였다. GC 분석조건은 Table 1에 정리하였다.

Formate는 HPLC를 사용하여 분석하였다. 발효액을 12,000 rpm(Eppendorf, centrifuge 5415D)에서 5분간 원심분리하고 상등액을 0.2 μ m filter로 여과한 후 Aminex HPX-87H를 장착한 HPLC(Shimadzu LC-10AT)에 주입하였다. 주입량은 20 μ l이고, 이동상으로는 10 mM H₂SO₄를 이용하였으며 0.6 ml/min의 flow rate으로 용출하였다. 분석 온도는 35℃이며 UV detector를 이용하여 파장 215 nm에서 측정하였다¹⁵⁾.

3. 결과 및 고찰

3.1 다양한 기질을 사용한 수소생산 특성

Thermococcus onnurineus NA1은 다양한 기질을 이용할 수 있는 대사경로를 가지고 있다^{9,14)}. 본 연구에서는 formate(유기산), maltose(당류), CO(가스) 등의 다양한 탄소원을 이용하였을 때 NA1의 균체 성장과 수소생산에 대해 살펴보았다.

초기 균체 농도를 0.005(g/L)로 하여 48시간 동안 배양하였으며 탄소원의 초기 농도는 formate 1% (150mM), CO 100%(100mM), maltose 1%(30mM) 와 maltose 5.4%(150mM)로 하였다.

NA1은 세 가지 기질을 모두 이용하여 수소를 생산할 수 있으나 생산성에서는 차이를 나타내었다 (Fig. 1). 배양액 내 pH 변화를 보면, formate를 이용하였을 때에는 pH가 초기 배양 8시간 동안 8.2까지 상승하였고, 그 후 48시간까지 유지된 반면 maltose

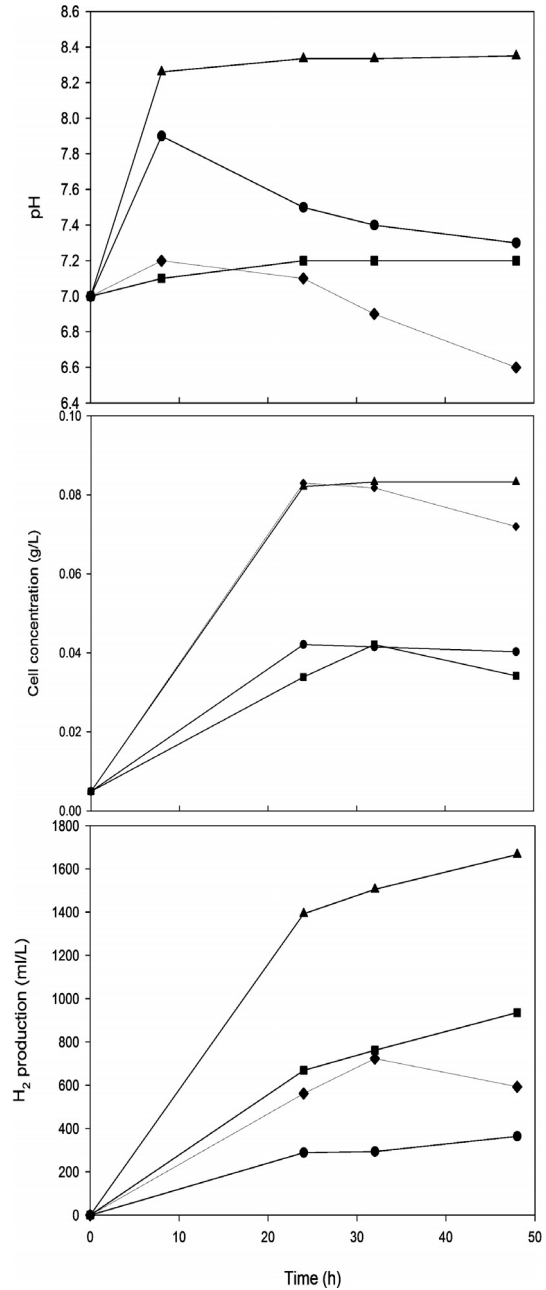
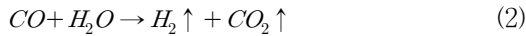
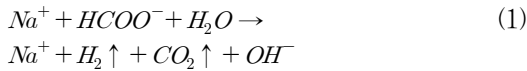


Fig. 1 Growth curve of *T. onnurineus* NA1 in their various carbon source ; (▲) formate 1%, (■) CO 100 %, (●) maltose 1%, (◆) maltose 5.4%

30m M를 이용하였을 때에는 pH가 상승하였다가 7.3으로 감소하였고 maltose 150 mM에서는 6.6까

지 감소하였다. CO 이용 시에는 초기 pH 7.0~7.2가 배양 중 유지되었다. Formate와 CO를 이용하였을 때의 pH 변화는 아래와 같은 화학식으로부터 예상할 수 있다^{11,14}.



즉, 식 (1)과 같이 formate는 수용액 중에서 OH⁻를 발생하여 pH가 증가 한 것으로 사료되며, CO는 식 (2)와 같이 배양 중 수소와 이산화탄소가 발생하는데, 높은 배양온도(80°C)에서 CO₂가 수용액 중에 용해되지 않고 수소와 같이 배출 되어 pH가 유지되었다. Maltose를 이용하였을 때에는 당의 분해에 의하여 유기산이 발생하므로 배양액 내 pH가 감소하는 것으로 판단된다⁸⁾.

탄소원으로 formate를 이용하였을 때 최대 균체 성장 0.09g/L와 수소생산 1.7 H₂ L/L-broth 로 가장 활발하게 이루어졌다. maltose 150mM을 이용하였을 때는 0.7 H₂ L/L-broth의 수소생산을 나타내었고 maltose 30 mM은 0.4 H₂ L/L-broth로 가장 저조한 수소생산을 나타내었다.

CO는 formate와 비교하여 약 50%의 수소발생을 나타내었는데, 이는 탄소원으로서의 이용 효율 이외에 물에 대한 낮은 용해도(<8 ppm @ 80°C) 때문인 것으로 보인다. 따라서, 적절한 가스 전달 향상 방안이 개발된다면 바이오매스나 석탄 등의 중질 탄소원 가스화 공정에서 생산되는 합성가스로부터 수소를 생산하는데 적용할 수 있으리라 기대된다.

3.2 formate를 이용한 수소생산 특성

가장 우수한 생산성을 나타낸 formate를 이용하였을 때 *Thermococcus onnurineus* NA1의 균체 성장 및 수소 생산 특성을 보기 위하여 80°C에서 24시간 동안 배양하며 3시간마다 샘플을 채취하였다. pH는 7.0으로 유지시켜 주었으며, 2 N HCl을 사용하였다. 또한, 초기 균체농도는 0.005(g/L)으로 맞추

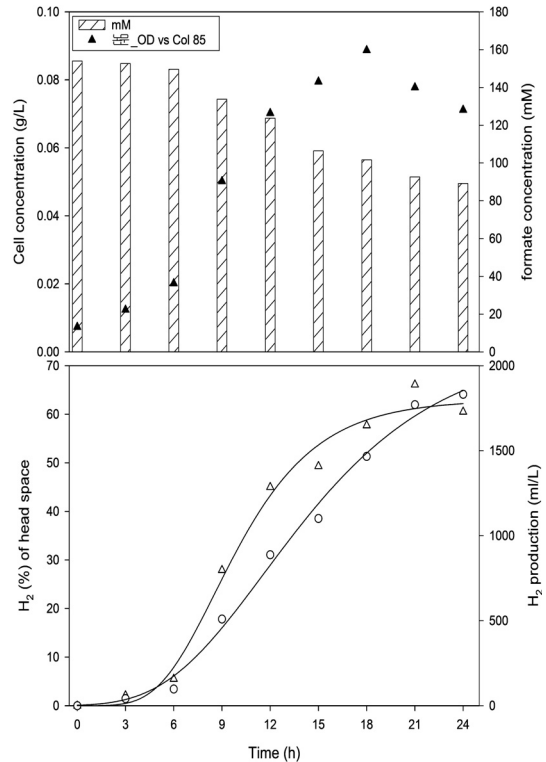


Fig. 2 Growth curve of *T. onnurineus* NA1 in the modified medium, mM; (▲) cell concentration, (▨) formate concentration, (△) H₂ (% of head space), (○) H₂ production

어 주었다. 배양 후 12시간까지 지수 성장하여 16시간 쯤 배양액의 균체농도가 0.09(g/L)로 증가하였다가, 이 후 성장이 지체되었고 19시간 부터는 오히려 감소하였다(Fig. 2).

수소분압의 변화를 보면 16시간까지는 균체 성장과 유사한 패턴을 나타내었으며, 이 후 균체농도는 증가하지 않았으나 수소분압은 일부 증가하였다. 이는 세포성장이 멈춘 후에도 일정기간 동안 수소생산효소 시스템이 작동하기 때문이다. 비성장속도 ($-\frac{dX}{Xdt}$)와 수소비생산속도 ($\frac{dH_2}{Xdt}$)를 나타낸 Fig. 3을 보면 NA1의 수소생산 속도는 균체성장 속도와 균체 농도에 비례하는 전형적인 Luedeking-Piret 모델(식 (3))을 따름을 알 수 있다.

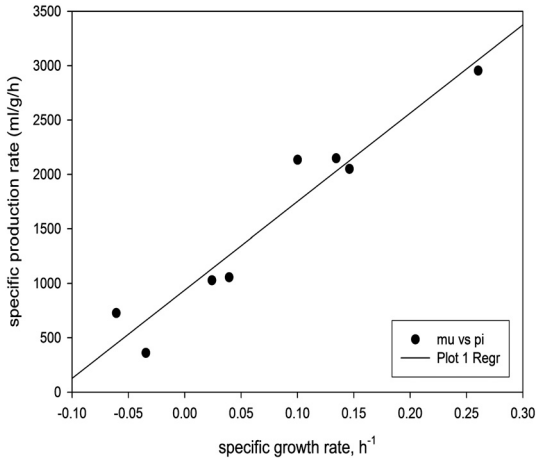


Fig. 3 Relationship of cell growth to production

$$\frac{1}{X} \frac{dH_2}{dt} = \alpha \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} + \beta \quad (3)$$

각 샘플링 구간에서 생산된 수소 생산량을 formate 소모량으로 나눈 값을 도시한 결과(Fig. 4), 배양기간 동안 균체 및 formate 농도에 무관하게 1.05의 일정한 값을 나타내었다. 식 (2)에 따르면 formate 1 mole 당 이론적으로 수소 1 mole이 생성되어야 하므로 Fig. 4에서 얻은 값은 formate 단독 탄소원에 의한 결과라기보다 배지에 질소원으로 포함된 yeast extract의 영향이 반영된 것으로 판단된다. 배양 16시간 이후 균체성장은 거의 정지되었고, formate 소모역시 이루어지지 않았다. 이 때 formate 농도는 90 mM로, 성장 및 수소생산 저해가 formate 고갈로 인하여 발생하였기보다는 배지 내에 독성물질이 축적되어 산물 저해 현상이 나타났기 때문으로 판단된다.

Table 2 Effect of formate concentration on cell growth and H₂ contents

	Concentration	Cell concentration	pH	H ₂ production	
	mM/L	g/L		%	ml/L
Formate	0	0.027	7.7	6.0	138.7
	75	0.060	7.9	21.7	560.5
	150	0.061	7.9	21.9	565.6
	300	0.061	7.9	24.0	629.1

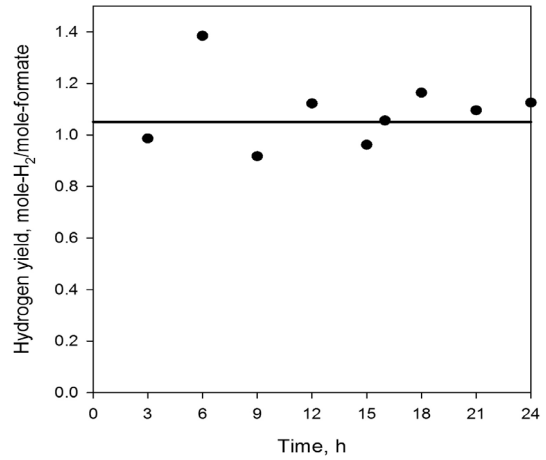


Fig. 4 Hydrogen yield from formate with time

수소생산 속도는 16시간까지 1.9 L-H₂/L/d 이다.

3.3 초기 formate 농도의 영향

초기 formate 농도가 세포성장 및 수소생산에 미치는 영향을 관찰하고자 formate 초기 농도를 0, 75, 150, 300 mM로 달리하여 8시간 동안 배양을 수행하였다. 배양시간을 8시간으로 한 이유는 균체가 활발히 성장할 때의 특성만을 보기 위함이다. 초기 균체 농도는 0.01 g/L에서 배양하였다. Table 2를 보면 formate 농도가 낮더라도 세포성장 및 수소생산성에 큰 차이가 없었다. formate가 존재하지 않을 때에도 균체가 일부 자라는 것은 배지에 포함된 yeast extract 때문이다. 초기 formate 농도 75 mM에서도 균체성장이 이루어졌으므로 3.2 절에서 나타난 12시간 이후의 균체성장 저해가 formate 고갈로 인한 현상이 아님을 확인할 수 있다.

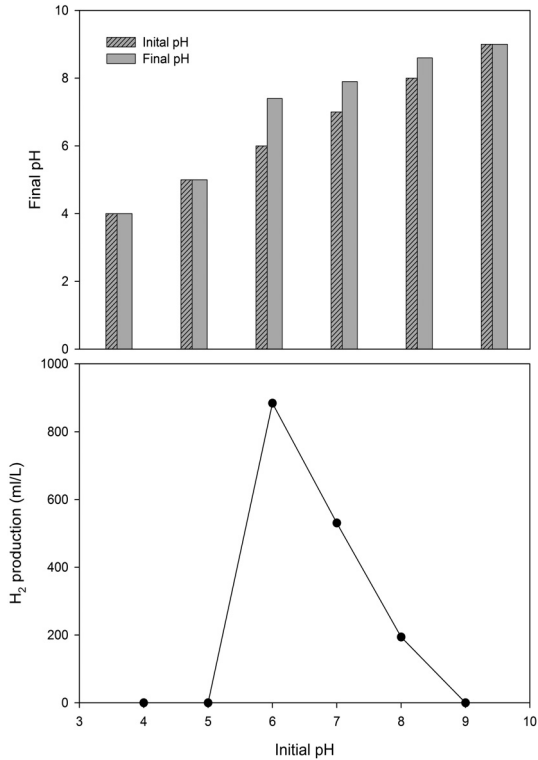


Fig. 5 Effect of initial pH on Hydrogen production related parameter

3.4 초기 pH의 영향

초기 pH를 4, 5, 6, 7, 8, 9로 달리하여 8시간 동안 세포성장 및 수소생산을 관찰하였다. 초기 균체 농도는 0.005 g/L에서 배양하였다. 초기 pH 6-8일 때 수소생산이 이루어졌고, 수소생산성은 6 > 7 > 8 순이었다(Fig. 5). 나머지 조건에서는 수소생산이 이루어지지 않았고, 최종 pH를 비교해 본 결과 수소생산이 이루어지지 않은 4, 5, 9에서는 pH 변화도 관찰되지 않았다. 균체 성장에 있어서도 초기 pH 6-8 일 때 이루어 졌으며, 6과 7일 때 활발한 균체 성장이 이루어 졌다. 초기 pH 4와 5에서는 균체 성장이 거의 이루어지지 않았다. 초기 pH가 9일 때 흡광도 값이 높게 나온 이유는 수소생산량을 보았을 때 균체가 아닌 침전물 때문인 것으로 보인다. 따라서, *T. onnurineus* NA1의 균체 성장에 있어서 pH 조절이 중요함을 확인할 수 있었다.

4. 결 론

- 1) 다양한 탄소원에 대한 *T. onnurineus* NA1의 희분식 배양을 수행하였다. 균체 성장 및 수소 생산 측면에서 formate가 가장 우수한 탄소원인 것으로 나타났다.
- 2) 초기 formate 농도를 150 mM로 하였을 때 배양 시간별로 균체 성장 및 수소생산 특성을 살펴 본 결과, 배양 12시간까지 균체 농도가 지속적으로 증가 하다가 그 이후부터는 증가하지 않았으며 formate 소모도 느려졌다. 수소 생산은 균체 성장 정지 후에도 지속되었다.
- 3) 수소 수율은 배양기간 동안 1.05 mol H₂/mol-formate로 일정하였고 수소생산 속도는 16시간까지 1.9 L-H₂/L/d이다.
- 4) 초기 formate 농도가 75 mM 이상일 때 균체 성장 및 수소생산은 거의 일정하였다. 배양 12시간 이후에 나타나는 세포 성장 정지는 formate 고갈보다는 독성 물질 축적 때문인 것으로 판단된다.
- 5) 초기 pH가 6.0-7.0일 때 균체성장 및 수소생산이 활발하였고, 초기 pH 5이하일 때와 9이상일 때에는 균체성장 및 수소생산이 이루어지지 않았다.

후 기

이 연구(논문)는 국토해양부의 지원으로 수행하는 해양과학기술 연구개발사업 “해양 고세균이용 바이오 수소생산기술개발”의 일환으로 수행되었습니다.

참 고 문 헌

- 1) Balch, W. E., G. E. Fox, L. J. Magrum, C. R. Woese, and R.S. Wolfe, Methanogens : reevaluation of a unique biological group. Microbiol. Rev., Vol. 43, No. 2, 1979, pp. 260-296.
- 2) Chung Jung Chou, Francis E. Jenney Jr., Michael W.W. Adams, Robert M. Kelly., Hydrogenesis in hyperthermophilic microorganisms : Impli-

- cations for biofuels. *Metabolic Engineering*. Vol. 10, 2008, pp. 394-404.
- 3) Claassen PAM, Lier JBV, Lopez CAM, Niel EWJ, Sijtsma L, Stams AJM, et al., Utilization of biomass for the supply of energy carriers. *Appl Microbiol Biotechnol*. Vol. 52, 1999, pp. 741-55.
 - 4) Das, D., Veziroglu, T.N., Hydrogen production by biological processes : a survey of literature. *Int. J. Hydrogen Energy*. Vol. 26, 2001, pp. 13-28.
 - 5) Hallenbeck, P.C., Benemann, J.R., Biological hydrogen production : fundamentals and limiting processes. *Int. J. Hydrogen Energy*. Vol. 27, 2002, pp. 1185-1193.
 - 6) Holden, J.F., K. Takai, M. Summit, S. Bolton, J. Zyskowski, and J. A. Baross., Diversity among three novel groups of hyperthermophilic deep-sea *Thermococcus* species from three sites in the Northeastern Pacific Ocean. *FEMS Microbiol. Ecol*. Vol. 36, 2001, pp. 51-60.
 - 7) Itoh, T., Taxonomy of nonmethanogenic hyperthermophilic and related thermophilic archaea. *J. Biosci. Bioeng*. Vol. 96, 2003, pp. 203-212.
 - 8) Jong-sun Yun, Hwa-wan Ryu., Lactic acid production and carbon catabolite repression from single and mixed sugars using *Enterococcus faecalis* RKY1. Vol. 37, 2001, pp. 235-240.
 - 9) Lee, H.S., Kang, S.G., Lim, J.K., Yona Cho, Kim, Y.J., Jeon, J.H., Cha, S.S, Kwon, K.K, Kim, H.T, Park, C.J., Lee, H.W., Kim, S.I., Chun, J.S., Colwell, R.R., Kim, S.J., Lee, J.H., The Complete Genome Sequence of *Thermococcus onnurineus* NA1 Reveals a Mixed Heterotrophic and Carboxydrotrophic Metabolism. *Journal of Bacteriology*, Nov. 2008, pp. 7491-7499
 - 10) Nath, K., Das, D., Improvement of fermentative hydrogen production : various approaches. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. Vol. 65, No. 5, 2004, pp. 520-259.
 - 11) Newsome D.S. Water gas shift reaction. *Catalysis Rev. Sci. Eng*. Vol. 21, 1980, pp. 275-281.
 - 12) Sokolova, T.G., C.Jeanthon, N.A Kostrikina, N.A.Chernyh, A.V. Lebedinsky, E. Stackebrandt, and E.A. Bonch-Osmolovskaya., The first evidence of anaerobic CO oxidation coupled with H₂ production by a hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Exthermophiles*. Vol. 8, 2004, pp. 317-323.
 - 13) Xian Yang Shi, Han Qing Yu, Continuous production of hydrogen from mixed volatile fatty acids with *Rhodoseudomonas capsulata*. *Int. J. Hydrogen Energy*. Vol. 31, 2006, pp. 1641-1647.
 - 14) Yun Jae Kim, Hyun Sook Lee, Eun Sook Kim, Seung Seob Bae, Jae Kyu Lim, Rie Matsumi, Alexander V. Lebedinsky, Tatyana G. Sokolova, Darya A. Kozhevnikova, Sun-Shin Cha, Sang-Jin Kim, Kae Kyoung Kwon, Tadayuki Imanaka, Haruyuki Atomi, Elizaveta A. Bonch-Osmolovskaya, Jung-Hyun Lee & Sung Gyun Kang, Formate-driven growth coupled with H₂ production. *Nature*. Vol. 467, 2010.
 - 15) 손한나, 김미선, 2010 : “*Rhodobacter sphaeroides* KD131에 의한 유기산 광합성 발효 최적화”, 한국수소 및 신에너지학회 21권, 2호, pp. 136-142.