

Thiobacillus ferrooxidans 의 전기화학적 배양에 의한 셀밀도 증가

장영선, 정승호*, 이광연*, 박돈희*, 정상문**, 차진명
비앤이테크(주), 전남대학교 생물화학공학부*, 광주대학교 산업대학원**
전화 (062) 672-7895, FAX (062) 672-7897

Abstract

In this study, we demonstrated that high cell density for *Thiobacillus ferrooxidans* could be obtained when optimal conditions for cell growth were maintained using electrochemical cultivation with sufficient aeration. The optimal pH for cultivation were determined to be 2.0 ± 0.05 . When the current and potential were set to 0.15A, 4V, the Pt electrode reduced Fe^{3+} to Fe^{2+} with efficiency of 85%. Under these condition, cells at an initial density of 0.0025 g-dry cell/L grew for 8days until the cell density was 0.0576 g-dry cell/L. this was a 7-fold increase over conventional batch culture.

1. 서론

호기성 철산화미생물인 *Thiobacillus ferrooxidans*는 저품위 광석에서 Copper, gold, uranium등을 침출하는 공정에 사용되어왔다.^{1),2),3)} 몇몇의 연구자들에 의해 보고된 전기화학적 배양법은 전류나 전위 조절에 의해 Fe^{2+} 를 재생성하는 방법으로 높은 셀밀도를 유지하는데 적당한 방법이다. 음극에서의 환원반응에 착안하여 개발된 *Thiobacillus ferrooxidans*의 전기화학적 배양법은 Norio Matsumoto, Naoya Ohmura에 의해 최근까지 연구되고 있다. 이들은 양극실과 음극실을 Anion exchange membrane(Type A-201, Asahi Chemical, japan)으로 분리하고, 양극과 음극을 Pt망을 사용하였다. 전위는 potentiostat에 의해 음극의 전위를 조절하는 방법을 사용하였다. 전위 조절방법은 부반응이 방지되고, 높은 전기적 효율을 가진다고 보고된다.⁴⁾

*Thiobacillus ferrooxidans*의 성장 특성은 금속이온의 종류에 따라 다르기는 하지만 높은 금속이온이 존재시 그 활성이 줄어드는 것으로 보고되었다. 또한 K. Nyavor등에 의하면 Fe^{3+} 의 농도가 적을수록 미생물의 성장은 저해 받지 않고, 셀밀도를 높일수 있을 것으로 보고하고 있다.⁵⁾ 따라서, 음극실의 전기환원반응을 이용하여 Fe^{2+} 를 연속적으로 철산화세균에 공급함으로써 더 이상의 시약의 소모 없이 셀밀도를 증가시킬 수 있을 것이다.

2. 재료 및 방법

연구에 사용된 균주는 *Thiobacillus ferrooxidans* (ATCC 19859)이며, 30°C에서 m9K배지에 3~4일 배양하여 종균으로 사용하였다. Silverman의 9K배지 중 K_2HPO_4 를 KH_2PO_4 로 대체하여 철산화침전물을 억제한 m9K(KH_2PO_4 0.5g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g, $(NH_4)_2SO_4$ 3g, KCl 0.1g, $Ca(NO_3)_2$ 0.01g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 45g) 2L를 직경 12cm, 길이 40cm의 Pyrex 2중관에 넣고 30°C로 유지한후 1vvm의 Air를 주입하여 호기성조건을 유지한다. 이때 m9K의 pH는 4N의 H_2SO_4 를 사용하여 2 ± 0.05 로 유지한다. 전체배지량의 5%에 해당하는 접종균을 접종한 후 셀밀도를 관찰한다. 셀밀도를 관찰하기 위해 1회/1day 간격으로 10mL의 산화배지를 분취하여 Watman No.1으로 2번 filtering 하여 철침전물을 여과한 후 milipore filter paper로 다시 filtering 하였다. filter paper를 105°C에서 완전 건조시켜 시험전후의 무게차를 계산하여 셀밀도의 변화를 관찰하고 Muir에 의해 제안된 흡광도법에 의해 철농도의 변화를 관찰하였다.

마찬가지로, pH 2 ± 0.05 로 조절된 m9K 3L를 Pyrex 2중관에 넣고, 30°C를 유지한 후 Air를 주입하여 산화조건을 고전적인 배양법과 같게 한 다음 정량펌프에 의해 전해조와 일정유량으로 순환시켰다. 전해조의 양극과 음극은 백금 도금된 전극(8×11cm)을 사용하고, 음극실과 양극실은 Anion exchange membrane (AMX, Tokuyama, Japan)을 사용하였다. 전류의 공급은 power supply(삼양사, 10A, 50V)를 사용하여 각 전극에 전류를 공급하였다. 음극실에는 m9K배지가 순환되고, 양극실에는 m9K에서 Fe를 제외한 Fe-free mineral salt가 순환된다. 고전적 배양법과 같은 방법으로 셀밀도와 철농도의 변화를 관찰하였다. Fig. 1은 전기화학적 배양법의 모식도이다.

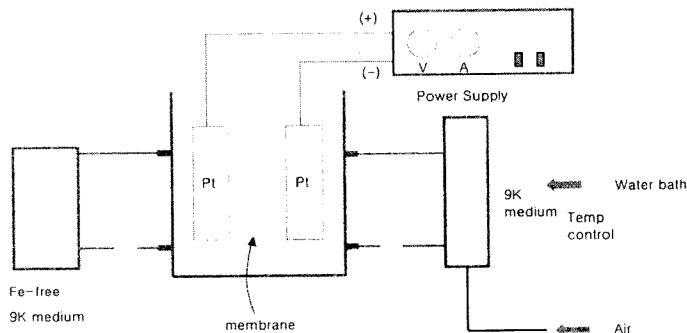


Fig. 1. 전기화학적 배양법의 모식도

3. 결과 및 고찰

전해조의 성능을 관찰하기 위해 $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 용액을 사용하였다. 용액 중 철의 농도가 9g/L가 되도록 하여 300mL를 분취한 후 전해조의 음극실에 채운다. 철산화미생물은 접종되지 않는다. 양극실과 음극실은 Anion exchange membrane (AMX, Tokuyama, Japan)으로 분리되어 있다. 음극과 양극은 8×11cm의 백금이 도금된 판으로 전기분해 전후에 전극으로 인한 침전물은 관찰할 수 없었다.

Fig. 2는 $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 의 전기분해과정을 나타낸 것이다. 가해진 전류는 0.15A, 4V이다. 전류는 Fe^{3+} 의 농도가 작아질수록 0.12A까지 변화하였다. 이는 오음의 법칙때문인 것으로 생각되며 전기분해 과정 중 총철의 농도는 거의 일정하게 유지되었다. 전기분해가 시작된지 558분(9.3시간)이 지나면 Fe^{3+} 가 거의 Fe^{2+} 로 환원되었다. 이 시간 동안 환원된 철의 양은 148mM이며 Coulometric analysis 결과 이론적인 전하량은 4285Coulombs 이다. 반면 Fig. 2로부터 558분동안 흐른 전하량은 5022Coulombs이다. 그러므로 이 시스템의 환원효율은 85%이다.

Norio Matsumoto 등에 의하면 Potentiostat에 의해 음극전극의 전위를 일정하게 유지한 후 전기분해를 하면 Fe^{3+} 의 농도가 50mM보다 작아지면 전류는 Fe^{3+} 의 농도에 비례하여 줄어드는 것으로 보고하고, 음극의 전위를 일정하게 유지하여 전기분해 한 결과 95%의 환원효율을 얻을 수 있었다고 보고하였다.⁶⁾

환원되는 철의 속도를 높이기 위해 전류와 전압을 올려 0.4A, 10V와 4A, 34V일때의 실험을 진행하였다. 초기에 철의 환원속도는 빨랐지만, 음극실에 철침전물이 다량으로 생기고 기포의 발생량이 많아 전류효율이 떨어졌다.(데이터생략)

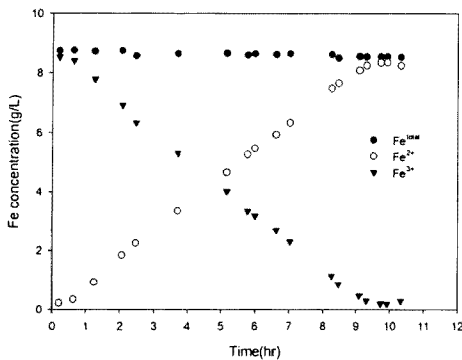


Fig. 2. $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 의 전기분해과정 중 철농도의 변화

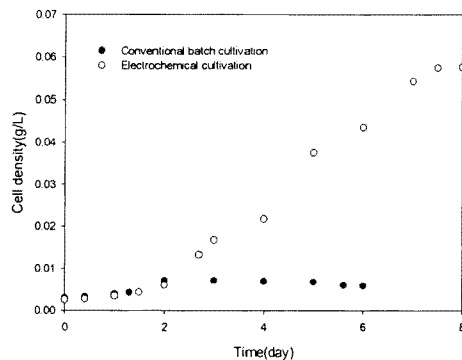


Fig. 3. 고전적인 배양법과 전기화학적 배양법에 의한 셀밀도의 변화

Fig. 3은 고전적인 batch 배양법과 전기화학적 배양법간 셀밀도의 변화를 나타내고 있다. 전기화학적 배양은 pH 2±0.05의 m9K배지에 *Thiobacillus ferrooxidans*를 접종한 후 2일 후 산화가 거의 완료될 때 전기분해를 도입시켜 셀밀도의 변화를 관찰하였다. 건조셀밀도를 측정된 결과 고전적인 배양법은 산화 개시 2일에 가장 높은 셀밀도를 보인 후 성장이 멈추고 서서히 값이 떨어졌다. 반면, 전기화학적 배양법은 전기분해를 도입한 시점부터 꾸준히 셀밀도가 증가하여 전기분해 개시 6일후에는 고전적인 배양법보다 약 7배가 높은 셀밀도를 유지하였다. Norio Maisumoto등에 의한 연구에 의하면 초기 셀밀도를 10⁷cells/mL로 유지한 후 호기성 조건을 유지하여 전기화학적 배양을 하면 6일후에는 1.2×10¹⁰cells/mL까지 도달할 수 있다고 보고하였다.⁶⁾ Naoya Ohmura는 혐기성 조건하에서 142시간 후면 전기화학적 배양을 하지 않고 얻는 셀밀도의 12배에 이르는 값에 도달할 수 있다고 보고하였다.⁴⁾

Fig. 4는 전기화학적 배양법 중 철농도의 변화를 관찰한 것이다. 전류는 초기에 0.15A, 4V으로부터 반응이 진행함에 따라 0.12A, 4V로 변화하였다. Fe³⁺는 전기분해를 하기 전인 2일까지 증가하다가 전기분해가 시작되면서 다시 감소하여 5일 후에는 거의 일정한 값을 유지하였다. 이는 *Thiobacillus ferrooxidans*의 셀밀도가 증가하기 때문인 것으로 생각된다. 전기분해에 의해 Fe²⁺의 농도가 일정하게 유지됨으로써 *Thiobacillus ferrooxidans*의 성장이 Fe²⁺의 부족으로 멈추지 않을 것이라는 것을 추정할 수 있다.

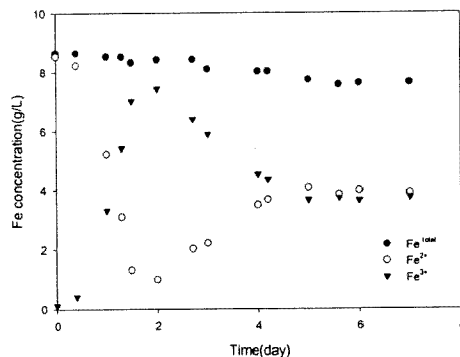


Fig. 4. 전기화학적 배양법에 의한 철농도의 변화

4. 요약

이 연구는 전기화학적 배양법과 호기성 조건을 유지함으로써 *Thiobacillus ferrooxidans*의 밀도가 높게 유지될 수 있다는 것을 보여준다. 최적 pH는 2.0 ± 0.05 로 결정하고 1vvm의 Air를 공급하였다. 전류와 전압은 0.15A, 4V로 유지하였고 Pt 전극에서 85%의 효율로 Fe^{3+} 를 Fe^{2+} 로 환원시켰다. 이러한 조건에의 배양에서 초기 건조셀 밀도 0.0025 g-dry cell/L에서 8일 후에는 0.0576 g-dry cell/L에 이르렀다. 이는 같은 조건에서 고전적인 배양법에 의한 것보다 7배가 높은 값이다.

5. 감사의 글

본 연구는 “2002년도 중소기업기술혁신개발사업”의 연구비 지원에 의해 수행되었습니다. 이에 연구비를 지원해 준 중소기업청에 감사의 뜻을 표합니다

6. 참고문헌

- 1) D.G. Lundgren, M Silver, Ann. Rev. Microbiol. 34 (1980) 268~283
- 2) H.J Brierley, Sci. Am. 247 (1982) 42~51
- 3) O.H. Tuovinen, I.J. Fly Curr. Opin. Biotechnol. 4 (1993) 344~355
- 4) Naoya Ohmura, Norio Matsumoto, Kazuhiro Sasaki, and Hirosh Saiki, " Electrochemical Regeneration of Fe(III) To Support Growth on Anaerobic Iron Respiration", Applied and Environmental Microbiology, Vol. 68, No. 1, p. 405~407 (Jan. 2002)
- 5) K. Nyavor, N. O. Egiebor, P.M. Fedorak, "The effect of ferric ion on the rate of ferrous oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*, Appl Microbiol Biotechnol, p.688~691 (1996)
- 6) Norio Matsumoto, Satoshi Nakasono, Naoya Ohmura, Hiroshi Saiki, " Extension of Logarithmic Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* by Potential Controlled Electrochemical Reduction of Fe(III)", Biotechnology and bioengineering, Vol. 64, No. 6, September 20, p. 716~721(1999)