

# 폐수처리를 위한 무매개체 미생물연료전지의 개발

DEVELOPMENT OF MEDIATOR-LESS MICROBIAL  
FUEL CELL as a WASTEWATER TREATMENT PROCESS

연구기관  
한국과학기술연구원

과 학 기 술 부

## 제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “폐수처리를 위한 무매개체 미생물 연료전지의 개발”과제 의 보고서로 제출  
합니다.

2003 . 9 .

주관연구기관명 : 한국과학기술연구원

주관연구책임자 : 김 병 홍

연 구 원 : 조 병 원, 장 인 섭

” : 강 귀 현, 문 현 수

” : 정 성 제, 장 재 경

” : 이 지 영, 김 경 식

” : Pham Ahn Cuong

” : Pham The Hai

” : Phung Thu Nguyet

여 백

## 보고서 초록

과제관리번호	M1-0104-00-0024	해당단계 연구기간	2001.7.11-2003.7.10	단계 구분	2 / 2
연구사업명	중 사업명	특정연구개발사업			
	세부사업명	국가지정연구실사업			
연구과제명	중 과 제 명				
	세부(단위)과제명	폐수처리를 위한 무대개체 미생물연료전지의 개발			
연구책임자	김 병 홍	해당단계 참여연구원수	총 : 12 명 내부 : 3 명 외부 : 9 명	해당단계 연구비	정부: 681,882 천원 기업: 천원 계: 681,882 천원
연구기관명 및 소속부서명	한국과학기술연구원 수질환경 및 복원연구센터		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
위 탁 연 구	연구기관명 :		연구책임자 :		
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)				보고서 면수	116
<p><b>1. 미생물연료전지의 대사속도 측정과 각 구성 단계 파악</b></p> <p><b>2. 폐수처리용 장치에 적합한 미생물 연료전지의 구성 및 운전</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 이온교환막을 제거하고 미생물 연료전지의 운전</li> <li>- 폐수처리용 미생물 연료전지 (ML-MFC-1) 운전 성공</li> <li>- 폐수처리용 미생물 연료전지의 개선 (ML-MFC-2)</li> </ul> <p><b>3. 폐수의 COD 농도에 대한 산소요구량 및 전달속도 측정</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 폐수의 유기물 분해속도에 응답하는 양극부의 산소요구량 측정 및 임계산소농도 측정</li> <li>- 임계산소농도가 낮은 전극 개발 (2.0 ppm 이하)</li> </ul> <p><b>4. PCR을 포함한 molecular biology technique을 이용한 미생물 연료전지의 microbial diversity</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 전분가공 폐수, 아세트산, 인공폐수 등을 사용한 미생물 연료전지의 clone library 구축</li> </ul> <p><b>5. 전기화학활성 미생물의 분리법 개발 및 분리 동정</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 전기화학활성 미생물 분리용 plate 선정 (ferric citrate)</li> <li>- Acetate 연료 미생물 연료전지 기준, 38 분리균, 전기화학활성 미생물 5종 동정</li> </ul> <p><b>6. 분리균의 전기화학 특성 조사</b></p>					
색 인 어 (각 5개 이상)	한 글	미생물 연료전지, 폐수처리, 전기화학활성, 금속염환원세균, 미생물학적 다양성			
	영 어	Microbial fuel cell, wastewater treatment, electrochemical activity, metal-reducing bacteria, Microbial diversity			

여 백

# 요 약 문

## I. 제 목

폐수처리를 위한 무매개체 미생물 연료전지의 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

폐수 중의 오염 물질을 연료로 이용할 수 있는 미생물연료전지를 개발하기 위해 1960년대 이래 많은 연구가 진행되었다. 전형적인 미생물연료전지는 음극부에서 미생물의 작용에 의하여 기질이 산화되면서 발생하는 전자에 의하여 산화환원전위가 낮아질 수 있으나 일반미생물의 세포표면이 전기적으로 절연이기 때문에 전자전달이 세포 안에서 이루어지는 일반미생물은 전자를 전극으로 전달할 수 없다. 그러므로 전자전달 매개체가 일반미생물을 이용하는 미생물연료전지에서는 전자를 전극으로 전달하기 위하여 반드시 필요하다. 이러한 매개체들은 독성을 띠고 있고 매우 비싸다. 그러므로 미생물연료전지가 바이오센서나 전기생산 등의 다양한 목적으로 응용될 수 있지만 장시간 운전에 적합하지 않았기 때문에 산업화된 예는 없었다. 본 연구실에서 처음 그 가능성이 입증된 무매개체 미생물연료전지는 이런 단점을 극복한 것으로 현재 폐수처리용 장치로 사용하기 위하여 본 연구를 진행하고 있다. 이러한 미생물연료전지를 폐수 처리 공정으로 개발할 경우 1) 기존의 폐수 처리 공정에서 필요한 동력을 줄일 수 있을 뿐 아니라 2) 생산하는 전기를 공정에 필요한 단계에서 사용할 수 있으며, 3) 오염 물질이 갖는 에너지의 많은 부분을 전기로 전환시켜 폐수 처리에서 발생하는 오니의 양을 1/3 이하로 줄일 수 있다.

## III. 연구개발의 내용 및 범위

본 연구에서는 미생물연료전지 형태의 폐수처리 장치를 만들고자 한다. 이를 위해서는 먼저 미생물연료전지의 performance를 최적화하기 위하여 limiting step을 확인하였다. 양이온교환막의 가격이 매우 비싸고 운전 도중에 proton permeability가 제한 될 수 있기 때문에 미생물연료전지의 경제성을 가늠할 수 있는 척도로써 중요한 인자이다. 새로운 형태의 미생물연료전지는 이 양이온교

환막을 제외하고 구성하였다. 양극부 반응에서 일어날 수 있는 제한 현상을 제거하기 위해서 양극부는 산소에 대한 친화도가 높은 전극을 사용하였으며 양이온 교환막을 통하여 투과되는 산소에 대한 영향도 관찰하였다.

한편 미생물연료전지에서 일어나는 전기화학적 특성을 파악하기 위하여 미생물연료전지에 분포하고 있는 미생물들을 배양을 하였으며 한편으로 배양과는 무관하게 분자생물학적인 방법을 이용하여 미생물의 분포를 파악하였다.

#### IV. 연구개발결과

##### (1) 미생물연료전지의 대사속도 측정과 각 구성단계 파악

미생물연료전지를 폐수처리 장치로의 가능성을 탐색하기 위하여 성능을 파악하였다. NCBE type cell의 미생물연료전지는 전분가공공정에서 발생하는 폐수를 연료로 하여 약 68 ppm/h의 처리속도와 17% 수준의 coulomb yield를 보였다. 미생물연료전지의 각 구성단계는 다음과 같이 확인하였다. 1) 음극부에서 미생물에 의한 기질의 분해속도, 2) 음극부에서 전자의 전극으로 전달 속도, 3) 음극부와 양극부의 외부 저항, 4) 양이온 교환막을 통한 수소이온의 전달 속도, 5) 양극부에서 산소에 의한 전자와 수소이온의 소비 속도, 6) 양극부로부터 전달되는 산소에 의한 유기물 산화 그리고 7) 음극부에 공급되는 연료의 channeling 현상 등이다.

##### (2) 폐수처리용 미생물연료전지의 구성 및 운전

- 양이온교환막을 제거한 미생물연료전지를 폐수처리용 미생물연료전지 (ML-MFC-1)로 구성하고 이를 운전하였다.

- 폐수처리용 미생물연료전지는 음극부의 channeling현상을 최소화하고 내부 저항을 줄이면서 2차 폐수처리용 미생물연료전지 (ML-MFC-2)를 제작하였다.

##### (3) 양극부 전극의 임계산소농도 측정과 개선

- 양극부에 사용하는 전극 (graphite felt)의 임계산소농도는 약 6.6 ppm이었고 graphite felt에 백금을 처리한 경우 2 ppm의 임계산소농도를 나타내었다.

- 양극부 전극에 mediator로 conducting polymer, 산화환원효소 혹은 ferricyanide를 처리하는 것은 일시적으로 효과를 보였지만 장시간 운전하기에는 적합하지 않았다. 백금처리는 효과적이었으나 경제성을 고려할 필요가 있다.

#### (4) 미생물연료전지의 microbial diversity와 전기화학활성 미생물 분리

- 전분가공폐수, 아세트산과 인공폐수 등을 사용한 미생물연료전지의 microbial diversity를 분석하기 위한 clone library를 구축하였다.

- 전기화학활성 미생물 분리용 plate를 제작하고 38종의 미생물을 분리하였으며 분리균 중에서 5종이 전기화학활성을 나타내었다.

#### V. 연구개발결과의 활용계획

연구 결과는 연구의 최종목표를 달성하기 위하여 제 2단계 연구의 중요한 참고자료로 활용될 계획이다.



여 백

# S U M M A R Y

## I. Title

Development of mediator-less microbial fuel cell as a wastewater treatment process

## II. The aim of this study

Since 1960, microbial fuel cell has been developed for the organic material conversion to electricity. In a typical microbial fuel cell, an anodic electrode potential is developed when the electrons from the oxidation of fuel by microorganisms are available to electrode. However, electrons can not be transferred from normal microbial electron transport systems to the electrode due to the non-conductive nature of the cell surface structures. Electrochemical mediators were employed to render electron transfer from the microbial cells to the electrode. These mediators are usually toxic and expensive. Therefore, the long-term operation of mediated MFCs cannot be achieved with limited commercial applications although MFCs can be used for various purposes including biosensors and electricity generation system. In this laboratory, we showed that electrochemically active bacterium could be used for the biocatalyst in the mediator-less microbial fuel cell. Studies have been made to develop this mediator-less microbial fuel cell as a wastewater treatment process throughout the study. After construction of microbial fuel cell as wastewater treatment process, 1) we can save an energy in the wastewater treatment process, 2) we can use an electricity from microbial fuel cell runs, 3) we can also reduce 70% sludge production because energy contained in the organic contaminants is converted to electricity.

## III. Research objectives

Studies have been made to develop a microbial fuel cell as a wastewater

treatment process. The limiting steps have been identified to optimize the performance of the microbial fuel cell. The use of cation exchange membrane is one of the important factor determining the economic feasibility of the microbial fuel cell because it is expensive and limits proton permeability. A novel microbial fuel cell was constructed without using membrane. In order to eliminate limitations exerted by poor cathode reaction, cathode was modified to increase the affinity for oxygen and the oxygen permeability through the cation specific membrane was determined.

In addition to the electrochemical aspects of the microbial fuel cell, studies were made to identify the microbial population responsible cultivation and cultivation-independent methods.

#### IV. Results

##### (1) Determination of microbial activity and rate-limiting steps in MFC

To test microbial fuel cell as a wastewater treatment process, NCBE type cells were operated using wastewater from starch processing factory. These microbial fuel cells showed about 68 ppm/h COD consumption rate, and 17% coulomb yield. The rate-limiting steps in an MFC are 1) substrate consumption rate in anode, 2) electron transfer rate from the microbial cells to the electrode, 3) external load (resistance), 4) proton transfer rate through the membrane, 5) oxygen consumption rate in cathode, 6) oxygen diffusion to the anode compartment and 7) channeling phenomenon in the anode compartment.

##### (2) Construction and operation of wastewater treatment microbial fuel cell

- Membrane-less microbial fuel cell (ML-MFC-1) was constructed as a prototype of wastewater treatment process.

- Second prototype ML-MFC (ML-MFC-2) was developed to minimize channeling effect and internal resistance in the anode of ML-MFC-1.

(3) Determination of critical oxygen concentration and enhancement of cathodic reaction

- The critical oxygen concentration ( $[O_2]_{crit}$ ) of graphite felt and Pt-treated graphite felt were 6.6 and 2 ppm, respectively.

- The mediators such as conducting polymer, redox active proteins and ferricyanide were effective for the cathodic reaction enhancement, however, it was not suitable for long term operation. Although platinum treatment to graphite was most effective one, it is expensive material for wastewater treatment process.

(4) Microbial diversity and electrochemically active microorganism isolation in microbial fuel cell

- The clone libraries of microbial fuel cells that had been operated using starch processing wastewater, acetate and artificial wastewater were constructed to figure out the microbial diversity.

- Thirty eight strains were isolated and five of them showed electrochemical activity.

## V. Applications

The results of this project provide a guideline for MFC operation to treat wastewater, that is the final goal of this project in second phase research.

여 백

# C O N T E N T S

Chapter 1 Outline of research project .....	21
Section 1 Backgrounds & Necessity .....	21
Section 2 Research strategy .....	22
1. Microbial fuel cell for wastewater treatment .....	22
2. Electrochemically active bacteria .....	23
3. Isolation of electrochemically active bacteria and molecular microbial ecology .....	24
4. Confocal laser scanning microscopy and biochemical tests .....	25
Chapter 2 Current status of R&D activities .....	27
Chapter 3 Contents and results .....	31
Section 1 Microbial fuel cell and cathode reaction .....	31
1. Introduction .....	31
2. Materials and Methods .....	34
A. Wastewater .....	34
B. Microbial fuel cell .....	35
C. Chemicals .....	37
D. Electrode recovery and microscopy .....	37
E. Platinum coated graphite electrode .....	38
F. Dissolved oxygen (DO) monitoring .....	38
G. Other analyses .....	38
3. Results .....	38
A. Microbial fuel cell .....	38
B. Measurement of critical oxygen concentration of cathode .....	42
C. Use of cathode mediator .....	45
4. Conclusion .....	50
Section 2 Microbial fuel cell for wastewater treatment .....	51
1. Introduction .....	51
2. Materials and methods .....	52
A. Structure of ML-MFC and operating condition .....	52
B. Wastewater and chemicals .....	54

C. Cyclic voltammetry (CV) .....	54
D. Measurement of current and coulomb calculation .....	55
3. Results and discussion .....	55
A. Operation of membrane-less microbial fuel cell .....	55
B. Effect of aeration .....	57
C. Effect of wastewater feeding rate .....	59
D. Effect of wastewater water concentration .....	60
E. Effect of distance between anode and cathode .....	63
F. Characteristics of microbial fuel cell for wastewater treatment .....	64
G. Cyclic voltamogram .....	66
H. Limiting factor in cathode reaction .....	67
I. Platinum coated graphite as the cathode .....	69
J. Effect of NaCl and acidification .....	70
K. Enhancement of ML-MFC .....	72
(1) Round type ML-MFC .....	73
(2) Square type ML-MFC .....	74
L. Operation using new ML-MFC .....	75
Section 3 Microbial diversity of microbial fuel cell .....	80
1. Introduction .....	80
2. Materials and methods .....	82
A. Fuel and microbial fuel cell .....	82
B. Biodiversity and taxonomy of microbial populations in the MFC .....	82
(1) Genomic DNA extraction from microbial community .....	82
(2) Polymerase chain reaction(PCR) of 16S rDNA .....	82
(3) Cloning of 16S ribosomal DNA gene .....	83
(4) Transformation into competent cell, <i>E. coli</i> DH5a .....	83
(5) Purification of plasmid DNA .....	84
(6) Restriction fragment length polymorphism(RFLP) analysis .....	84
(7) Sequencing of plasmid DNA .....	84
(8) Construction of phylogenetic tree .....	84
C. Denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE) .....	85
3. Results and discussion .....	87
A. Morphology observation .....	87
B. RFLP analysis .....	87
C. DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis) .....	88
D. Microbial diversity of microbial fuel cell .....	90

E. Construction of phylogenetic tree of MFCs .....	93
Section 4 Isolation and identification of electrochemically active bacteria, and test of electrochemical activity .....	99
1. Introduction and results .....	99
A. Isolation and electrochemical activity .....	99
B. Identification of microorganism .....	101
C. Microbial fuel cell operation using electrochemically active bacteria .....	102
D. Effect of electron transfer inhibitor .....	102
2. Discussion .....	104
Chapter 4 Achievements goals and contribution to related field .....	105
Chapter 5 Application of results .....	109
Chapter 6 Technical information gathered from overseas sources during project	111
Chapter 7 Reference .....	113



여 백

# 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	21
제 1 절 연구의 배경 및 필요성 .....	21
제 2 절 연구의 추진전략 및 체계 .....	22
1. 폐수처리용 미생물연료전지 .....	22
2. 전기화학활성미생물 .....	23
3. 전기화학활성미생물의 분리와 molecular microbial ecology .....	24
4. Confocal laser scanning microscopy와 생화학실험 .....	25
제 2 장 국내외 관련분야의 환경변화 .....	27
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과 .....	31
제 1 절 미생물연료전지의 양극반응 .....	31
1. 연구내용 .....	31
2. 실험 재료 및 방법 .....	34
가. 폐수 .....	34
나. 미생물연료전지 .....	35
다. Chemicals .....	37
라. 전극의 회수와 전자현미경 .....	3
마. Platinum coated graphite electrode .....	38
바. Dissolved oxygen (DO) monitoring .....	38
사. 기타 분석 .....	38
3. 결과 .....	38
가. 미생물연료전지 .....	38
나. 미생물연료전지에서 양극부 전극의 임계산소농도 측정 .....	42
다. Cathode mediator의 사용 .....	45
4. 결론 .....	50
제 2 절 폐수처리용 미생물연료전지 .....	51
1. 연구내용 .....	51
2. 실험 재료 및 방법 .....	52
가. ML-MFC 의 구조 및 운전조건 .....	52
나. 폐수 및 시약 .....	54

다. Cyclic voltammetry (CV) .....	54
라. 전류측정 및 coulomb 계산 .....	55
3. 결과 및 고찰 .....	55
가. 막 없는 미생물연료전지 운전 .....	55
나. Aeration의 영향 .....	57
다. 폐수의 공급속도에 대한 영향 .....	59
라. 폐수의 공급농도에 대한 영향 .....	60
마. 음극부와 양극부 사이의 거리에 대한 영향 .....	63
바. 폐수 처리용 미생물연료전지의 특성 .....	64
사. Cyclic voltamogram .....	66
아. Cathode reaction의 제한 인자 .....	67
자. Cathode로 백금 coated graphite의 사용 .....	69
차. NaCl과 acidification의 영향 .....	70
카. 미생물연료전지의 구조개선 .....	72
(1) 원통형 ML-MFC .....	73
(2) 사각형 ML-MFC .....	74
타. 개선한 미생물연료전지의 운전 .....	75
제 3 절 미생물연료전지의 microbial diversity .....	80
1. 연구의 내용 .....	80
2. 실험 재료 및 방법 .....	82
가. 사용 연료 및 미생물 연료전지 .....	82
나. Biodiversity and taxonomy of microbial populations in the MFC .....	82
(1) Genomic DNA extraction from microbial community .....	82
(2) Polymerase chain reaction(PCR) of 16S rDNA .....	82
(3) Cloning of 16S ribosomal DNA gene .....	83
(4) Transformation into competent cell, <i>E. coli</i> DH5a .....	83
(5) Purification of plasmid DNA .....	84
(6) Restriction fragment length polymorphism(RFLP) analysis .....	84
(7) Sequencing of plasmid DNA .....	84
(8) Construction of phylogenetic tree .....	84
다. Denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE) .....	85
3. 실험 결과 및 고찰 .....	87
가. 미생물의 형태학적 관찰 .....	87
나. RFLP analysis .....	87
다. DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis) .....	88
라. 미생물연료전지의 미생물 다양성의 분석 .....	90

다. Construction of phylogenetic tree of MFCs .....	93
제 4 절 전기화학활성미생물의 분리, 동정 및 전기화학활성 측정 .....	99
1. 연구내용 및 결과 .....	99
가. 미생물의 분리 및 전기화학활성 .....	99
나. 미생물의 동정 .....	101
다. 전기화학 활성 분리균을 이용한 생물연료전지의 운전 .....	102
라. Electron transfer inhibitor의 영향 .....	102
2. 고찰 .....	104
제 4 장 목표 달성도 및 관련 분야에의 기여도 .....	105
제 5 장 연구 개발 결과의 활용 계획 .....	109
제 6 장 연구 개발 과정에서 수집한 해외 기술 정보 .....	111
제 7 장 참고 문헌 .....	113

여 백

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구의 배경 및 필요성

혐기성 생태계에서 산화된 형태의 금속이온을 전자수용체로 해서 성장하는 금속염 환원세균이 알려져 있다 (Lovely et al., 1986). 금속염 환원세균에서 철환원세균의 경우 산화제 2철[Fe(III), ferric ion]을 전자수용체로 사용하는데 ferric ion이 중성에서 불용성이기 때문에 성장을 위하여 전자(환원력)를 소비하기 위하여 세포외부로 전자를 전달할 수 있는 mechanism이 있음이 알려져 있다 (Myers and Myers, 1992, 1993). 본 연구팀에서는 본 국가지정 연구실 사업을 수행하기 전의 선행 연구에서 철환원세균의 model strain인 *Shewanella putrfaciens*의 electron transfer activity를 이용하여 무매개체형 미생물연료전지를 세계 최초로 개발한 바 있다 (Kim et al., 1999a). 또한 *S. putrfaciens*가 젖산만을 기질로 이용하는 특이성을 가지고 있기 때문에 *S. putrfaciens*를 biocatalyst로 해서 미생물연료전지 형태의 lactate sensor를 개발하기도 하였다 (Kim et al., 1999b). 한편 *S. putrfaciens*와 같은 철환원세균이 자연계 특히 혐기성 생태계에 널리 분포한다는 것으로부터 기질이용성이 다양한 철환원세균을 이용한다면 쉽게 미생물연료전지를 구성할 수 있다고 생각하였다 (Kim et al., in press). 이로부터 본 연구팀은 미생물연료전지를 이용하면 폐수 내 유기물 농도에 따라 전기적 신호를 나타낼 수 있음을 확인하고 이를 BOD센서로 개발한 바 있다 (Kim et al., 2003; Chang et al., in press). 이러한 미생물연료전지는 폐수에 분포되어 있는 전기화학활성미생물들이 폐수의 유기물을 단독으로 혹은 다른 발효성 미생물과 상호 공생적인 관계를 구성할 것으로 생각되며 이때 지금까지 미생물연료전지에서 반드시 필요하다고 알려진 mediator를 제거하고 무매개체 형 미생물 연료전지를 운전할 수 있음을 세계최초로 확인한 바 있다.

이와 같은 연구결과들을 바탕으로 국가지정연구실사업으로 무매개체형 미생물연료전지를 폐수처리 system 으로 개발하고자 하였다. 폐수의 유기물을 처리하기 위해서는 현재 활성슬러지법을 이용한 호기성 처리나 혐기성 소화법을 이용한 methane 발효가 일반적이는데 미생물연료전지를 폐수처리 공정으로 이용하게 되면 폐수의 처리와 함께 일부의 에너지를 전기의 형태로 전환할 수 있다. 이때 활성슬러지법으로 폐수를 처리한다면 수소의 산화환원전위 ( $2H^+/H_2$ , -0.42 V)를 기준으로 산소를 최종 전자수용체로 사용할 경우 ( $1/2 O_2/H_2O$ , +0.82 V) 약 1.24 V의 에너지가 나오는데 미생물연료전지에서 0 V 수준의 전자전달체가 작용한다면 동일한 수소로부터 약 34% 만이 미생물 성장에 필요한 에너지로 전환되고 나머지 66%는 전기로 전환될 수 있다. 현재 시설용량 1만톤 이상 하수종말처리장에서 발생하는 슬러지는 2003년 7월부터는 육상매립이 금지 (폐기물관리법)되며 1만톤 미만의 하수종말처리장에서 발생하는 슬러지도 전체 발생량의 약 3% (약 16톤)만 이 매립이 허용될 예정이다. 차선책으로 해양 투기 등이 강구되고 있으나 이는 심각한

환경오염을 야기할 수 있다. 현재 소각으로 처리되는 것은 전체 발생량의 약 10% 수준이지만 옥상매립의 금지와 해양 투기의 환경오염 문제 등을 고려한다면 향후 소각으로 슬러지를 처리할 것으로 판단된다. 현재 소각으로 처리하기 위해서는 톤당 약 55,000원이 소요되는 것으로 (2001년 환경부 집계자료) 보고 되었지만 이는 100% 고품 슬러지를 대상으로 산출한 금액이고 함수율 약 80%의 슬러지의 운반 및 탈수 등을 고려하면 약 25만원/ton이 소요된다. 하루 서울시 하수 슬러지의 발생량이 약 1,848 톤이며 이를 금액으로 환산한다면 1일 기준 4억6천만원이 필요하다. 이를 다시 전국발생량으로 환산할 경우 약 14억원이 소요된다 (2002년 환경부 집계자료). 그러므로 미생물연료전지가 효과적인 폐수처리장치로 개발된다면 막대한 경비를 절감할 수 있으며 부대적으로 일부의 전기를 얻을 수도 있게 된다. 하지만 현실적으로 미생물연료전지를 폐수처리장치로 개발하기 위해서는 연료전지에 필수적으로 사용되고 있는 양이온교환막을 대체하거나 혹은 제거하고 운전할 수 있어야 한다. 현재 모든 연료전지는 DuPont사의 Nafion을 사용하고 있는데 이 막의 가격이 1 m<sup>2</sup>당 약 \$1,000이다. 이러한 고가의 막을 폐수처리장치에 응용하게 되면 현재 활성슬러지법과 같은 크기에 적용할 경우 그 경비를 감당할 수 없음을 알 수 있다. 그러므로 성공적인 폐수처리장치로 완성하기 위해서는 염가의 막을 사용하거나 혹은 막을 제외하고 구성하는 새로운 개념의 미생물연료전지가 필요하다. 이와 함께 연구의 최종목표를 달성하기 위해서 다음과 같은 세부 추진전략은 다음과 같다. 세부 전략의 추진 방법은 1단계 연구에서는 물론이고 2단계 연구가 종료되는 시점까지의 전체 전략이다.

## 제 2 절 연구의 추진 전략 및 체계

### 1. 폐수처리용 생물연료전지

연구의 1단계 연구에서는 본 연구실에서 기본 미생물연료전지로 사용 중인 영국 Reading 대학 부설 National Centre for Biotechnology Education (NCBE)에서 구매한 NCBE 형과 BOD 계측기용으로 제작한 Sensor 형의 생물연료전지를 사용하여 구성에 관여하는 인자들을 자세하게 조사하였다. 이러한 인자들로는 음극부에서는 미생물의 유기물 분해속도, 미생물로부터 전극으로의 전자전달속도이며 양극부의 경우 음극부에서 전달되는 전자의 소비속도와 이에 관련된 산소(산화제)의 전달 속도이다. 한편 음극부와 양극부를 절연하고 있는 양이온교환막도 고려 인자 중 하나이다 (Gil et al., 2003). 특히 양이온교환막은 앞에서 밝혔듯이 기존의 연료전지에서는 반드시 필요하지만 폐수처리용 미생물연료전지에서는 가격과 내구성을 고려한다면 제외하거나 또는 다른 대체 물질로의 가능성을 탐색할 필요가 있다. 한편 두 가지 미생물연료전지는 현재 내부 용량이 음극부와 양극부 기준으로 각각 25 ml로 소형이라 폐수처리용 목적에는 적합하지 않을 뿐 아니라 전극물질인 graphite 부스러지는 현상과 시료의 channeling 때문에 처리가 불완전하며, coulomb 효율이 낮은 등의 단점이 나타났다. 이러한 단점을 극복한 다음 폐수 처

리용으로 0.5 - 1.0 L 용량의 막 없는 미생물연료전지 (WT-ML-MFC)를 개발하여 양이온 교환막 없이 폐수처리 및 전력생산이 가능함을 탐색한다. 이와 같이 개발한 폐수처리용 미생물 연료전지는 2단계 연구에서 coulomb 효율을 높이는 방향으로 전지 구조, 전극 재질, 전극 configuration, 운전조건을 개선하여 최종 연구 목표 (생활 하수 COD 1.44 kg/m<sup>3</sup> day)에 부합되는 생물연료전지를 개발할 계획이다. 한편 전류밀도 및 전력밀도는 폐수처리용 미생물연료전지가 폐수처리 목적이외에 얻을 수 있는 부대적인 이점인 전력 생산을 최적화하는 기본 파라미터이다. 특히 미생물연료전지가 보편적으로 보이는 낮은 전류밀도는 발생하는 전기를 사용하기에 적절한 전기적 장치를 찾을 수 없을 수 있다. 그러므로 미생물연료전지에서 폐수처리와 함께 발생하는 전기를 사용할 수 있는 현실화 작업이 필요할 것이다. 이 연구는 2단계 연구가 종료되는 시점에서 제시할 수 있을 것이다. 특히 폐수처리장치를 설치하는 하수 처리장이나 낙도와 같이 전력공급이 용이하지 않은 지역에 설치할 수 있는 최소 보조 전원으로의 사용을 생각할 수 있다.

한편 연구를 시작하는 시점에서 제시하였던 연구계획서에는 폐수처리용 미생물연료 전지의 대상 폐수를 생활하수 혹은 폐수 등으로 국한하였다. 하지만 지금까지 호기적 조건에서 분해가 어려운 난분해성 물질 중 유기니트로 화합물 등과 같은 것들이 혐기적 호흡조건에서 더 빨리 대사되는 예가 보고 되고 있다. 미생물연료전지의 음극부에 존재하는 전기화학활성 미생물과 이의 생물학적 작용이 본 연구의 결과로 혐기성 호흡으로 증명된 바 있다. 따라서 난분해성 물질을 포함하는 산업폐수를 처리하는 공정으로 미생물 연료전지를 운전하고 이에 대한 가능성을 조사하고자 한다. 이 연구는 2단계에서 먼저 phenol을 model compound로 제시하고 처리가능성을 제시한 후 다시 석유화학공업에서 발생하는 실패수를 대상으로 하거나 또는 BTEX와 같은 성분이 혼합되어 있는 폐수를 제조하여 그 처리 효과를 제시하고자 한다.

## 2. 전기화학활성미생물

전기화학활성미생물은 본 연구그룹이 세계최초로 제시한 전극과의 전자를 직접 전달할 수 있으며 무매개체 미생물연료전지에서 사용되는 미생물을 지칭한다. 본 국가 지정연구실사업이 시작하기 전 *S. putrefaciens*을 model strain으로 해서 무매개체 미생물 연료전지를 구성하고 운전하였으며 금속염환원세균이 전기화학활성미생물일 가능성을 제시한 바 있다 (Kim et al., 1999a, 2002). 하지만 아직까지 모든 금속염환원세균이 전기화학활성미생물이라고 단정할 수 없으며 한편으로 별도의 전기화학활성미생물의 존재에 대한 가능성을 제시하고 혹시 이러한 특징이 지금까지 알려지지 않은 미생물의 보편적인 특성일 수도 있다. 그러나 선행결과를 바탕으로 금속염환원세균의 분리방법을 이용하여 분리된 균은 cyclic voltametry를 이용하여 바로 균체의 전기화학활성을 측정할 수 있다. 그러므로 본 연구에서는 미생물연료전지를 다양한 폐수로 농화배양한 후 전극에서 미생물을 분리하고 분리균의 세포 표면 전자전달체의 특성을 조사하기 위해



potentiostat를 사용하여 cyclic voltammogram (CV)을 얻으면 전기화학 활성을 정성적으로 표시할 수 있을 뿐 아니라 산화-환원 전위도 측정할 수 있다. 또한 산화-환원 반응의 가역성 여부도 알 수 있다.

### 3. 전기화학활성미생물의 분리와 molecular microbial ecology

현재 자연계에서 분리가 가능한 미생물은 1% 미만이고 서식처에 따라서는 그 보다 낮은 배양가능성을 보인다고 알려져 있다 (Amann et al., 1995). 본 연구에서는 미생물 연료전지에 농화배양한 전극 1g 당  $10^{11}$ 의 세균이 전극 표면에 biofilm 형태와 전극 사이에 clump형태로 분산되어 있을 것으로 분석되었으나 실제 분리되는 수는 이의 1/10,000 이하로 나타났다 (Kim et al., in press). 이러한 수치는 자연계에서 0.1 - 0.5%의 미생물이 실험실에서 배양된다는 것보다 훨씬 낮은 수치이다. 이 이유는 미생물연료전지의 환경을 미생물을 분리하는 petri dish에서 재현하지 못하였기 때문으로 판단된다. 작용하는 미생물의 성질을 알아야 공정의 최적화가 용이하며, 효과적인 제어가 가능하다. 이를 위해 전기화학활성 미생물의 분리 방법을 개발하는 한편 polymerase chain reaction (PCR)법으로 16S rDNA를 증폭하고 이의 서열을 분석하여 database와 비교하는 molecular microbial ecology 기법으로 농화배양한 미생물을 분석하였다. 전기화학활성은 혐기성 미생물 호흡의 일종으로 추측되고 있다. 대부분의 혐기성 호흡 미생물은 아세트산, 부티르산, 젖산 등 발효 세균의 발효 산물을 전자공여체로 이용한다. 미생물연료전지에서 clump 형태의 미생물은 발효 세균으로, biofilm을 형성하고 있는 미생물은 전기화학활성 미생물로 판단하고 이들을 각각 분리하는 방법을 개발하였다. 발효 세균의 경우 포도당과 yeast extract를 사용하는 일반 배지를 이용하여 호기성과 혐기성 조건에서 각각 배양하고, 혐기성 호흡 세균의 분리를 위해서는 전자공여체로 아세트산과 젖산을 전자수용체로 산소, 질산염, 아질산염, Fe(III), 황산염을 사용한다. 이 때 기본배지는 인산염완충액 배지(phosphate buffered basal medium, PBBM) 또는 탄산염완충액 배지(carbonate buffered basal medium, CBBM)를 사용하여 전자공여체와 전자수용체를 조합하여 배지를 만들었다. 또한 상기한 전자수용체를 사용하지 않는 미생물의 배양을 위해 petri dish에 earth한 전극을 깔고 혐기적으로 배양하는 방법도 동원한다.

**Molecular microbial ecology 기법** : 농화배양한 전극 일부를 취하여 통상적인 방법으로 DNA를 추출하고 16S rDNA를 증폭할 수 있는 범용 primer를 사용하여 PCR로 증폭하고 이를 *Escherichia coli*에 cloning하여 배양하고 plasmid를 추출하여 전문 기관에 의뢰하여 염기서열 분석하였다. 이와 함께 본 연구에서 사용할 인공폐수와 생활 하수 외에 이미 사용 중인 식품공장 폐수, 아세트산 등 서로 다른 연료로 농화배양한 전극에서 추출한 DNA를 denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)기법으로 분석하여 인공 폐수 비교하였다. 여기서 인공 폐수와 차이를 보이는 band를 PCR로 다시 증폭하여 염기서열을 분석하였다. DGGE를 위한 PCR에서는 f331과 r509 primer를 사용한다. 이상의 실험

에서 얻은 염기서열을 전극에서 분리 배양한 세균의 16S rDNA 염기서열과 비교하며, database와 비교하여 어떠한 세균이 전극에 농화배양 되었으며, 만약 아직 알려지지 않은 세균으로 밝혀지면 이들과 유사한 세균의 성질을 바탕으로 미생물연료전지의 최적화 연구에 활용할 계획이다. 2단계 연구에서는 1단계에서 확인한 신규의 clone을 분석하여 전기화학활성 미생물의 진화에 관한 가설을 제안하여 이를 바탕으로 생활하수를 처리하는 막을 사용하지 않는 미생물연료전지의 미생물도 분석할 계획이다.

#### 4. Confocal scanning laser microscopy와 생화학 실험

지금까지의 연구에서 다양한 미생물이 전기화학활성을 가지며, 이들을 연료전지 형 전기화학 장치에서 농화배양할 수 있는 것을 밝혔으나 이들이 왜 전기화학 활성을 나타내는지에 관한 연구는 이루어지지 않았다. Fe(III) 환원 세균인 *S. putrefaciens*와 *Geobacter sulfurreducens*는 outer membrane과 periplasm에 다수의 cytochrome을 보유하고 있는 것으로 발표되었으며, 이들의 산화-환원 전위가 대부분 -150 mV이하로 낮은 것으로 보고 되었다. 이들 세균에서 ferric reductase도 outer membrane에 있으며 이 효소는 0 volt 부근의 산화-환원 전위를 갖는 cytochrome을 보유하는 복합단백질이다. *S. putrefaciens* 균체 현탁액의 산화-환원 전위가 0 volt정도인 것은 이들 세균의 전기화학 활성은 ferric reductase의 특성인 것을 알 수 있다. 매개체를 사용하지 않는 미생물연료전지에서 미생물 세포와 전극간의 전자 이동이 핵심적인 반응이다. 이를 확인하기 위하여 *S. putrefaciens*의 ferric reductase의 cytochrome 유전자 서열로부터 적당한 primer를 design하여 PCR로 증폭하여 염기서열을 결정한 다음 *S. putrefaciens*의 그것과 비교한다. 여기서 얻어진 유전자 서열 중에서 공통되거나 특징적인 서열을 찾아 형광으로 표지한 probe를 제작하여 농화배양한 전극을 염색한 다음 confocal scanning laser microscope로 관찰하여 전극에 농화배양된 미생물 군에서 ferric reductase를 갖는 미생물의 분포를 관찰할 계획이다.

# 여 백

## 제 2 장 국내외 관련분야의 환경변화

본 연구실에서 세계최초로 증명한 “무매개체형 미생물연료전지”는 국가지정 연구실 사업으로 현재 1단계 사업이 종료되는 시점에서 많은 변화를 가져 왔다. 국내적으로는 “9th International symposium on Genetics of Industrial Microorganisms (GIM)”의 Satellite Meeting을 “Microbial Fuel Cell & Bioelectrochemistry”라는 주제로 2002년 7월에 개최한 바 있으며 2003년 6월에는 “한국미생물 생명공학회”에서 동일한 주제로 symposium을 개최한 바 있다. 이와 같이 국내에서는 미생물연료전지가 미생물 생리학과 환경 미생물분야에서 한 분야로 자리를 잡고 있는 실정이다. 국외적으로는 미국의 Massachusetts 대학 (Dr D. R. Lovley)과 Michigan 주립대학 (Dr. J. G. Zeikus)에서 미국 에너지성 (Department of Energy)으로부터 연구비를 받아 미생물연료전지 연구를 수행하고 있다. 이 중 특히 Massachusetts 대학은 미국 해군성 연구소 (the Naval Research Laboratory, Dr L. Tender)와 공동 연구를 통하여 미생물연료전지의 prototype 을 2개 제작하고 이를 marine sediment에서 시험 운행하고 있다. 이 연구 결과의 일부는 2002년에 각각 *Science*와 *Nature Biotechnology*에 투고 게재된 바 있다. 특히 이 연구그룹들은 생물연료전지에서 분포하고 있는 미생물의 중요성을 인식하고 미국의 genome project를 수행하고 있는 The Institute For Genome Research (TIGR)를 통하여 *Geobacter sulfureducens*의 whole genome sequencing 작업을 진행하였으며 2003년에 완성하였다. 또한 본 연구그룹에서 미생물과 전극간의 전자전달 현상을 파악하기 위하여 사용한 type strain인 *Shewanella putrefaciens*도 동일한 목적으로 미국 Oak Ridge National Lab. Michigan 주립대학, USC등의 공동 연구로 TIGR와 함께 2002년에 whole genome sequence를 완성하였다. 현재 미국에서 genome projects를 통하여 whole genome sequencing이 완료된 prokaryote (*Archaeobacteria* 포함)이 26 strain 그리고 현재 진행 중인 strain이 48개 (2003년 5월 기준)인 것을 감안하면 미생물 연료전지를 통하여 연구 되었던 strain이 여기에 포함된다는 사실만으로도 그 중요성을 짐작할 수 있다. 현재 국가지정연구실 사업의 제 1단계 (2년) 사업을 통하여 얻은 결과 들은 미생물 연료전지를 폐수 처리 공정으로 이용할 수 있는 연구를 진행하였고 그 가능성을 제시한 바 있다. 이 연구는 세부적으로 미생물 연료전지를 구성하고 있는 반응 단계를 5단계로 구분하고 각각을 분석한 연구 결과와 함께 이를 토대로 양이온교환막을 사용하지 않더라도 미생물 연료전지를 구성하여 폐수처리에 적용할 수 있다는 것이다. 한편 본 연구실에서는 연료인 폐수의 종류를 발효성 기질, 비 발효성 기질, 실 폐수와 surface water등을 사용하여 각각의 연료전지를 운전하고 미생물 연료전지의 전극에 분포되어 있는 미생물의 다양성을 조사하였다. 이 연구 결과는 자연계에 미생물 연료전지를 구성할 수 있는 “전기화학 활성 미생물”이 많이 분포되어 있음을 보였다. 그러므로 향후 연구는 이러한 전기화학 활성 미생물이 자연계에서 어떤 역할을 하고 있는 지를 규명하는 것이며 이를 위하여 제 2단계 연구에서는 우선 전기화학활성 미생물의 생물학적 다양성과 함께 공통적으로 가지

고 있는 특정 전자전달체의 특성을 파악할 수 있는 기초자료를 제공할 계획이다. 이를 통해서 연구의 최종 목표인 “폐수 처리 공정으로 적합한 실험실 규모의 coulomb 효율이 90%이상인 매개체를 사용하지 않는 미생물연료전지를 개발”하고 이를 위해 연료전지의 구조와 운전 방법을 개선할 계획이다. 또한 1단계 사업 후 평가의견인 슬러지 발생량을 측정하여 미생물 연료전지를 폐수처리 장치로 사용할 경우에 얻을 수 있는 막대한 슬러지 감소효과를 명확하게 제시할 수 있을 것으로 판단된다.

앞에서 제시한 대로 미생물 연료전지를 폐수처리 장치로 최적화하는 단계에서는 슬러지 감량과 슬러지 처리에 소요되는 막대한 경비를 절감할 수 있다. 이와 함께 미생물 연료전지를 폐수처리 공정으로 이용하게 되면 폐수의 처리와 함께 일부의 에너지를 전기의 형태로 전환할 수 있다. 이때 활성슬러지법으로 폐수를 처리한다면 수소의 산화환원전위 ( $2H^+/H_2$ ,  $-0.42$  V)를 기준으로 산소를 최종 전자수용체로 사용할 경우 ( $1/2 O_2/H_2O$ ,  $+0.82$  V) 약 1.24 V의 에너지가 나오는데 생물연료전지에서 0 V 수준의 전자전달체가 작용한다면 동일한 수소로부터 약 34% 만이 미생물 생장에 필요한 에너지로 전환되고 나머지 66%는 전기로 전환될 수 있다. 그러므로 생물연료전지가 효과적인 폐수처리장치로 개발된다면 막대한 경비를 절감할 수 있으며 한편으로 일부의 전기를 얻을 수도 있게 된다. 또한 2단계 연구에서는 미생물 연료전지를 이용하여 산업폐수 특히 석유화학공정에서 발생하는 폐수의 처리가능성을 제시하고자 한다. 현재 BTEX를 포함한 chlorinated compound들은 호기적인 처리보다 혐기적인 조건에서 처리가 된다고 알려져 있다. 특히 본 보고서에서는 미생물 연료전지의 음극부에서 일어나는 미생물 반응은 새로운 형태의 혐기적 호흡 (anaerobic respiration)으로 제시하였다. 그러므로 난분해성 물질의 처리에 시도해볼 가치가 있을 것으로 판단된다. 2단계 연구에서는 전기화학활성 미생물의 전자전달체의 특성을 규명하기 하기 위하여 폐수처리용 미생물 연료전지에서 전기화학활성 미생물을 분리하고 전기화학 특징을 cyclic voltamogram을 이용하여 파악할 계획이다. 이때 분리된 균들의 전기화학활성은 1차년도에서 model 폐수로 운전하였던 미생물 연료전지에서 분리한 활성 세균들과 비교하여 전자전달체의 특징을 규명할 계획이다. 이와 함께 본 연구실에서 수행할 별도의 연구과제로부터 전자전달체의 분리를 계획하고 있으며 여기에서 얻은 정보 특히 전자전달체인 단백질의 N-terminal sequence는 기존에 알려진 전기화학활성 미생물들의 ferric reductase, cytochrome c의 sequence 들과 비교하여 probe를 제작하고 fluorescent in situ hybridization (FISH)과 같은 방법으로 미생물 연료전지에 분포하고 있는 전기화학활성 미생물들 확인할 계획이다. 이와 같은 연구는 동일한 technique을 이용하여 자연계에서 전기화학활성 미생물이 존재할 수 있을 것으로 짐작되는 혐기성 생태계에서 미생물들의 분포를 확인하는 방법으로 사용될 수 있다. 그러므로 미생물 연료전지를 구성하는 미생물들이 자연계에서의 역할을 규명할 수 있을 것으로 판단된다. 더구나 미국에서 genome project의 일환으로 수행되고 있는 전기화학활성 미생물인 “*Geobacterae*”와 다른 전기화학활성 미생물이 1단계 연구에서 분리되었고 전극에 분포된 clone library는 *Geobacter* 이외의 여러 다른 bacteria들이 분포하고 있

음을 보여주고 있다. 이 결과들은 반드시 *Geobacter*가 미생물연료전지의 전기화학활성 미생물에서 main population임을 장담할 수 없다는 것을 의미한다. 그러므로 1차년도에 서 생물연료전지의 음극부에서 전기화학활성이 있다고 분리된 균주들과 앞으로 분리되는 전기화학활성 미생물을 이용하여 이들이 전자전달체의 특성을 규명할 계획이다. 이와 함께 미생물연료전지에서 분리 동정되는 전기화학활성 미생물들이 자연계에 높은 농도로 분포되어 있을 가능성이 크기 때문에 실제로 이러한 미생물들이 성장할 수 있는 환경과 자연계에서의 역할이 무엇인지를 연구할 필요가 있다. 이는 지금까지 알려진 미생물의 대사에서 혐기성 호흡 (sulfidogenesis, metal reduction, methanogenesis, acetogenesis)과 다른 형태의 anaerobic respiration일 가능성이 있다. 만약 이것이 규명된다면 본 연구를 통해서 얻은 결과는 새로운 미생물의 성장 mechanism을 규명하는 연구그룹이 될 수 있을 것이다.

여 백

# 제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

## 제 1 절 미생물 연료전지의 양극반응

### 1. 연구 내용

미생물연료전지는 미생물의 전기화학적 반응에 의하여 미생물이 전자공여체로 이용할 수 있는 기질이 갖는 화학 에너지를 전기 에너지로 변환시켜 주는 역할을 하며 여기서 사용되는 화학 에너지원으로는 유기물들이 사용될 수 있다. 미생물이 유기물을 분해 하면서 전기화학적 반응을 통해 전기적 신호를 발생시키기 때문에 폐수의 유기물 농도를 측정할 수 있는 센서로서 응용이 가능하다. 생물연료 전지에 대한 연구는 많이 되어왔지만 매개체를 사용하지 않고 혼합균주를 농화 배양한 미생물연료전지에 대한 연구는 본 연구실이 유일하다. 그림 1은 미생물연료전지의 구조도와 각 반응 rate에 참여하는 구성을 보여주고 있다.

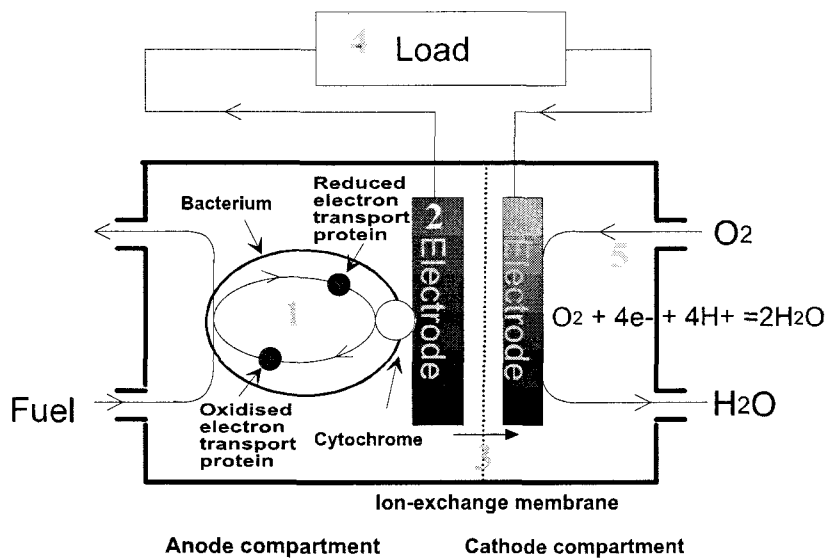
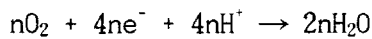


그림 1 미생물연료전지의 전류 발생원리와 전류 발생을 제한 할 수 있는 단계

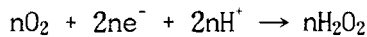
미생물연료전지의 전기 화학적 반응은 여러 가지 요인들에 의해서 영향을 받는다. 본 연구에서는 폐수처리를 위한 장치로써 미생물연료전지를 최적화 하는 데 초점을 맞추었다. 미생물연료전지에 영향을 주는 요인으로는 1) 미생물의 연료 산화반응 속도,



2) 미생물이 전극에 전자를 주는 속도, 3) 전자가 음극부에서 양극부로 이동하는 속도, 4) 수소이온의 공급 속도, 5) 산소의 공급속도와 양전극의 산소환원 촉매 능력 등이 있으며 각각의 경우에 대한 최대 효율을 나타낼 수 있는 조건을 구하고 상호 반응 관계를 연구한 바 있다. 위에서 열거한 요인 중 1)과 2)번의 속도는 음극부에 작용하는 미생물의 산화속도와 전극으로 전자를 전달하는 속도에 의존하는 것이다. 한편 3번의 반응속도는 전자의 이동속도를 결정하는 것이며 외부의 저항을 변화하면서 영향을 관찰 할 수 있다. 4번의 경우 일반적으로 상업화 되어 있는 양이온교환막을 사용하는데 이 막의 가격이 비싸고 폐수와 같은 연료를 사용 할 경우의 내구성을 고려한다면 염가의 대체품을 찾거나 혹은 막을 제거하고 운전할 필요가 있다. 5번 반응은 미생물연료전지의 양극부 반응이며 이 반응의 overall reaction은 다음과 같다.



or



위의 양극부 반응을 최적화하기 위해서는 음극부로 전달되는 전자와 수소이온의 소비에 제한이 되지 않은 산화제 (산소)를 공급해야 한다. 하지만 수용액에서 산소의 용해도가 극히 낮기 때문에 양극부 반응이 제한될 수 있다. 이러한 단점을 극복하기 위해서 여러 가지 방법이 시도되고 있는데 그러한 방법들로는 양극부의 전극에 mediator를 사용하거나 혹은 금속이나 산화환원 효소와 같은 catalyst를 전극에 처리하는 방법이 있다. Mediator는 일반적으로 미생물연료전지에서 음극부에서 미생물의 세포내부에서 기질 분해 (산화)에서 발생한 전자를 uptake하여 자기 자신은 환원되고 세포외부로 release된 후 전극으로 전자를 전달하는 역할을 한다. 양극부에서도 mediator를 사용할 경우에는 세포 내외부에서의 전자전달에는 관여하지 않지만 전극의 산소에 대한 반응속도를 증가시킬 수 있기 때문에 사용이 가능할 수 있다. 이러한 mediator로는 methylene blue, vilogen 류, thionine, ferricyanide와 quinone 류 등이다 (Allen and Bennetto, 1993, Delaney et al., 1984, Lithgow et al., 1986). Methylene blue는 수용액 상태로 제조하거나 또는 전극에 고정화시켜서 사용할 수 있고 가격이 싸기 때문에 지금까지 여러 바이오연료전지에 사용되어 왔으며 (Allen and Bennetto, 1993) 다른 mediator로는 ferricyanide (hexacyanoferrate)가 많이 사용되어 왔다 (Jaffari and Turner, 1997). 제조된 용액들은 미생물 혹은 바이오연료전지에서 탁월한 효과를 보였지만 음극부에서 사용되는 mediator처럼 장시간 운전 시에는 적절하지 않은 단점이 있다. 한편 전극에 금속을 처리한 것도 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 금속이 가지고 있는 catalytic activity로써 산소와 전자, 수소이온이 반응할 경우 활성화 에너지를 낮추는 역할을 한다 (Xue et al., 2000). 하지만 metal을 처리한 전극의 표면적을 감소시키게 되거나 metal oxide가 만들어지면서 catalytic activity를 저해할 수도 있다. 일반적으로 사용되는 금속으로는 백금(platinum)이 있다. 백금과 같은 금속을 사용하는

것처럼 전극의 표면에 산화환원 효소를 사용하기도 한다. 효소는 regeneration이 가능하지만 최적 온도를 유지해야 하고 이 온도가 유지되지 않을 경우 활성이 떨어질 우려가 있다. Laanne 등 (1984)이 처음 바이오연료전지에 효소의 사용을 실험하였는데 그들은 ascorbate oxidase, laccase 등을 사용하였고 이러한 효소들은 dioxygen을 4개의 전자와 반응시켜 물로 환원하는데 작용하는 효소들이다 (Palmore ad Kim., 1999). Laccase의 사용이 특히 많이 연구되어 왔는데 곰팡이 유래의 laccase를 2.2%-azionbis (3-ethyl benzothiazoline-6-sulfonate diammonium salt)와 함께 전극에 처리하여 바이오연료전지에 적용한 일례가 있다 (Palmore and Kim., 1999). 하지만 이 경우 양극부의 pH가 낮은 상태에서 효과적이기 때문에 현재 본 연구에서 사용되고 있는 미생물연료전지에는 적합하지 않을 수 있다. 한편 c-type cytochrome (Cyt c)을 적용한 연구도 있는데 이 경우 Cyt c가 heme을 가지고 있는 단백질이고 산화환원 단백질들의 전자전달을 매개할 수 있기 때문이다. 일례로 copper protein인 cytochrome oxidase와 함께 dioxygen의 환원에 관여한다고 알려져 있다 (Kats et al., 1999). 최근에는 Cyt c가 laccase와 전자 전달을 매개하는 연구도 발표되었다 (Kats et al., 1999). 한편 peroxidase나 catalase도 비슷한 효과를 위하여 연구된 바 있다 (Ruzgas et al., 1996).

그러므로 본 연구에서는 다음과 같은 전략을 바탕으로 미생물연료전지의 양극부를 개량하고 최적화하는 연구를 진행하였다.

1. 미생물연료전지의 cathode를 2년 이상 사용한 graphite 전극을 SEM으로 관찰하고 전극표면에 형성된 침전물의 화학적 조성을 분석하였다.
2. 양극부 전극으로 사용한 graphite와 백금으로 coating한 graphite의 산소에 대한 친화성을 알기 위해 임계산소농도 (critical oxygen demand,  $[O_2]_{crit}$ )를 측정하였다.
3. 양극반응을 향상시키기 위하여 1) 백금을 coating한 graphite, 2) 무기매개체, 3) 효소 등을 사용하여 최고 전류와 coulomb를 비교하였다.

## 2. 실험 재료 및 방법

### 가. 폐수

삼양제넥스 (인천)에서 전분을 제조하는 공정에서 발생하는 폐수 (전분가공폐수, Starch processing wastewater, SPW)를 사용하였다. 전분가공폐수의 chemical oxygen demand (COD)는 약 1,100 ppm이었으며 폐수의 총 질소와 총 인은  $25 \pm 7.7$ ,  $10.7 \pm 1.7$  ppm이었다. SPW는 미생물연료전지에 주입 시 phosphate buffer와 NaCl mixture에 혼합하여 적정 COD가 되는 용액으로 제조하였으며 phosphate buffer의 농도는 50 mM, pH는 7.0이었고 NaCl의 농도는 100 mM이 되도록 하였다. 전분가공폐수와 더불어 BOD check solution으로 사용하는 인공폐수를 제조하여 사용하였다 (American Public Health Association, 1995). 인공폐수는 glucose와 glutamate를 BOD 기준 100 ppm이 되도록 하였다. 표 1은 인공폐수의 조성을 보여주고 있다.

표 1 인공폐수의 조성

Component	Composition
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.56 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.20 g
$\text{CaCl}_2$	15 mg
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	20 mg
$\text{NaHCO}_3$	0.42 g
Trace mineral solution*	10 ml
phosphate buffer(1 M, pH 7.0)	50 ml
Distilled water	940 ml
Trace mineral (Balows et al, 1991)	
Nitrilo triacetic Acid (NTA)	1.5 (g/l)
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.1
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.17
$\text{ZnCl}_2$	0.1
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.1
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.02
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0.01
$\text{Na}_2\text{MoO}_3$	0.01
$\text{Na}_2\text{SeO}_3$	0.017
$\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.026
NaCl	1.0

인공폐수는 glucose와 glutamate를 제외한 성분을 제조하여 멸균을 한 후 질소로

혐기적 상태가 되도록 하였다. Glucose와 glutamate는 stock solution을 제조한 후 멸균 용액에 제균 filter를 사용하여 첨가하였다. 미생물연료전지의 운전 동안에는 배지가 들어있는 용기에 질소를 충전한 gas bag을 부착하여 운전 중에도 혐기적인 상태가 되도록 하였다.

#### 나. 미생물 연료전지

회분식으로 운전한 미생물연료전지는 NCBE (National Center for Biotechnology Education)에서 구입한 것을 사용하였다. 한편 연속식으로 운전한 미생물 연료전지는 본 연구실에서 자체 제작한 sensor type의 cell (Chang et al., in press)을 사용하였다. 두 미생물 연료전지 모두 양극부와 음극부 사이에 양이온교환으로 Nafion 450 (DuPont Co., Wilmington, DE, USA)를 사용하였고 전극으로는 graphite 전극 (GF series, Electrosynthesis, Amherst, NY, USA)을 사용하였다. 양극부 전극을 개선하는 실험에서도 동일한 전극을 기본으로 사용하였다. NCBE cell의 경우 본 연구실에서 국가지정연구실 사업 이전부터 만들어서 운전한 것들을 사용하였다. 운전기간은 5년 이상이였으며 전해액으로 phosphate buffer (50 mM, pH 7.0)와 NaCl (100 mM) 혼합액을 사용하였다. 음극부는 전해액과 전분가공폐수의 혼합액을 제조하여 첨가하였다. 양극부에는 graphite 전극에 potassium ferricyanide, methylene blue와 효소들을 처리하여 사용하였다. 처리 조건과 방법은 실험 결과에 표시하였다. 연속식으로 운전할 경우 사용된 인공폐수는 혐기적으로 제조하고 일정 유속으로 음극부의 하단으로 공급하였다. 유속은 1.37 ml/min으로 하였으나 경우에 따라서는 유속을 변화시키면서 운전하였다. 두 가지 미생물 연료전지 모두 온도가 일정하게 조절되는 box에 두고 운전을 하였으며 온도는 33 °C를 유지하였다. 그림 2와 3은 두 가지 미생물연료전지를 보여 주고 있다.

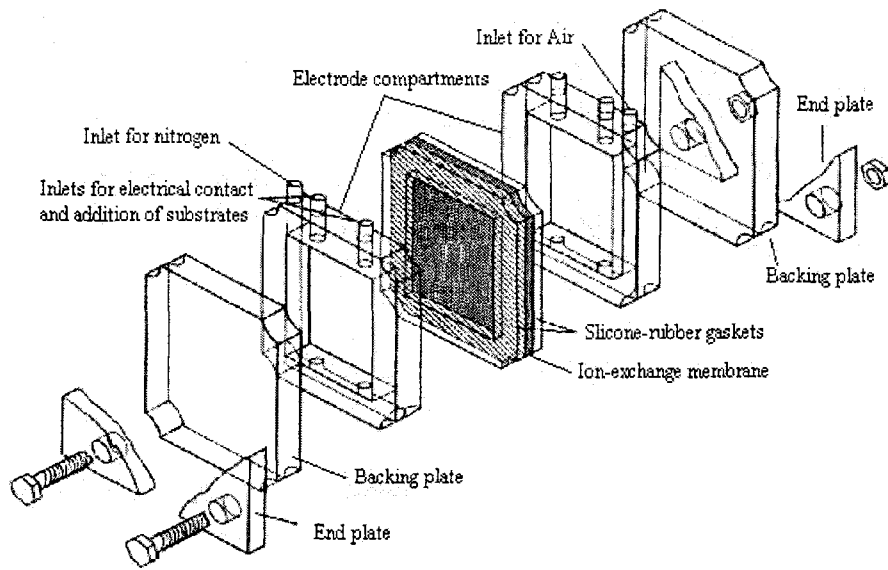


그림 2 Schematic diagram of the structure of an NCBE-type MFC

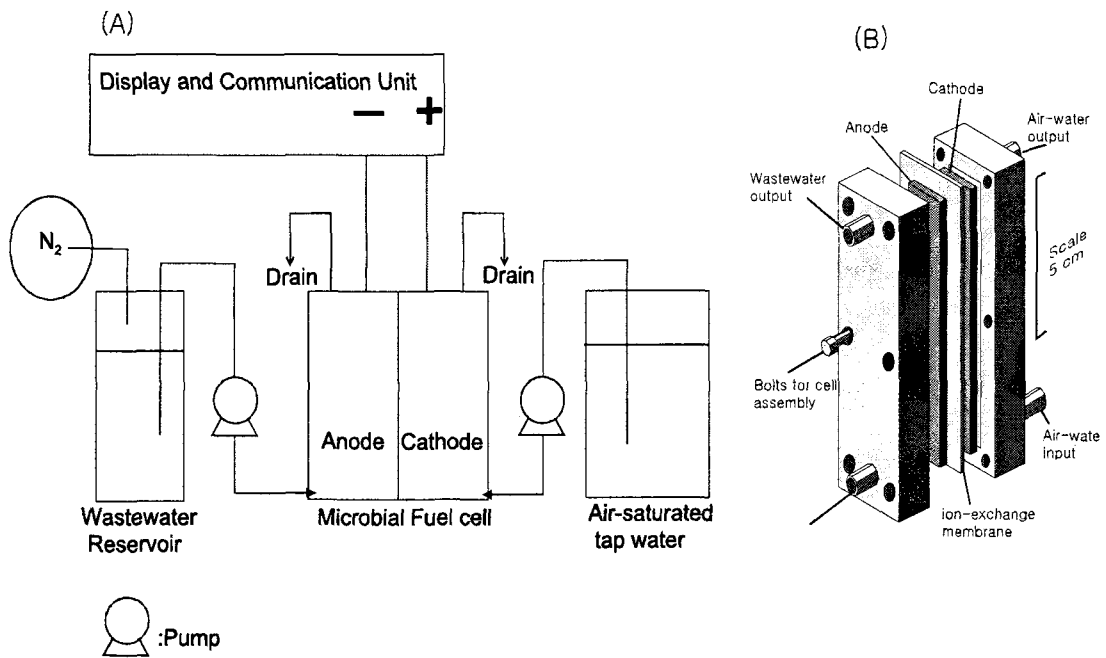


그림 3 Schematic diagram of the operating system (A) and structure (B) of sensor-type MFC

각 미생물 연료전지에서 발생하는 전류값을 측정하기 위해서는 multimeter (Keithley Instrument Inc., Cleveland, OH, USA)로 일정 시간 마다 양극부와 음극부 사이의 potential 차이를 측정하였다. 측정된 potential(전압)은 다시 data acquisition system (Testpoint, Capital Equipment Co., Richmond, VA, USA)을 이용하여 personal computer로 전달하고 측정된 potential은 고정된 외부 저항값을 고려하여 환산하였다. 전하량은 COD변화로부터 이론적 coulomb을 계산하였다. 이 경우 COD 1 mg은 12 C으로 환산하였다.

#### 다. Chemicals

- Mediators: Potassium ferricyanide,  $K_3[Fe(CN)_6]$  (Kishida Chemical CO., Ltd, Tokyo, Japan); Methylene blue (Chroma-Gesellschaft Schmid Co., Stuttgart, Germany)

- Enzymes: Bovine catalase (Sigma Co.); horseradish peroxidase (Sigma Co.), laccase from *Rhus vernficera* (Sigma Co.), laccase from *Coriolus versicolor* (fungal laccase, Fluka Chem., Co.), Cytochrome c from Bovine heart (Sigma Co.)

- Platinum: Platinum vulcan XC-72 (E-TEK, Somerset, NJ, USA)

#### 라. 전극의 회수와 전자현미경

미생물연료전지의 양극부 전극의 일부 ( $0.5 \text{ cm}^2$ )를 회수하였다. 회수된 전극은 0.1 M NaCl이 첨가된 50 mM phosphate buffer (pH 7.0)에 넣고 vortex로 세게 흔든 시료 (shaken electrode)와 흔들지 않은 전극 (non shaken electrode)을 준비하였다. 준비된 전극은 양극부에서 부착되어 있는 물질들을 확인하기 위하여 전자현미경 시료로 사용하였다. 주사전자현미경으로 시료를 관찰하기 위해서는 다음과 같은 전 처리를 하였다.

- 전극의 일부를 PTFE membrane에 올려놓고 2-3 시간 건조
- 2% glutaraldehyde와 2 mM  $MgCl_2$ 가 포함된 100 mM HEPES buffer로 1시간 처리
- 1% Osmium tetroxide ( $OsO_4$ )로 2시간 처리
- 시료는 30, 50, 70, 80, 90 % ethanol로 각각 20분씩 처리
- 시료는 다시 70, 80, 90, 95% iso-amyl acetate로 각각 30분씩 처리
- 최종 시료는 24시간 건조 후 SEM 시료로 사용하였다.

SEM 분석용 시료는 gold coating device (Eiko IB-3 coater, Tokyo, Japan)로 처리를 하고 SEM instrument (S-4200 FE-SEM, Hitachi, Tokyo, Japan)로 15 kV에서 관찰하였다.

#### 따. Platinum coated graphite electrode

Platinum powder를 carbon에 첨가한 mixture(40% platinum on Vulcan XC-72, E-TEK, NJ, USA)를 Nafion ionomer와 함께 섞어서 spray coating을 하였다. 최종 platinum처리량은  $0.28 \text{ mg platinum/cm}^2 \text{ graphite surface}$ 가 되도록 하였다.

#### 바. Dissolved oxygen (DO) monitoring

전극의 임계산소농도 (critical oxygen concentration,  $[O_2]_{\text{critic}}$ )를 측정하기 위하여 반응 후 배출되는 양극부 용액의 산소농도를 DO meter (Orion Model 850, Beveley, MA, USA)를 사용하였다.

#### 사. 기타 분석

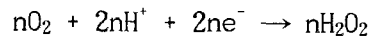
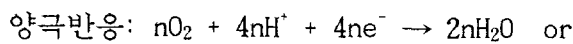
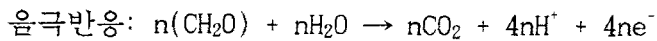
COD는 closed reflux titrimetric method를 이용하였다 (APHA, 1995). Ferricyanide의 분석은 흡광광도계를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하고 molecular extinction coefficient ( $1040 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )로부터 감소량을 측정하였다. 단백질의 분석은 Biuret method (Herbert et al., 1971)를 이용하였고 이때 표준 단백질로는 bovine serum albumin을 사용하였다. DNA의 분석은 diphenylamine method (Gerhardt, 1993)를 사용하였다. Hydrogen peroxide의 분석은 idometric titration method를 사용하였다.

### 3. 결과

#### 가. 미생물 연료전지

연구의 배경에서 밝힌 바와 같이 미생물연료전지를 이용하면 현재 활성슬러지법으로 처리되는 생활폐수의 슬러지 발생량을 이론적으로 66% 감소시킬 수 있다. 하지만 이런 수치는 대상폐수를 처리하는 속도가 동일하다는 조건에서 가능하다. 생물연료전지를 폐수처리장치로 운전하기 위해서는 먼저 생물연료전지를 구성하는 각 반응단계를 조사할

필요가 있다. 그림 1은 무매개체형 생물연료전지의 구성과 처리 속도에 제한될 수 있는 각 단계를 보여주고 있다. 무매개체형 생물연료전지에서 폐수처리용 목적으로 개발하기 위해서는 기본적으로 구성에 필요한 인자의 가격과 내구연한을 고려할 필요가 있다. 음극부의 구성에서 단계 1과 단계 2는 본 연구실의 실험 결과 지금까지 5년 이상 교체 없이 가능하다는 것을 보인 바 있으며 단계 4에 적용하는 외부저항은 반영구적인 소자이다. 그러므로 1차년도(2001-2002)에서부터 제 3단계와 제 5단계에 관련된 인자와 구성을 집중적으로 연구하고 있다. 음극부에서 양이온교환막을 통해서 양극부로 전달된 수소이온은 다음과 같은 반응식을 거쳐 최종적으로 전자를 소비하게 된다.



5단계의 반응에서 한 가지 반응이 율속이 되면 전체 반응이 이 율속 반응에 지배되게 된다. 그러므로 폐수처리용 생물연료전지의 처리속도를 높이기 위해서는 최소한 식 2의 반응에서 수소이온의 공급 속도와 산소의 공급 속도가 반응 1, 2, 3에서 발생하는 전자를 양극부로 전달하는 속도보다 빨라야 함을 알 수 있다. 표 2는 폐수처리용 미생물연료전지의 하나로 NCBE type cell의 운전조건을 보여주고 있으며 그림 4는 미생물연료전지에서 서로 다른 폐수 농도에 대한 전류값의 변화를 보여주고 있다. 이 결과를 이용하여 계산한 폐수의 유기물 분해속도와 전기발생속도는 표 3과 같다.

표 2 NCBE type 생물연료전지의 구성과 기본 운전조건

Cell type		National Centre for Biotechnology Education (NCBE)
Wastewater		Starch processing wastewater (400-1500 ppm as COD)
Anode	Electrode	Graphite electrode (GEE synthesis Co.)
	Volume	25 ml
Cathode	Electrode	Graphite electrode (non Pt coated)
	Volume	25 ml
	Oxidant	Air
양이온교환막		Nafion (DuPont Co., Nafion 450)
외부저항		10 ohm (5 -2000 ohm tested)
운전 기간		5년 이상



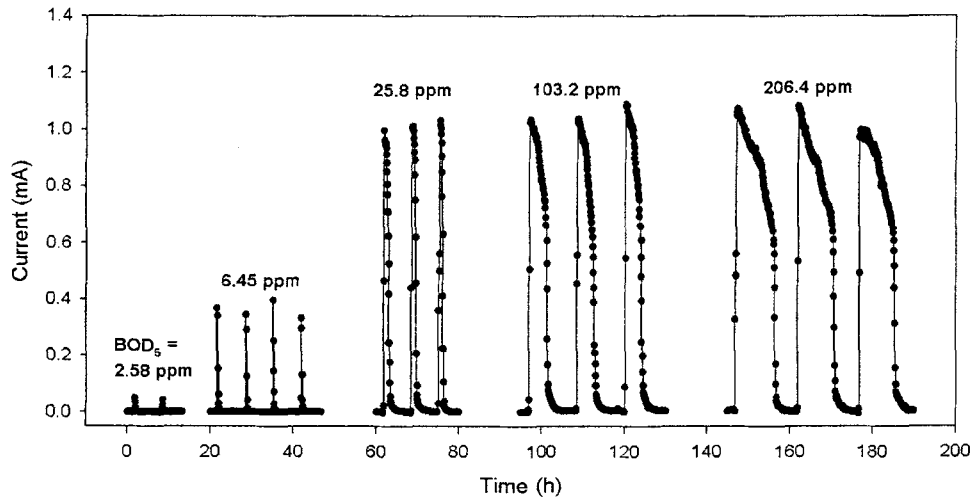


그림 4 NCBE type 생물연료전지에 의한 식품공장발생폐수의 처리에 의한 전류발생

표 3 NCBE cell의 폐수처리속도

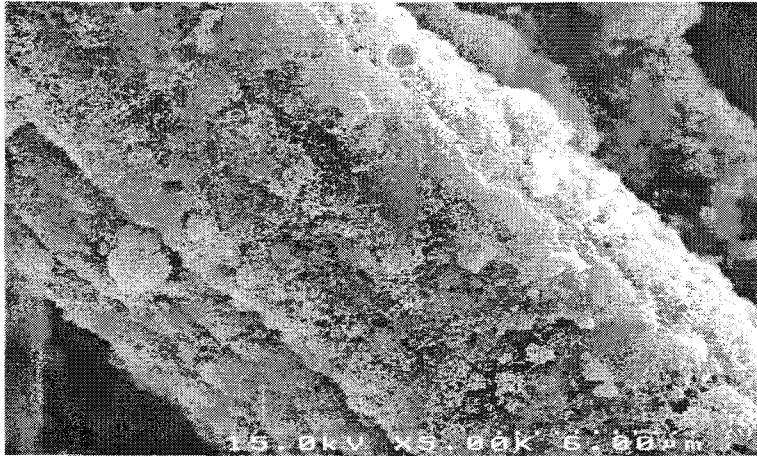
COD변화 (ppm)	처리시간 (h)	처리속도 (ppm/h)	Coulomb 발생 (C)	Coulomb yield (%)
350	5.14 ± 0.25	68.1 ± 3.3	14.4 ± 1.7	17.2 ± 2.0

표 3에서 나타낸 바와 같이 약 400 ppm (COD 기준)의 전분가공폐수를 대상으로 운전한 생물연료전지는 약 68 ppm/h의 폐수처리속도를 나타내었다. 이 결과는 폐수의 처리속도가 1단계 연구개발목표인 60 ppm/h에 도달하였음을 알 수 있다. 하지만 yield가 약 20% 미만으로 측정되었는데 이 것은 처리된 폐수의 유기물의 20%만이 전기의 형태로 전환된 것을 의미한다. 이러한 이유로는 그림 1에 표시한 반응단계에서 양극부의 전체반응을 구성하는 반응이 음극부의 반응보다 속도가 제한되었던 것으로 판단된다. 그러므로 본 연구에서는 양극부의 반응을 높이는 연구를 진행하였다. 다음은 양극부의 반응속도를 높이기 위한 실험들은 다음과 같다.

- 1) 전자현미경(SEM)을 이용한 양극 전극부의 표면조사
- 2) 양극부에 전달되는 산소의 Nafion 막을 통한 전달
- 3) 양극부의 임계산소농도 측정
- 4) 과산화수소를 oxidant로 사용한 양극반응
- 5) Ferricyanide나 methylene blue와 같은 매개체의 응용
- 6) Biocatalyst나 전도성 유기염의 사용

양극부 전극의 표면 조사의 경우 장시간 운전하였던 생물연료전지의 양극부의 상태를 조사할 필요가 있기 때문에 수행되었다. 먼저 양극부 전극의 일부를 채취 SEM으로 측정 (그림 5) 한 후 protein, carbohydrate와 DNA농도를 측정하였다 (표 4).

(A) Not shaken



(B) Shaken

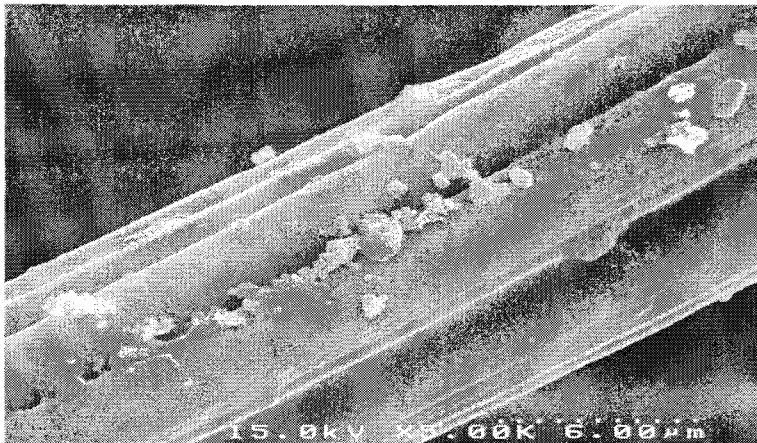


그림 5 SEM images of graphite electrode in cathode

표 4 Chemical analyses of the cathode

Electrode sample	Protein (mg/g electrode)	Carbohydrate (mg/g electrode)	DNA (mg/g electrode)
Shaken electrode	30	0.17	<detection limit
Not shaken	25	1.07	<detection limit

위의 결과는 양극부에 존재하는 particle들이 biomaterial (microbial cell, enzyme)이 아님을 보여준다.

#### 나. 미생물연료전지에서 양극부 전극의 임계산소농도 측정

호기성 미생물은 에너지 보전을 위해서 산소를 최종 전자수용체로 사용하기 때문에 배양과정에서 산소의 공급이 매우 중요하다. 그러므로 산소의 농도에 대한 미생물의 비성장속도 (specific growth rate)를 구하고 산소의 농도가 제한되지 않는 조건에서 운전하면 미생물의 배양을 최적화할 수 있다. 이와 같은 배경에서 산소의 농도가 최대 성장속도를 보이는 최저농도를 임계산소농도 (critical oxygen concentration,  $[O_2]_{critic}$ )라고 한다. 임계산소농도보다 낮은 산소 농도에서는 미생물의 성장속도가 떨어지게 되는데 동일한 개념이 미생물연료전지의 양극부 반응에서도 적용된다. 미생물연료전지에서 음극부에서 연료의 산화에 의해 발생한 전자와 수소이온은 각각 외부 저항과 양이온교환막을 통하여 양극부로 전달되고 양극부에 공급되는 산화제인 산소와 반응하여 최종적으로 물로 전환된다. 이러한 반응에서 전자와 수소이온을 소비하는데 제한이 되지 않는 일정 산소 농도 이상의 조건이 주어져야 한다. 이를 미생물연료전지에서 임계산소농도로 규정할 수 있다. 임계산소농도는 주어진 미생물연료전지의 구조와 조건에서 다른 값을 가질 수 있는데 특히 사용되는 전극의 특성에 따라 결정될 수 있다. 그러므로 본 연구에서는 기본적인 전극으로 사용되어 왔던 graphite를 장착한 미생물연료전지에서 임계산소농도를 측정하였다. 이 실험에서는 sensor type cell을 사용하였으며 graphite 전극을 사용하였다. 그림 6은 유속을 변화시키면서 전류값을 측정하고 유출되는 반응액의 산소농도를 측정한 결과이다.

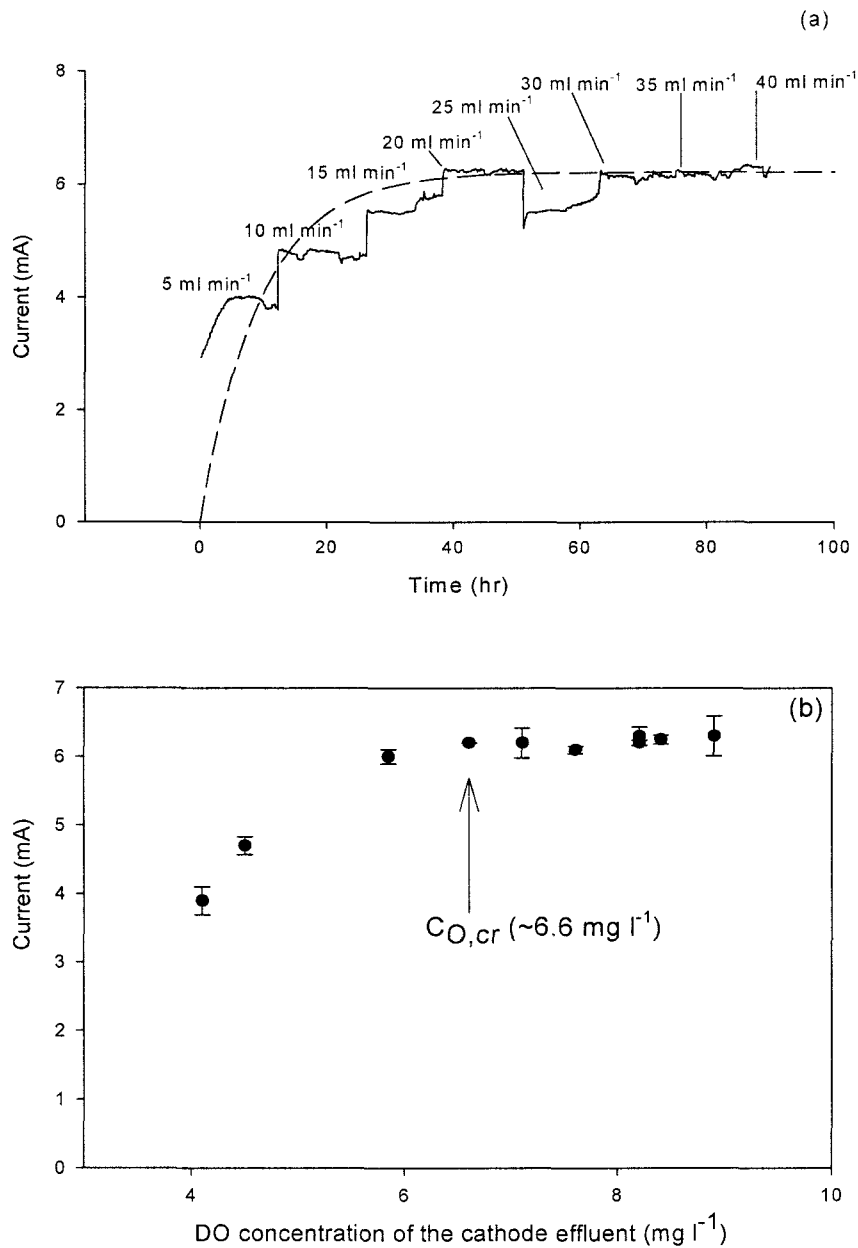


그림 6 Determination of critical oxygen concentration by monitoring current and DO in the cathode effluent of sensor-type MFCs at different flow rates of air saturated electrolyte into the cathode compartment. The MFCs operated in a continuous mode. (a): Current trace in response to changes of cathode flow rate. (b): Current vs. [DO] in the cathode effluent

위의 결과는 graphite 전극의 임계산소농도가 약 6.6 ppm이며 이 농도는 상온에서 공기로 포화되는 용액의 산소 농도가 약 8 ppm수준임을 감안할 때 높다는 것을 알 수 있

었다. 그러므로 양극부에서 반응속도가 임계농도 보다 낮을 경우 제한될 수 있다. 한편 양극부의 공기포화액을 산화제로 사용할 경우 대기 중의 산소농도가 약 20% 수준이기 때문에 산소의 포화농도를 높이는 방법으로 임계산소농도 보다 높게 유지할 수 있다. 그러므로 양극부에 공기포화액 대신 산소를 사용하는 방법을 시험하였다. 그림 7은 NCBE type의 cell에 전분가공폐수를 기질로 운전하던 미생물 연료전지에서 양극부에 동일한 유속의 공기와 산소를 gassing한 결과이다.

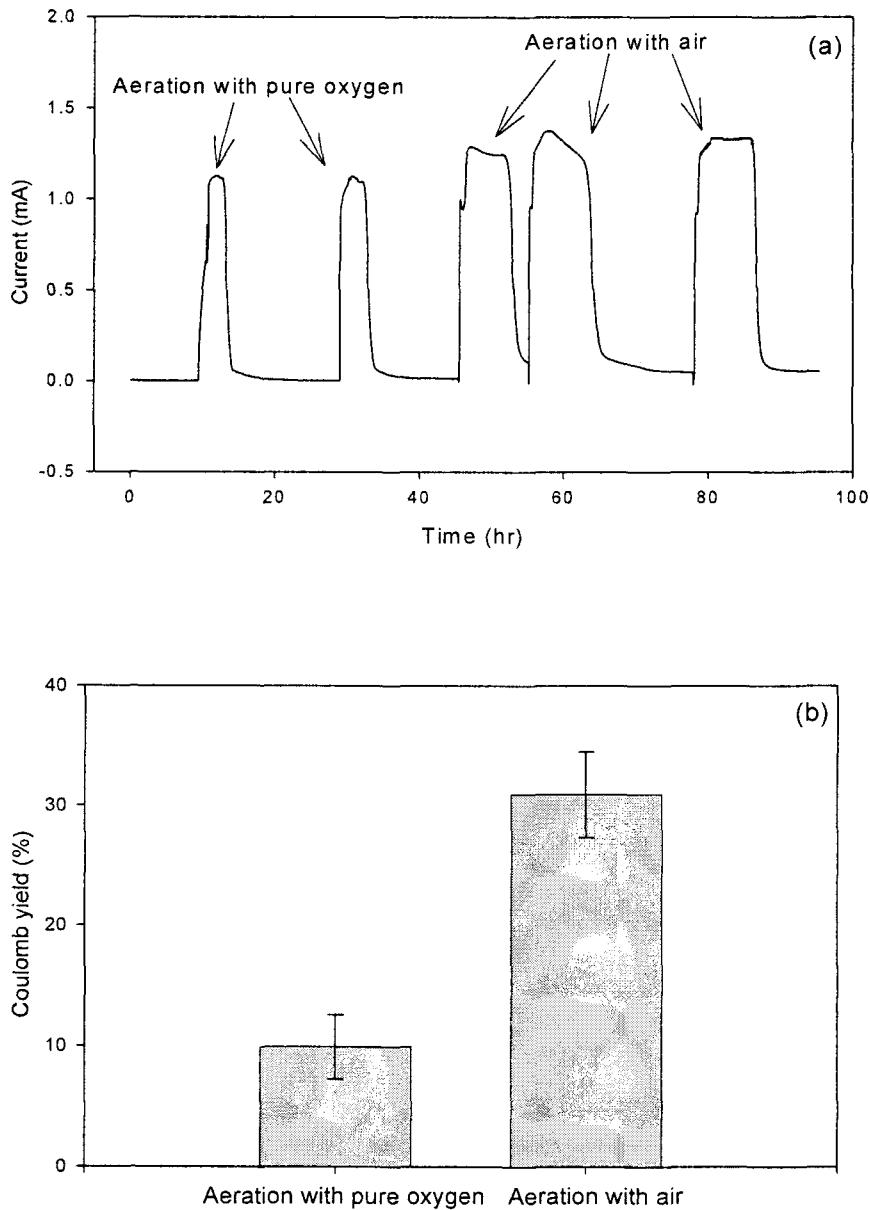


그림 7 Current patterns (a) and coulomb yields (b) from NCBE-type MFCs gassed with pure oxygen and air. (The fuel cells were operated with wastewater of 400 mg/l COD)

동일 연료를 대상으로 운전한 미생물연료전지에서 예상과 달리 오히려 산소로 gassing한 조건에서 전류값과 coulomb yield가 낮게 측정되었다. 이 결과는 양극부에 과량으로 공급되는 산소에 의해서 미생물연료전지에 영향을 미친 것으로 판단된다. 상세하게는 임계산소농도 이상에서는 양극부의 반응속도가 일정하게 유지되는 반면 용존산소의 농도가 높아짐에 따라 양이온교환막을 통하여 음극부로 전달되는 속도가 높아서 발생한 현상으로 판단된다. 이와 같은 해석은 본 연구실을 통하여 수행되었던 기관고유 사업에서 양이온교환막을 통하여 산소가 음극부로 전달되는 것을 연구한 바 있다 (김병홍 등, 2003). 그러므로 양극부의 산소공급은 임계산소농도 이상으로 유지되면서 막으로 전달되는 산소의 양을 제한할 수 있는 조건으로 운전해야 함을 알 수 있다. 그러나 graphite전극의 임계산소농도가 6.6 ppm이고 이 농도가 공기에 의해 포화될 수 있는 산소농도인 8 ppm에 비하여 큰 차이가 없기 때문에 임계산소농도를 낮출 수 있는 전극을 사용해야 함을 알 수 있다. 이에 대한 연구는 본 과제에서 graphite전극에 백금을 처리하고 동일하게 임계산소농도를 측정할 결과에서 알 수 있었다.

#### 다. Cathode mediator의 사용

Ferricyanide 용액을 사용하여 생물연료전지에서 양극부에서 mediator로 사용할 수 있음을 밝힌 바 있다 (Jaffari and Turner, 1997). 본 미생물연료전지에서 동일한 효과를 얻기 위하여 실험을 하였다. 먼저 NCBE type cell을 이용하여 전분가공폐수를 기질로 음극부에 주입하고 전해액으로 phosphate buffer와 NaCl용액을 사용한 운전을 control로 하였다. 한편 양극부의 전해액으로 동일한 전해질액에 6 mM의 potassium ferricyanide를 첨가하여 운전한 것을 실험군으로 사용하였다. 그림 8과 그림 9는 두가지 운전에서 보인 전류값의 변화와 발생 coulomb를 보여주고 있다. 대조군에 비해 ferricyanide를 처리한 실험군에서 약 2 시간 동안에 전류값이 2.5 mA까지 증가하다가 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 감소되었을 때의 전류값이 대조군과 유사한 값 (약 1 mA)을 보인 것으로 보아 2 시간 동안의 급격한 전류값의 증가는 ferricyanide의 효과로 판단되었다. 한편 실험군에서 양극부의 ferricyanide의 농도를 측정하기 위해서 420 nm에서 흡광도를 monitoring하였다. 흡광도를 측정한 결과는 1 mA 수준이 유지되는 조건에서 약 0.1 이하로 나타내었다. 이 결과는 ferricyanide의 효과가 일시적인 것을 의미한다. 한편 기존에 생물연료전지에서 ferricyanide를 사용할 경우에 전자를 소비하기 위하여 Fe(III)가 작용하고 환원된 Fe(II)는 다시 산소에 의하여 Fe(III)로 산화되기 때문에 recycle이 가능하다고 하였다. 하지만 본 연구결과에서 보인 바와 같이 장시간 운전에서 ferricyanide를 recycle하면서 사용할 수는 없을 것으로 판단된다.

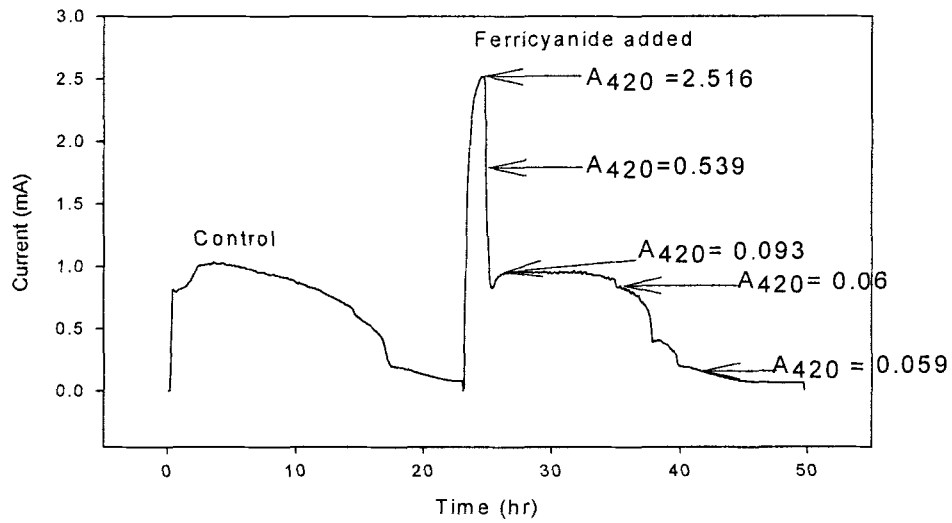


그림 8 The effects of ferricyanide added into cathode electrolyte on the current generation by MFCs. NCBE-type MFCs were used. The numbers in the figure are the absorbance values (at 420 nm, max of ferricyanide) of cathode electrolyte that was added with 6 mM potassium ferricyanide.

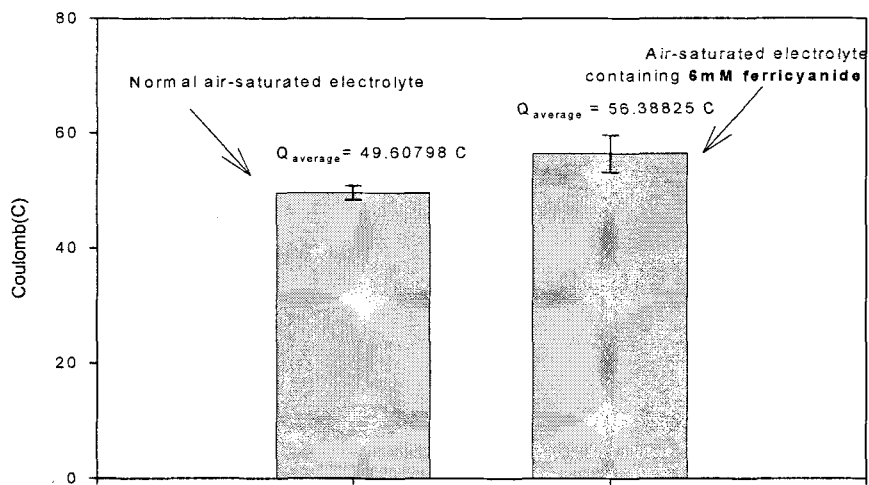


그림 9 Coulomb obtained from a mediator-less MFC containing 6 mM potassium ferricyanide in the cathode (right) in comparison with that from the fuel cell before using the electrolyte (left).

약 1 mA가 유지되는 조건에서는 대조군과 동일한 전류값을 보였고 전체 운전시간인 약 20시간에 비해 6 mM의 ferricyanide가 작용한 시간이 2시간 정도이기 때문에 전체 발생 전하량은 큰 차이가 없을 것으로 생각되었다. 이 판단은 그림 8을 통하여 큰 차이가 없는 전하량 발생을 확인할 수 있었다. 한편 ferricyanide의 사용농도를 증가시키는 방법을 생각해 볼 수 있다. 하지만 과량이 폐수에 유입될 경우 발생하는 2차 오염과 장시간 운전에 소요되는 양을 고려한다면 ferricyanide의 사용은 좋은 방법이 아닐 것으로 판단된다.

양극부에서 ferricyanide와 같은 효과를 기대하기 위하여 다른 mediator로 methylene blue를 사용하였다. 양극부에 전해액에 10 mM의 methylene blue를 첨가한 미생물 연료전지를 운전하였다. 그림 10은 10 mM methylene blue의 양극부 전극에 처리된 미생물연료전지의 전류값에 대한 효과를 보여주고 있다.

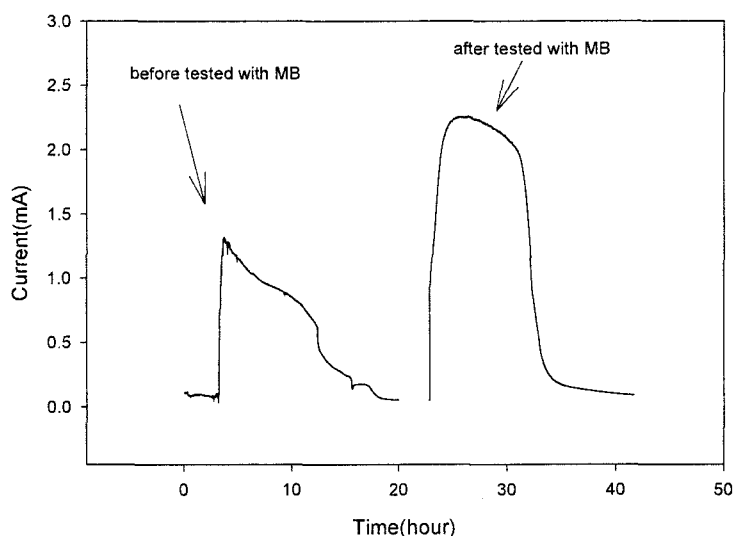


그림 10 Comparison of current patterns obtained from an MFC in two cases: before tested with MB and after tested with MB (Air saturated electrolyte of 50 mM phosphate buffer and 100 mM NaCl containing 10 mM methylene blue was used in the cathode compartment).

Ferricyanide와 같은 methylene blue도 양극부에서 효과적인 mediator로 작용할 수 있음을 알 수 있었다. 하지만 두 가지 mediator 모두 장시간 운전할 경우 2차 오염이 우려될 수 있다. 그러므로 효과적이고 2차오염의 우려가 없는 방법이 강구되어야 한다.

현재 연료전지에서 음극부와 양극부에서 모두 catalyst로 백금을 사용한다. 미생물



연료전지의 경우에는 음극부의 catalyst가 미생물이기 때문에 별도의 백금처리는 필요가 없다. 하지만 양극부의 경우 반응 mechanism이 기존 연료전지와 동일하기 때문에 백금처리에 대한 영향을 시험해 볼 필요가 있다. 더구나 백금을 처리할 경우 앞에서 사용한 mediator의 사용에서 발생할 수 있는 2차 오염의 우려가 없다. 하지만 백금의 사용은 그 효과와 함께 경제성을 고려해야 할 필요가 있을 것으로 판단된다. 그림 11은 NCBE type cell을 이용하여 앞의 실험과 동일하게 폐수를 이용하여 운전한 결과 (대조군)와 백금을 처리한 결과 (실험군)의 전류값과 전하량의 변화를 측정된 것이다.

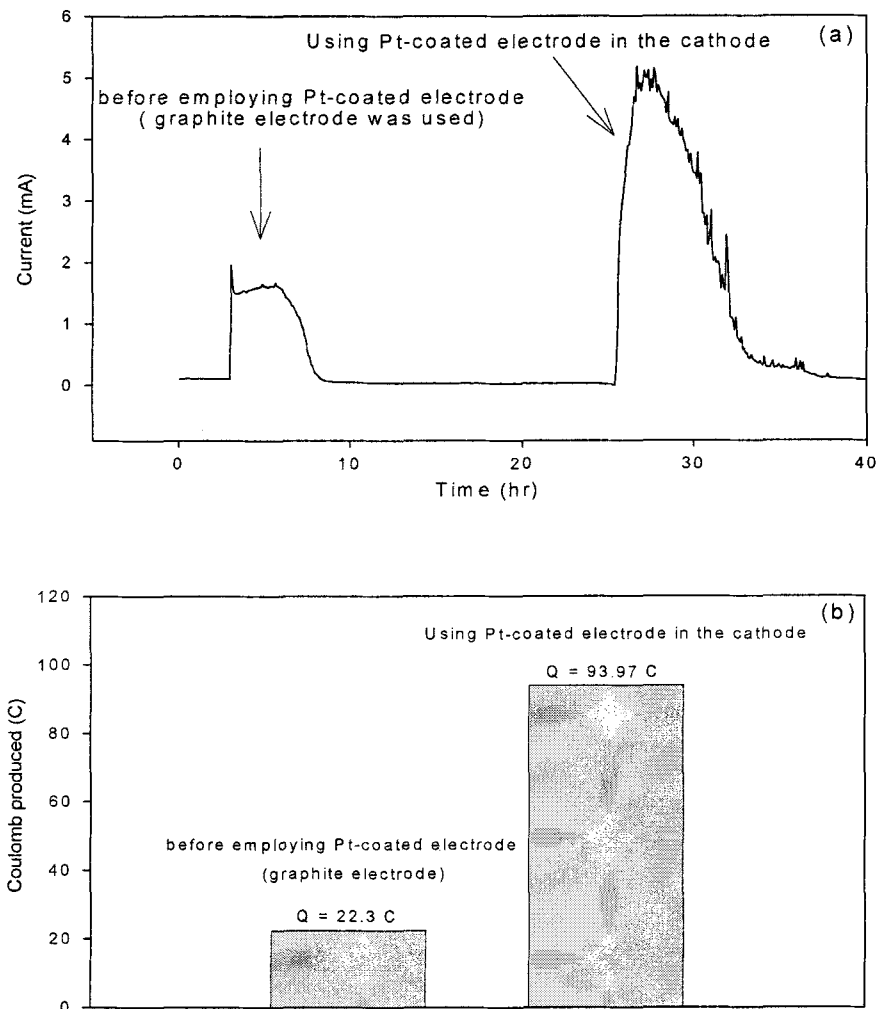


그림 11 Current pattern (a) and coulomb yield (b) obtained with graphite or platinum coated graphite as the cathode in an NCBE-type mediator-less MFC run with SPW of 400 mg l-1 COD as fuel.

백금 처리에 의한 효과는 다른 mediator를 처리한 것에 비하여 월등히 좋은 것을 확인할 수 있었다. 대조군에 비하여 백금을 처리한 실험군의 경우 전류값은 약 5 mA를 유지하였고 발생전하량도 약 5배 정도가 증가된 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 백금을 처리한 경우에 양극부의 임계산소농도가 낮아지거나 혹은 반응속도가 빨라졌던 결과로 판단된다. 이를 확인하기 위하여 graphite 전극의 임계산소농도를 측정하고, 동일한 방법으로 백금을 처리한 전극의 임계산소농도를 측정하였다 (그림 12).

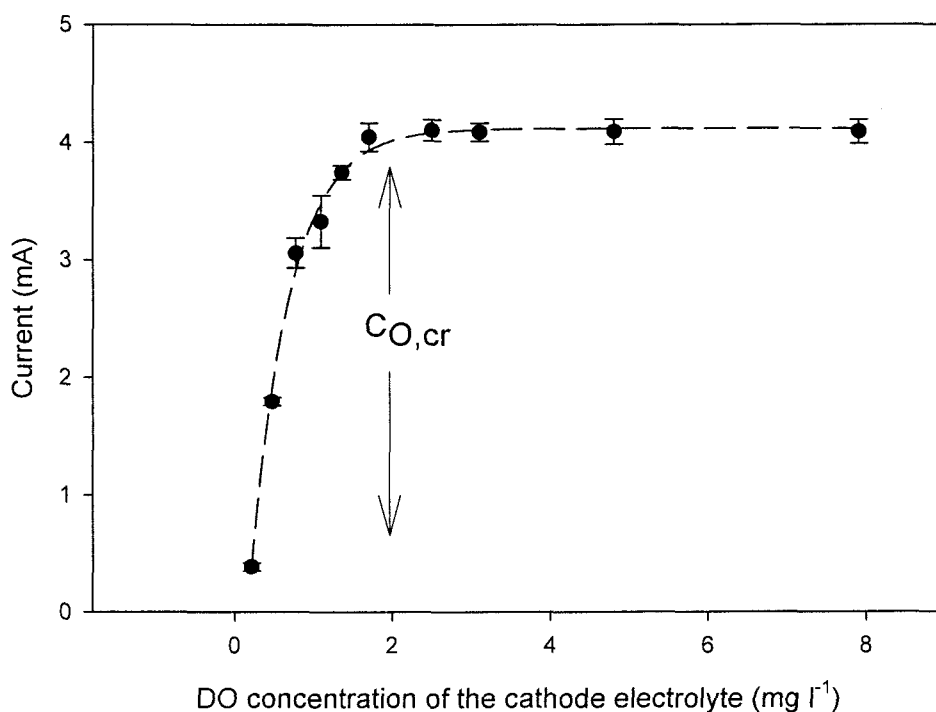


그림 12 Determination of critical oxygen concentration of the MFC with platinum coated cathode using NCBE-type MFCs.

한편 양극부의 전극에 산화환원 효소, 전도성 유기물 등을 처리하고 그 효과를 관찰하였다 (표 5). 사용한 효소로는 laccase와 peroxidase와 catalase를 사용하였다. 하지만 백금처리와 같은 효과를 관찰할 수 없었다.

#### 4. 결론

표 5는 지금까지 사용한 양극부의 개선방법과 그 효과를 표시한 것이다. 음극부에 공급하는 폐수 (전분가공폐수)의 농도 (400 ppm as COD)를 고정시킨 상태에서 양극부를 다양한 방법으로 개선하고자 한 결과 백금을 처리한 것이 상대적으로 전류발생과 coulomb yield가 높음을 알 수 있었다. 한편 양극부에 ferricyanide나 methylene blue와 같은 mediator는 일시적으로 전류 값이 상승하는 것을 관찰하였으나 운전도중에 염이 형성되는 것을 관찰하였다. 전도성 유기염의 경우 일부는 전류발생이 감소된 후 복구되지 않는 것을 확인하였다. 또한 효소 유래의 biocatalyst를 사용할 경우 전류의 증가는 확인되었지만 효소를 장시간 안정한 상태로 고정화 시켜야 하는 문제점을 포함하고 있다. 더구나 전류의 발생은 동일 폐수를 대상으로 백금 처리한 것보다 낮게 측정되었다. 그러므로 향 후 폐수처리용 미생물 연료전지의 양극부 전극은 산소에 대한 친화성이 높은 염가의 전극물질의 개발이 필요하다.

표 5 Currents and coulombs obtained from different experimental cases testing the use in cathode

Experimental cases	Conc or treatment	Ave. current (mA)	Coulomb (C)
Control		1.2	45±5.0
Ferricyanide (K salt)	6 mM	1.1 (max 2.5)	55±5.0
methylene blue	10 mM	2.2	72±8.0
<b>Platinum (Pt)</b>	<b>coated</b>	<b>4.5</b>	<b>94±8.8</b>
HR peroxidase	500 U	1.38	62±2.0
	1000 U	1.40	58±6.0
Bovine catalase	500 U	1.42	58±4.0
	1000 U	1.35	62±4.0
Fungal laccase	40 U	1.25	50.3±5.4
	80 U	1.1	47.8±4.0
	40 U + 5 µM cytochrome C	0.9	54±5.8
	40 U + 20 mM ferricyanide	1.27 (max 1.70)	60±6.0
Vegetal laccase	600 U	1.2	48±5.0
	600 U + 5 µM cytochrome C	1.1	53±5.0
	600 U + 20 mM ferricyanide	1.2 (max 2.0)	62±3.0
TTF-TCNQ	2 mM	1.1	45.5±4.4
NMP-TCNQ	2 mM	1.5	55±5.7
Q(TCNQ)2	2 mM	1.4	53±3.2
TTF-TCNQ	coated	0.9	37±4.6
NMP-TCNQ	coated	2.4	80±7.8

## 제 2 절 폐수처리용 미생물 연료전지

### 1. 연구 내용

미생물연료전지의 구성은 앞에서 밝힌 바와 같이 양극부와 음극부로 나누어지고 두 compartment는 양이온교환막으로 분리되어 있다. 음극부에서는 미생물에 의해 유기물이 산화되고, 이 과정에서 생성된 전자는 external circuit를 통하여 양극부로 전달하게 되면서 수소이온은 양이온교환막을 통해서 선택적으로 음극부에서 양극부로 전달된다. 따라서 연료전지에서 양이온교환막은 반드시 필요한 part이다. 본 실험실을 통하여 세계 최초로 소개되기 전까지 미생물연료전지에서 음극부에 촉매로 작용하는 일반미생물은 세포표면이 전기적으로 절연되어 있기 때문에 미생물 내부에서 기질을 산화하고 발생하는 전자를 세포 외부로 전달하기는 어렵다고 알려져 있었다. 따라서 미생물연료전지에서 미생물의 전자 전달계로부터 전극으로 전달하기 위하여 다양한 electrochemical mediator를 사용하여 왔다. Electrochemical mediator는 미생물의 전자 전달 시스템에 접근, 산화되어 있는 상태의 mediator 자체가 환원된 후 미생물 외부로 나온 후 전극의 표면에서 다시 산화되어 전극에 전자를 공급하는 역할을 한다. 그러나 이러한 mediator는 난분해성 물질로 2차 오염의 원인이 될 수 있으며, 장기적으로 사용 시 전극에 점착되어 효율을 떨어뜨리는 수도 있다. 또한 미생물에 독성이 있는 방향족 화합물이 많아 그 이용에 제한이 많다. 따라서 enzyme등 다른 활성 촉매 등을 사용하는 것에 대한 연구가 되어 왔다. 그러나 본 연구실에서 연구된 결과에 따르면, mediator 없이 미생물이 직접 산화 환원 반응에 관여는 전기 화학적 활성 미생물이라는 개념과 이를 이용해서 연료전지의 이용 가능성을 보인바 있다. 한편 본 국가지정연구실사업을 통해서 미생물연료전지를 “폐수처리장치”로 개발하고자 한다. 이는 연구의 최종목표이며 2단계 연구가 종료되는 시점인 2006년도에 폐수처리장치로써의 미생물연료전지를 제시하고자 한다. 본 1 단계 연구에서는 우선 폐수처리장치로 사용할 수 있는지의 여부와 만약 사용하게 된다면 제시해야 할 기본 model이 무엇인지를 확인할 필요가 있었다. 폐수처리 장치로써의 가능성 여부는 우선 앞 장에서 전분가공폐수를 이용하여 운전한 미생물연료전지의 유기물 분해속도와 전기 발생을 제시하였다 (그림 4, 표 3). 이때 미생물연료전지는 약 68 ppm/h의 유기물 분해속도를 보여주었는데 이 속도는 현재 폐수처리장치로 운전되고 있는 활성슬러지법(activated sludge)와 비교하여 비슷한 처리속도이다. 하지만 앞에서 보였던 미생물연료전지(NCBE type cell)의 coulomb yield가 약 20% 미만으로 측정되었는데 이는 분해된 유기물에서 발생한 전자의 약 20% 만이 전기로 전환되었다는 것을 의미한다. 이 결과는 활성슬러지법에서 현재 문제가 되고 있는 슬러지의 감량효과를 미생물연료전지 형태의 폐수처리장치가 해결할 수 있다는 관점에서는 아직까지 yield가 낮다고 판단된다. 하지만 유기물 분해에서 발생하는 전자를 효과적 전기로 회수할 수 있는 장치로 개발된다면 충분히 슬러지 감량효과를 확실하게 얻을 수 있다고 판단된다. 이러한 장치의 개발은 본

연구사업의 종료되는 시점까지 수행되어야 할 것이다. 한편, 폐수처리용 미생물연료전지를 산업화하기 위해서는 지금까지 사용하였던 미생물연료전지에서 양이온교환막에 대한 연구가 논의될 필요가 있다. 왜냐하면 양이온교환막이 필수불가결하게 미생물연료전지에서 사용되어야 할 part임을 알고 있지만 현재 미생물연료전지를 운전하면서 발생하는 전류를 고려한다면 Nafion과 같은 고가의 양이온교환막이 사용될 필요는 없을 것으로 판단되기 때문이다. 현재 Nafion은 다국적 기업인 DuPont사를 통하여 생산되고 있다. 연료전지에서 Nafion의 역할은 전해질 (electrolyte)로써 음극부에서 발생하는 수소이온을 양극부로 효과적으로 전달하기 위해서 사용하고 있는 cation exchange membrane이다. 이때 수소이온의 전달은 양극부와 음극부의 수소이온 농도차를 통하여 이동되는데 실제 음극부에서 수소의 전기분해에 의하여 발생하는 수소이온만을 선택적으로 전달하기 보다는 미생물연료전지의 음극부처럼 여러 다양한 양이온들이 존재할 경우 Nafion은 음극부와 양극부 사이의 양이온 농도차에 의하여 수소이온과 더불어 양이온 들이 전달될 수 있다. 이와 같은 환경은 양이온교환막의 내구성이 문제가 되고 만약 폐수처리장치와 같은 system을 구성할 경우 장치 크기에 따라 필요한 membrane의 가격이 경제적이지 않을 수 있다. 참고로 현재 본 미생물연료전지에서 사용하고 있는 DuPont사의 Nafion 450의 경우 가격이 약 \$1,000/m<sup>2</sup>이다. 한편 Nafion의 다른 역할은 음극부와 양극부를 절연하고 closed circuit을 형성하는 것이다.

이와 같은 배경으로 폐수처리용 미생물연료전지에서 Nafion과 같은 양이온교환막의 사용할 수 없을 것으로 생각되며 경제성을 위해서는 Nafion을 제거하거나 혹은 경제적인 대체품을 찾을 필요가 있다. 본 연구에서는 이를 위하여 membrane-less, microbial fuel cell (ML-MFC)를 폐수처리용 미생물연료전지의 model system으로 적용하고 1단계 연구에서 수행하였다.

## 2. 실험재료 및 방법

### 가. ML-MFC 의 구조 및 운전조건

본 연구의 목표는 양이온교환막을 사용하지 않고 폐수를 처리하기 위한 미생물연료전지의 개발이다. 그림 13에서는 이를 위하여 연구 1차년도에 제작한 미생물연료전지를 보여주고 있다. 이 장치는 직경이 10 cm이고, 수직으로 긴 원통형으로써 하단은 음극부로 상단은 양극부로 제작하였다. 폐수는 음극부를 통하여 상향식으로 주입되고 음극부에서는 미생물반응에 의한 유기물이 분해되고, 양극부로 유입되는 처리된 폐수에 산화제 (산소)를 공급하면서 양극반응이 이루어지도록 고안하였다. 음극부와 양극부를 절연하고 구분하기 위해서 glass bead와 glass wool을 이용하였다. 음극부의 높이는 30 cm높이이며, 그 위에 glass bead와 wool은 10 cm두께로 충전 하였다. 양극부는 60 cm로

electrode의 위치를 변화시킬 수 있도록 6개의 조각을 조립하여 연결하였다. 양극부의 compartment를 6부분으로 나눈 것은 양극부에 부착시킬 전극의 위치에 따라 proton 전달이 양극부 반응에 미치는 영향을 확인하기 위한 것이다. 음극부와 양극부의 절연상태는 전체 system이 완성되고 운전하기 전에 양극부와 음극부 사이의 저항을 측정한 결과 약 수 M $\Omega$ 이 되는 것으로 확인할 수 있었다. 미생물연료전지의 전체 void volume은 8.033 l 이고 음극부의 void volume은 1.35 l이다. 폐수의 공급은 peristaltic pump (505S, Watson-Marlow, Falmouth, Cornwall, UK)를 이용하여 다양한 유속으로 조절하였으며, feeding rate를 통하여 hydraulic retentive time (HRT)을 결정하였다. 이때 HRT는 전체 void volume을 기준으로 하였다. 초기 농화배양 단계에서는 유속을 0.28 ml/min으로 설정하였다. 폐수는 실험에 따라 여러 BOD농도가 되도록 제조하고 음극부의 하부로 주입하고 음극부와 glass wool과 glass bead 분리층을 통과시킨 다음 양극부 (electrode가 충전되어 있는 part)의 중간지점에서 폐수를 배출시켰다. 각 compartment에 충전한 electrode (탄소부직포)의 양은 음극부가 196 g을 맡아서 장착하고, 양극부에는 53.25 g (두께 1.27 cm, 직경 10 cm  $\times$  10개)의 탄소부직포를 포개서 장착하였다. 운전 저항은 10  $\Omega$ 으로 하여 운전하였다. 인공폐수의 reservoir에 형성되는 negative pressure에 의해 산화되는 것을 막기 위하여 질소를 충전한 gas-tight bag을 reservoir에 연결하여 사용하였다. 이때 공기는 양극부에 충전된 electrode 바로 아래로 주입하였다 (그림 13).

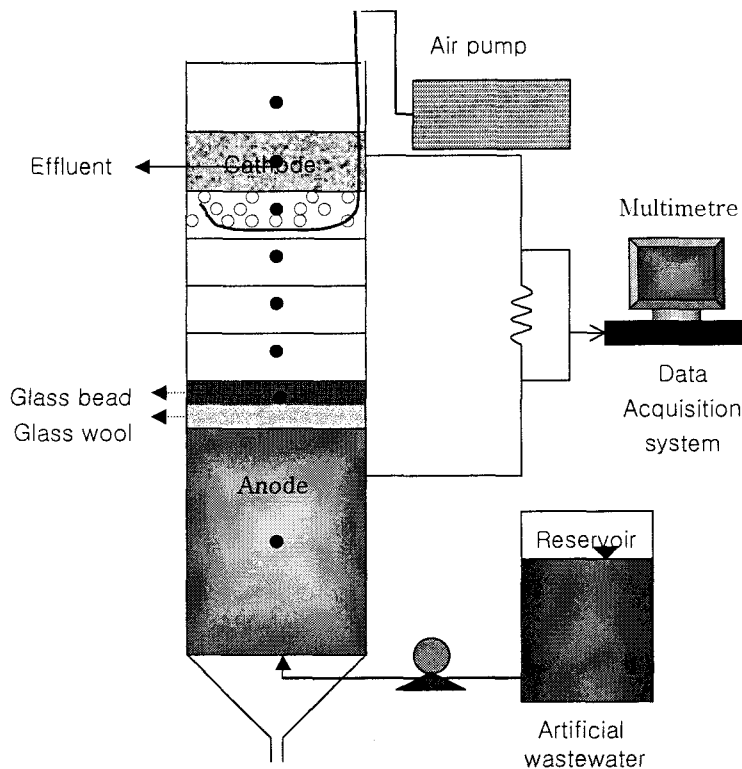


그림 13 Membrane-less microbial fuel cell (ML-MFC) for wastewater treatment

- ▶ Anode compartment : 30 cm, ▶ Cathode compartment : 10 cm
- ▶ Rate of supplied substrate : 0.28 mL/min,
- ▶ Resistance : 10 ohm,
- ▶ HRT : 20 day, ▶ Artificial wastewater conc. : 300 ppm
- ▶ Electrode - cathode : 53.25 g, anode : 196 g
- ▶ The anode and cathode compartments of this system were separated by glass wool and glass bead

#### 나. 폐수 및 시약

인공폐수는 유기물인 glucose와 glutamic acid를 포함하여 표 1과 같이 구성하였다. 인공폐수는 BOD농도로써 100-300 ppm으로 조정하면서 사용하였다. 이론적으로 BOD 100 ppm의 인공폐수를 만들 경우 glucose와 glutamate의 농도는 각각 50 mg/l가 되게 하였는데 이를 전자수로 환산하여 이론적 BOD와 비교하면 다음과 같다.

Glucose 50 mg/l (0.277 mM, 6.66 meq<sup>-</sup>, 1.665 mM as O<sub>2</sub>) = 53.28 ppm as BOD  
 Glutamate 50 mg/l (0.340 mM, 6.12 meq<sup>-</sup>, 1.53 mM as O<sub>2</sub>) = 48.96 ppm as BOD  
 (Total BOD = 102.24 ppm)

일정 BOD 농도로 제조된 인공폐수는 생물연료전지의 하부로부터 공급을 하였으며 이때 폐수의 flow rate는 pump (505S, Watson-Marlow, Falmouth, Cornwall, UK)로 조절하였다.

#### 다. Cyclic voltammetry (CV)

양극부에서 미생물 byproduct 중 electrochemical activity를 갖는 물질이 생성되는지를 확인하기 위하여 cyclic voltammetry (CV-50BAS, USA)를 이용하였다. 이 실험은 electrochemical activity를 갖는 물질이 effluent에 존재한다면 유기물을 산화하는 미생물에서 전자가 전극으로 전달될 때 수용성의 매개체 역할을 할 수 있기 때문에 이를 확인하기 위하여 실시하였다. 이 분석은 electrochemical cell에서 3개의 electrode (working electrode (MF 2073, BAS), platinum counter electrode, 그리고 Ag/AgCl reference electrode)에 의해 측정된다. 이때 working volume은 약 5 ml 이었으며 scan rate는 100 mV/s 으로 하였다 (Kim et al., 2002).

## 라 전류측정 및 coulomb 계산

전압은 multimeter (Keithly Co. USA)를 이용하여 측정하였으며 data acquisition system (Testpoint, Capital Equipment Co. USA)을 이용하여 5분 간격으로 전기적 신호를 측정하고 data를 저장하였다. 측정된 전압은 옴의 법칙 (전압 = 전류 × 저항)에 의하여 전류로 환산되었다. 시료의 유기물 농도는 COD<sub>Cr</sub>을 이용하여 측정하였다. 또한 전하량 수율은 전류와 COD의 data를 이용하여 다음과 같은 식으로부터 구하였다.

$$\text{Coulomb yield} = \frac{\text{experimental coulomb}}{\text{theoretical coulomb}} \times 100$$

$$\text{Theoretical Coulomb} = \Delta\text{COD}_{\text{Cr}} (\text{ppm}) \times \text{working volume} \times \frac{12 \text{ coulomb}}{\text{mg COD}_{\text{Cr}}}$$

$$\begin{aligned} \text{Coulomb(C)} &= \text{Faraday constant}(9.6487 \times 10^4 \text{C/mol}) \times e^- \text{ mol} \\ & \quad 1 \text{ g COD or BOD의 } e^- \text{ mol} \\ & \quad = 1/32 \text{ mol} \times 4 e^-/\text{mol} = 0.125 \text{ mol } e^- \\ & \quad 1\text{g COD or BOD의 coulomb} \\ & \quad = 9.6487 \times 10^4 \times 0.125 \cong 12 \text{ C} \end{aligned}$$

## 3. 결과 및 고찰

### 가. 막 없는 미생물연료전지 운전

양이온교환막을 사용하지 않는 미생물 연료전지 운전을 위해서 필수적인 전기 화학 미생물을 농화 배양한 결과를 정리하면, 글루탐산과 포도당을 이용해서 300 ppm의 BOD농도를 갖는 인공폐수를 조제하여 이를 연료로 사용 하였으며, 하수처리장 혐기소화조 오니를 접종원으로 이용하여 농화배양 하였다. Open circuit 상태에서의 최대 potential은 약 0.8 V 정도였으며, 폐수는 연속적으로 공급하였다. 약 20 일이 경과하였을 때, current는 약 2.0 mA로 증가하였으며, 약 10 일 이상 일정한 값을 보였다. 이러한 결과는 양이온교환막을 사용하지 않고도 생물 연료 전지의 운전이 가능함을 나타내는 것이다 (그림 14). 또한 저항은 10, 50, 70, 100, 200, 500, 1000 Ω으로 변화시키면서 결과를 관찰하였다. 결과는 기대했던 것과 같이 높은 저항에서 current가 낮게 발생하였으며,



COD 제거량도 낮은 저항에서 더 많이 제거되는 것을 확인할 수 있었다 (그림 15).

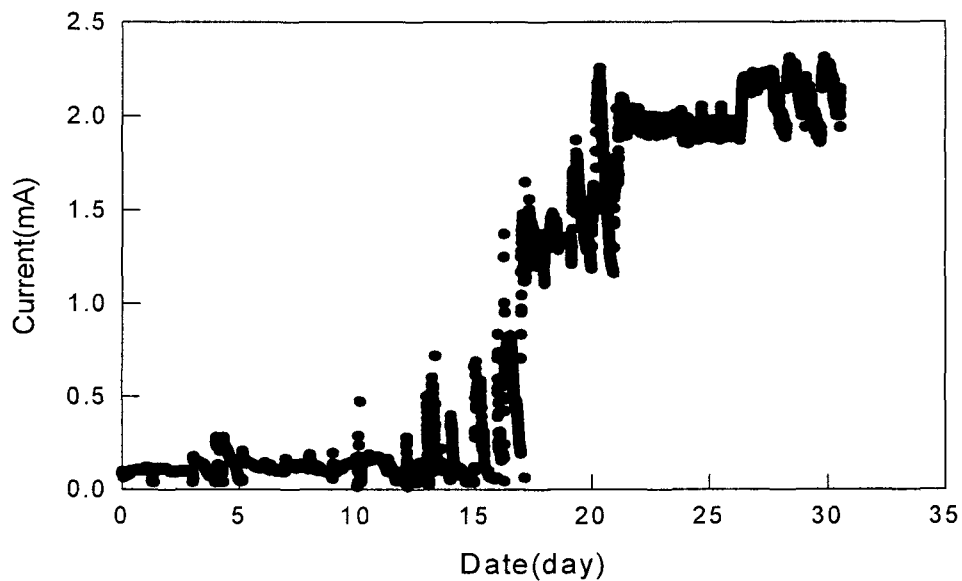


그림 14 ML-MFC를 이용한 농화배양

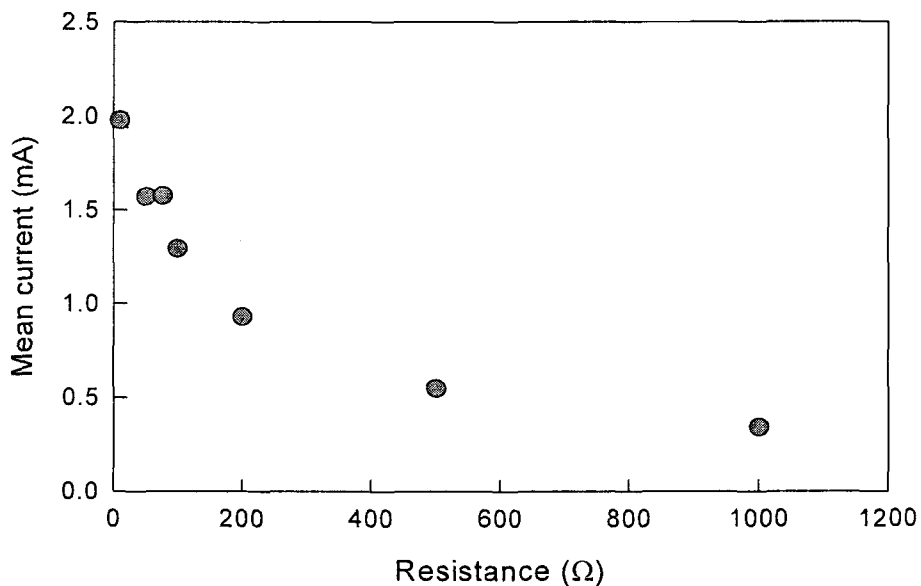


그림 15 ML-MFC에서 저항에 따른 current 발생

따라서 저항은 전류가 최대값을 보이는 10  $\Omega$ 으로 결정하였다. 이 이유는 이 조건에

서 미생물의 대사속도에 대하여 제한이 제일 적은 조건이기 때문이다. 하지만 다음 실험 들에서 보이는 polarization curve를 보게 된다면 power를 얻기 위한 미생물연료전지의 저항은 약 100-200 Ω이 최적 조건으로 나타났다. 폐수의 공급 속도는 0.28 ml/min, fuel의 농도는 300 ppm으로 하였다.

### 나. Aeration의 영향

인공폐수의 농도를 300 ppm으로 고정하고 양극부로 전달되는 산화제인 공기의 공급 속도를 변화시키면서 그 영향을 관찰하였다. 초기에 폐수의 공급속도를 0.28 ml/min으로 운전한 것은 미생물 고정화를 위한 것으로 이 속도는 403.2 ml/day로 반응기 용량 1.35 l를 기준으로 할 때 HRT가 3.35 day로 처리 용량이 매우 낮고, 또한 current도 약 2 mA로 낮은 상태였기 때문이다. 이 실험은 먼저 음극부에 공급하는 인공폐수의 농도를 300 ppm, 공급 속도는 1.83 ml/min로 증가시키면서 실시하였다. 그림 15와 16은 양극부의 aeration rate를 0, 20, 30, 60, 100, 150, 200 ml/min으로 변화시키면서 전류의 변화 (그림 15)와 steady state의 전류값 (그림 16)을 나타낸 것이다.

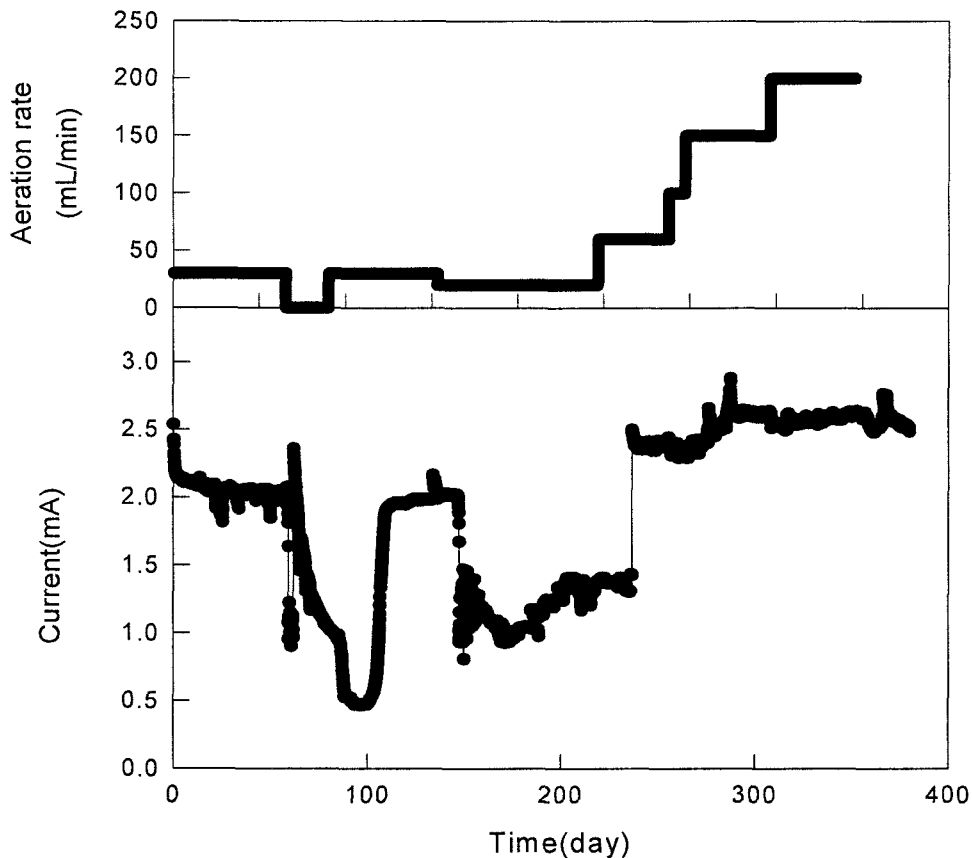


그림 15 Effect of aeration rate in the cathode compartment

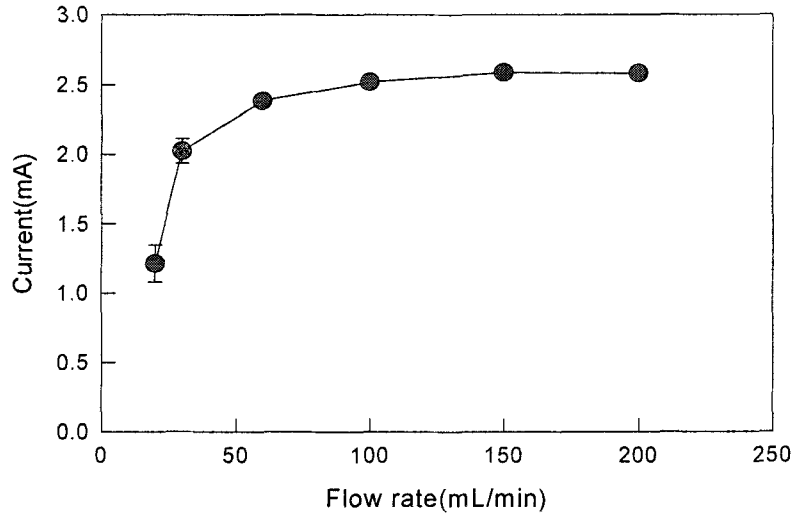


그림 16 Current vs aeration rate

이 실험결과 60 ml/min 이상 공급할 때 current 발생은 거의 일정하게 되는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 20 ml/min 이내로 공급 할 때는 이론적 약 40%에 불과한 current가 발생하는 것을 통해서 양극부내의 산소 공급 속도가 매우 중요한 factor임을 알 수 있었다. 그러나 양극부에서 aeration rate에 따라 COD 제거량이 달라는데, 150 ml/min으로 공급할 때는 92% 이상의 처리 효율을 보였다. 표 6은 폐수처리용 미생물연료전지 (ML-MFC-1)의 음극부를 통과한 처리 폐수의 COD 변화와 coulomb yield를 표시한 것이다. 최고 coulomb yield는 약 6%를 보였는데 이같이 낮은 coulomb는 폐수의 처리가 대부분 음극부를 거치고 양극부에서 호기적으로 처리된 것으로 판단된다.

표 6 ML-MFC-1에서 음극부를 통과한 처리 폐수의 COD 변화와 coulomb yield

Aeration rate (ml/min)	Cathode compartment				Glass bead & glass wool compartment			
	COD (mg/l)	ΔCOD (mg/l)	처리 효율 (%)	Coulomb Yield	COD (mg/l)	ΔCOD (mg/l)	처리 효율 (%)	Coulomb Yield
30	161.16	138.84	46.26	4.0	167.82	132.18	44.06	4.2
60	40	260	86.67	2.5	167.27	132.73	44.24	4.9
100	57.75	242.25	80.75	2.8	181.82	118.18	39.39	5.8
150	25.26	274.74	91.58	2.6	184.07	115.93	38.64	6.1
200	14.55	285.45	95.15	2.5	166.02	133.98	44.66	5.3

다. 폐수의 공급속도에 대한 영향

양극부에 공급되는 산소의 농도가 중요하다는 것은 이미 밝힌 바 있다. 본 연구는 먼저 제작한 폐수처리용 생물연료전지에서 양극부의 전극(graphite felt)의 특성을 파악 개선하기 위한 것이다. 예상한 바와 같이 양극부의 aeration과 유속이 중요한 factor임을 알 수 있었다. 표 7은 각 유속에서 폐수 처리 효율을 나타낸 것이다. 초기 폐수의 COD는 300 ppm이고 폐수의 유입속도는 1.83 ml/min이었다. 위의 결과에서 보이는 바와 같이 200 ml/min이었을 경우 약 95%의 COD제거율을 보였다. 하지만 coulomb yield가 2-6%로 매우 낮게 측정되었다. 이는 다시 aeration이 제한되지 않는다고 판단되는 조건 (200 ml/min)에서 폐수의 공급속도에 대한 영향을 관찰하였다 (표 7).

표 7 ML-MFC-1에서 폐수 공급 속도에 따른 COD removal

Feeding rate (ml/min)	Cathode compartment			Glass bead compartment		
	COD (mg/l)	ΔCOD (mg/l)	처리효율 (%)	COD (mg/l)	ΔCOD (mg/l)	처리효율 (%)
0.28	14.55	285.45	95.15	134.55	165.45	55.2
1.83	21.82	278.18	92.73	144	156	52
3.5	29.10	270.9	90.3	160	140	46.7

이 결과로 알 수 있는 것은 유기물이 음극부에서 분해 되는 것보다 양극부를 거치면서 산소에 의해서 유기물이 더 많이 소모되는 것을 알 수 있었다. 즉, 음극부에서 충분히 처리되지 않은 유기물이 양극부에서 오히려 호기성미생물에 의하여 유기물이 제거 되는 것으로 판단되었다. 그러나 이러한 현상은 오히려 미생물연료전지에서 양극부의 작용에 필요한 산소의 공급이 제한되는 결과를 초래할 수 있기 때문에 장시간 유지될 경우 전기화학활성미생물이 농화 배양되기 보다는 양극부에서 호기성 미생물이 성장할 수 있다. 또한 양극부에 제한되는 산소를 더 많이 공급하기 위하여 aeration을 높이게 되면 호기성 미생물이 고농도로 배양되어 floc이나 biofilm이 양극부 전극에 형성될 수 있다. 그러므로 폐수처리용 미생물연료전지로서 1차 제작된 ML-MFC가 효율적으로 운전되기 위해서는 음극부에서 유기물이 처리되고 양극부의 산소농도가 제한되지 않을 정도의 유기물이 다시 양극부에서 처리되는 것이 이상적이다. 하지만 폐수의 유기물 농도는 실제 상황에서 다양하게 변화될 수 있으므로 폐수의 유속을 변화시키는 것은 좋은 방법이 아니다. 한편 음극부에서 전기화학활성미생물을 포함한 일련의 미생물군의 활성 및 농도를 높여주는 것이 일차적으로 앞의 결과에서 나타난 낮은 coulomb yield를 극복할 수 있는 방법이다. 즉, 미생물의 농화배양이 유입되는 폐수를 처리할 수 있도록 되어야 한다. 하지만 농화배양을 빨리 하기 위해서 초기부터 고농도의 폐수를 유입하게 된다면 양극부에서 호기성 미생물에 의한 작용이 높아지고 악순환이 되풀이 될 수 있다. 그러므로 ML-MFC를 운전할 경우 초기 운전 과정에서 전기화학활성 미생물을 포함한 미생물연료전

지에 작용된다고 생각되는 미생물들의 농화배양이 잘 되도록 하는 것이 중요하다. 이와 같은 배경에서 다음 ML-MFC의 운전은 폐수의 농도를 100 ppm으로 감소시키고 동일한 유속으로 주입하면서 그 결과를 관찰하였다.

라. 폐수의 공급농도에 대한 영향

지금까지 ML-MFC의 운전 조건은 폐수의 농도를 300 ppm, 1.83 ml/min으로 그리고 양극부에 공급하는 공기는 200 ml/min으로 하였다. 그러나 이때의 발생되는 current는 폐수처리용 장치로써 미생물연료전지의 가능성을 제시한 NCBE type MFC와 비교 하였을 때, NCBE cell의 경우 anode의 working volume이 약 25 ml이고 MLMFC는 약 8 L이다. 두 cell에서 보이는 전류값 들은 약 수 mA이었고 두 MFC의 working volume이 약 100배 이상 차이가 나기 때문에 ML-MFC의 현재 운전상태는 비효율적임을 알 수 있다. 특히 폐수가 음극부에서 처리되지 않고 양극부로 유입될 경우 양극부의 산소가 호기성미생물에 의하여 빨리 소비되기 때문에 앞에서 제시한 악순환이 되풀이 될 수 있다. 그러므로 ML-MFC를 농화배양하고 전기화학활성 미생물을 포함한 미생물연료전지에 관여하는 미생물들을 build up하기 위해서는 먼저 주어진 환경 특히 음극부에서 미생물농도에 따라 양극부에서 유기물이 남지 않도록 조건을 설정해야 한다. 본 실험에서는 앞에서 300 ppm의 폐수 유입에서 발생한 문제점을 파악하기 위하여 먼저 폐수의 농도를 100 ppm으로 감소시키고 폐수의 공급 속도 1.83 ml/min으로 운전하면서 양극부에 공급하는 air의 속도를 200, 500, 800, 1500 ml/min으로 변화시키면서 발생하는 전류값을 관찰하였다 (그림 17). 그림 18은 각 aeration rate에서 전류값을 보여주고 있다.

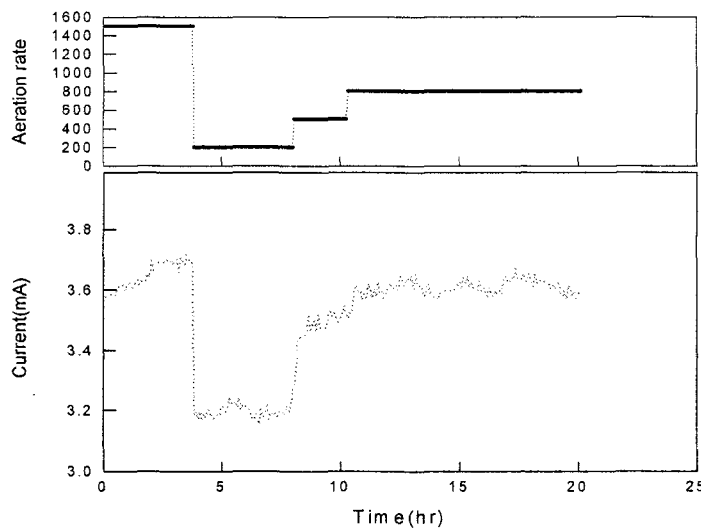


그림 17 폐수를 100 ppm으로 공급시 aeration의 영향

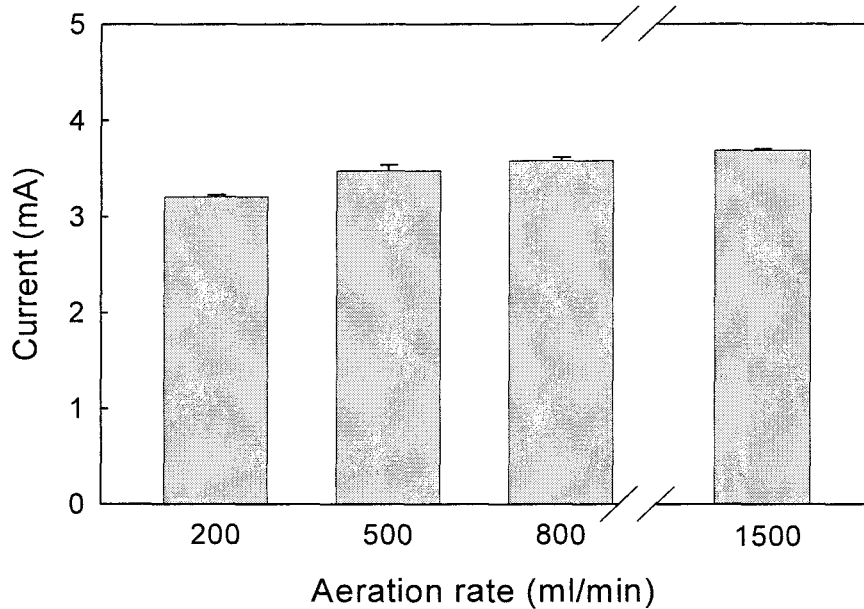


그림 18 100 ppm의 연료를 공급시 다른 aeration rate에서 전류값의 변화

표 10은 100 ppm과 300 ppm의 폐수 공급에 대한 각 결과들을 비교한 것이다.

표 10 100 ppm과 300 ppm으로 공급한 WT-MFMFC-1의 결과 비교

Fuel conc. (ppm)	Fuel supply rate (ml/min)	Aeration rate (ml/min)	Current (mA)	Effluent COD of glass wool (ppm)	Effluent COD of cathode (ppm)
300	1.83	200	2.60±0.02*	166.0	14.6
100	1.83	200	3.20±0.02	20.0	5.0

이 실험 결과를 300 ppm으로 운전할 때와 비교하여 더 높은 전류가 발생하였다. COD 결과는 연료의 농도를 300 ppm으로 운전 하였을 때 (glass bead에서 sampling) 166 ppm 정도있으며  $\Delta$ COD는 약 130 ppm 이었다. 이 결과는 100 ppm으로 운전한 것보다 더 많은 유기물이 분해 되지만 전기발생은 더 낮다는 것을 의미한다. 이는 미생물연료전지 로써 300 ppm의 폐수 공급 조건이 양극부 반응에 산소가 제한될 수 있도록 유기물이 충분히 음극부에서 처리되지 않았을 가능성을 시사한다. 즉, 음극부에서 유기물분해와 함께 발생한 전자와 수소이온의 소비에 제한이 되며 양극부의 반응을 높일 수 있는 개선책 이 MLMFC-1에서 필요함을 알 수 있다. 한편 100 ppm의 feeding rate를 변화하면서 다시 전류값과 COD제거율을 관찰하였다 (그림 19, 표 9). 이러한 실험은 주어진 조건에서 전

류값과 COD의 제거율이 일정하게 유지되는 것을 steady state로 관주하고 다른 조건으로 바꾸면서 다시 steady state data를 얻는 것으로 실험하였다.

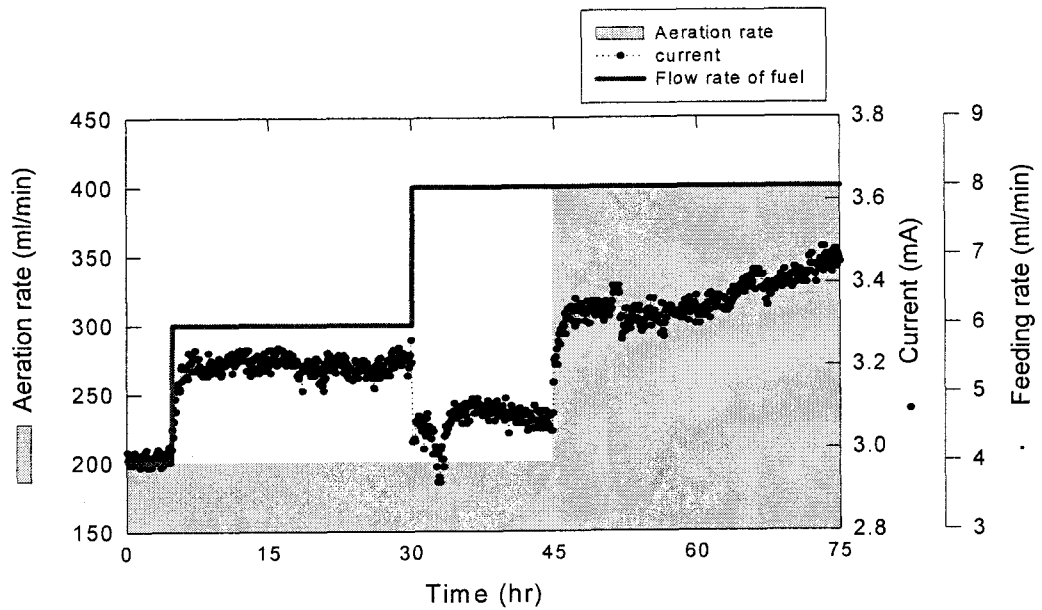


그림 19 100 ppm의 폐수 처리 시 유속의 영향

표 9 100 ppm의 폐수 공급 시 유속에 대한 전류와 COD 농도

Fuel supply rate (ml/min)	Aeration rate (ml/min)	Current (mA)	Effluent COD (ppm)
1.83	200	2.98±0.01	3
2.70	200	3.20±0.03	4
3.50	200	3.07±0.04	5
3.50	400	3.47±0.05	3

이 실험결과 current는 air 공급을 200 ml/min 으로 하는 상태에서 연료의 공급 속도를 1.83 ml/min에서 2.70 ml/min으로 증가시켰을 때 current는 2.98에서 3.20 mA로 증가되었다. 그러나 flow rate를 3.5 ml/min으로 증가시켰을 때는 오히려 3.07 mA로 감소하였다. 이때 양극부의 aeration rate를 400 ml/min 증가시켰을 때 다시 3.47 mA으로 증

가하였다. 그러므로 양극부에 aeration rate를 200 ml/min로 하면서 연료 feeding rate를 3.5 ml/min으로 증가시켰을 때 왜 전류값이 감소하는지에 대한 이유를 확인할 필요가 있었다. 이 이유로는 첫 째는 양극부에 공급하는 산소가 반응에 필요한 양보다 부족하여 유기적인 음극부와 양극부 반응에 영향을 미치는 것을 제시할 수 있다. 두 번째 가능성으로 증가된 유속이 미생물연료전지의 전극에 고정화되어 있는 미생물들에 물리적인 충격을 줄 수 있을 것으로 생각된다. 이러한 물리적인 충격은 전극에 고정화되어 있는 미생물을 전극에서 탈리시킬 수 있다. 미생물연료전지에서 농화 배양 된 전극 표면의 SEM 사진을 찍은 결과에서 bacterial clump와 전극에 고정되어 있는 두 가지 형태학적으로 다른 미생물군이 있다는 결과를 알고 있다. 이것들은 아마도 fermentation균주와 electrochemically active microbes로 구분하며, clump로 존재하는 것은 fermentation균주로, 그리고 electrode에 film을 형성하고 있는 균주는 electrochemically active microbes일 것으로 추정하고 있다. 그러나 일부의 실험에서 biofilm reactor에서는 항상 suspended cells과 attached cells사이에는 nutrient에 대한 competition이 존재하며, diffusion limitation 때문에 attached cell이 suspended cell보다 더 낮은 농도의 기질에서 운전된다. 그러므로 biofilm은 suspended cells 때문에 'wash out' condition에서 운전해야 한다고 하였다. 본 실험에서는 suspended cell과 attached cells의 하는 역할이 다르기는 하지만 이러한 점을 고려할 때, 일시적으로는 suspended cell (fermentative bacteria)들이 유출되는 등의 문제가 있어 current가 감소하지만 장시간 운전한다면 연료전지내의 미생물생태계가 새롭게 안정화 되면서 current가 상승할 것으로 생각된다.

#### 마 음극부와 양극부 사이의 거리에 대한 영향

음극부와 양극부사이의 거리에 대한 영향으로 음극부에서 발생된 electron이 폐수와 함께 양극부로 전달되지 않도록 내부 저항을 external 저항보다 크게 해야 한다. 음극부와 양극부 사이에 glass bead와 glass wool을 음극부의 electrode를 고정하기 위해서 10 cm높이로 충전하고 양극부의 electrode가 충전된 사이에 처리과정 중인 폐수 (음극부를 거쳐 나온 폐수)로 40 cm의 높이로 채웠다. 그리고 이때 내부에 걸리는 저항은 약 4 MΩ으로 electron이 충분히 흐를 수 없도록 하였다. 그러나 이와 같이 음극부와 양극부의 사이의 길이를 크게 하는 것은 electron의 transfer는 제어할 수 있었으나 proton을 음극부에서 양극부로 전달하는 과정에 charge transfer rate에 limitation이 커져 voltage drop 현상이 발생하는 것으로 판단된다. 따라서 음극부와 양극부 사이를 40에서 10 cm로 단축한 결과 current가 상승하는 것을 확인할 수 있었다 (그림 20). 이때 current는 2.0 mA에서 3.0 mA까지 상승하였다. 즉, 이것은 음극부에서 생성된 proton의 전달에 limitation되어 있었음을 알 수 있었다.



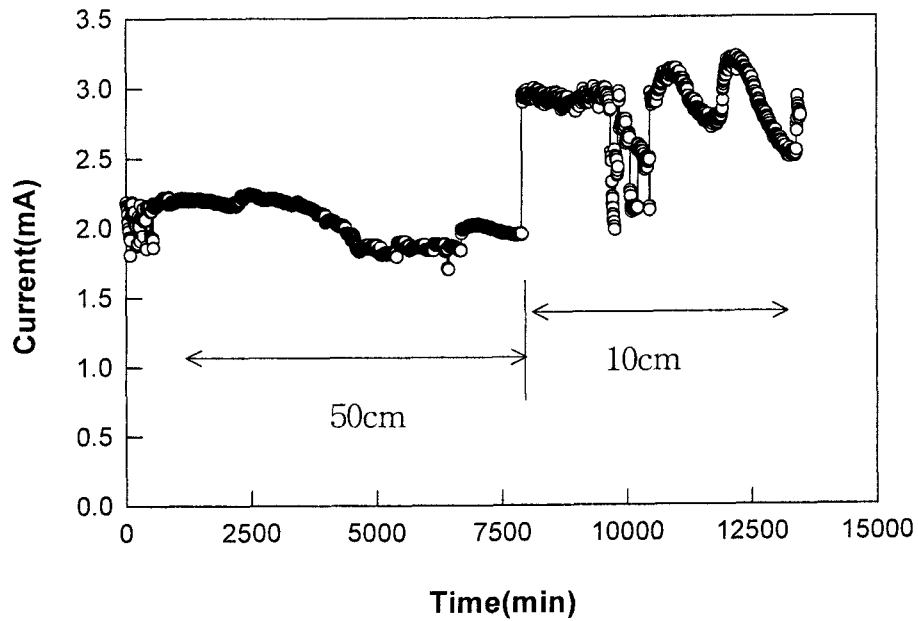


그림 20 Effect on distance between anode and cathode compartment

#### 바 폐수 처리용 미생물연료전지의 특성

폐수처리용 미생물연료전지의 첫 번째 시작품으로 제작하고 운전하였던 ML-MFC-1의 연료전지로서 특성을 파악하기 위하여 polarization curve를 작성하였다. Polarization curve는 연료전지로서 반응속도에 영향을 미칠 수 있는 특성을 파악하기 위하여 기본적으로 제시하는 것이다 (그림 21)

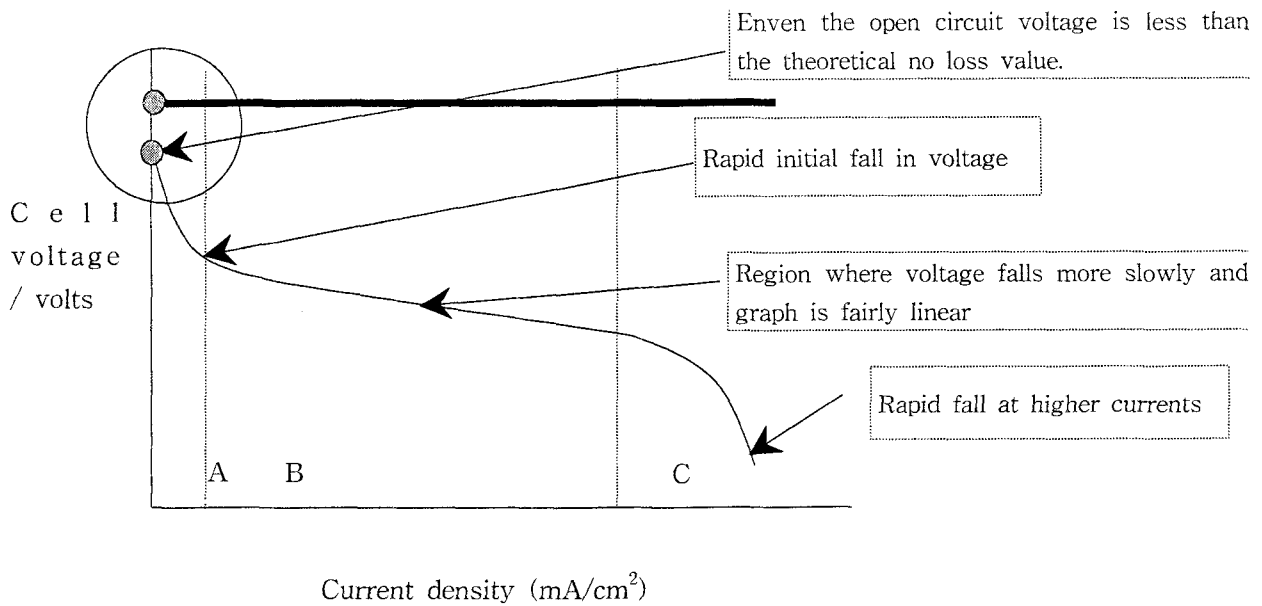


그림 21 Polarization curve in fuel cell

A : by Activation loss

(microbes로부터 electron을 electrode로 전달할 때 필요한 activation 에너지에 의한 loss)

B : by Charge transfer rate limitation

(electron 과 proton ion의 transfer rate에 의한 loss)

C : by Mass transfer rate limitation

(공급하는 fuel의 농도변화에 따른 영향)

그림 22는 양극부와 음극부의 거리가 멀어질수록 current generation도 낮아 졌으며, 이에 따른 power density로 낮음을 알 수 있었다. 이러한 결과는 거리가 멀어지면서 proton의 이동이 어려워지는 것에 있는 것으로 판단된다. 일반적으로 electrolyte는 음극부에서 생성되는 수소이온 ( $H^+$ )을 electrode로 이동시키고 이를 다시 양극부로 이동시키는 역할을 한다. 그렇지만 음극부에 존재하는 electrolyte의 농도가 어느 정도까지 증가할 때는 수소이온의 이동이 빨라지게 되고 current generation이 증가한다. 그러나 농도가 너무 높아지면 ion끼리의 반발력 등에 의하여 current는 감소한다. 따라서 electrolyte의 농도는 매우 중요한 역할을 한다고 할 수 있다. 본 실험에서는 pH control을 위하여 첨가시키는 buffer solution과 membrane이 electrolyte로 작용한다고 할 수 있다. 그리고 아래 그림을 통하여 우리 실험이 전력생산을 목적으로 할 것인지 또는 COD 유발 물질 제거를 목적으로 할 것인지에 따라서 운전 저항이 달라질 것임을 알

수 있다 즉, 전력생산을 위해서는 최대 전력을 생산하는 200 Ω에서 운전해야 하며, 이 범위는 charge transfer rate limitation 영역이다. 그리고 COD 유발물질 제거를 위해서는 10 Ω에서 운전하는 것이 적합할 것으로 생각된다.

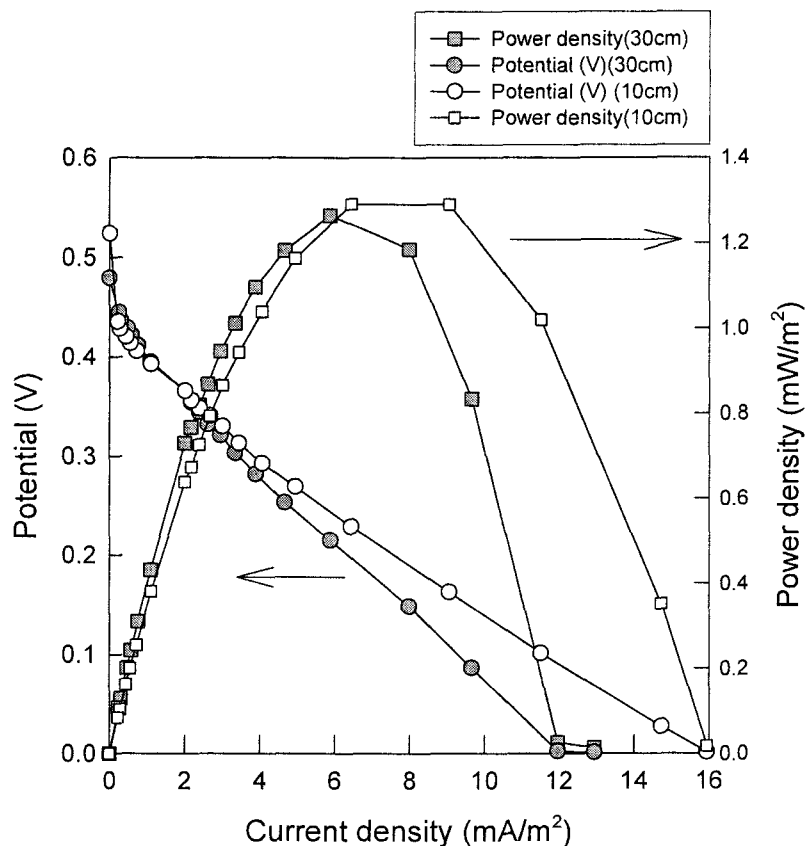


그림 22 Polarization curve of the ML-MFC operated with the distance between the anode and cathode of 10 cm (open symbols) and 30 cm (closed symbols)

사. Cyclic voltamogram

미생물로부터 전자가 전극으로 이동할 때 수용성의 매개체가 작용하는 지를 알아보기 위하여 음극부 전극 시료를 cyclic voltamogram으로 측정하였다. 이 결과는 CV test 를 이용하여 electrochemical activity가 있는 어떤 물질이 있는지를 확인한 것이다. 이 실험을 위한 sample은 다음과 같이 제조하였다.

혐기적 조건의 serum vial (50 ml)



ML-MFC-1의 anode compartment로부터 syringe를 이용하여 채수



이를 0.2  $\mu\text{m}$  filter를 이용하여 미생물을 제거한 후 sample로 사용하였다

그림 23은 시료의 CV결과를 보여주고 있으며 전기활성미생물을 제외한 상태에서 전기화학 활성이 있는 물질이 있는지를 확인한 결과 electron transfer가 일어나고 있지는 않음을 알 수 있다. 따라서 음극부에서 전자가 전극으로 이동할 때 수용성의 매개체가 작용하지 않는다는 것으로 확인하였다.

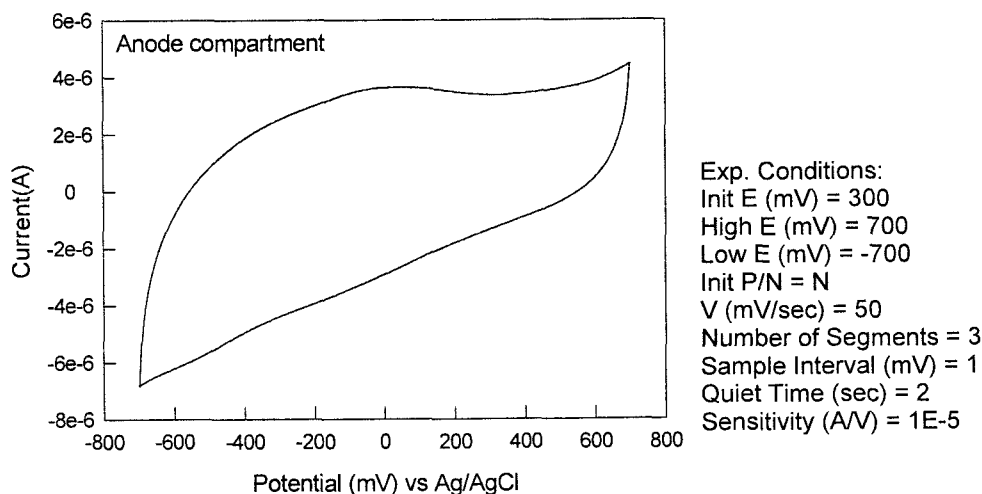


그림 23 미생물연료전지 음극부 시료의 cyclic voltammogram

#### 아. Cathode reaction의 제한 인자

양극부 반응을 결정하는 요소인 산소가 양극부 반응에 제한요소로 작용하는지를 확인하기 위하여 양극부로 공급되는 펌프를 이용하여 공기의 공급 속도를 20, 60, 200 ml/min의 속도로 변화시키면서 그 결과를 확인한 결과 60 ml/min 이상 증가시켰을 때 서로 유사한 2.0 mA 정도의 current 발생을 보였으며, 그 보다 낮은 공급 속도에서는 current 발생이 감소하는 것을 확인하였다. 따라서 공기에 의해 제한되지 않도록 optimum flow rate를 100 ml/min로 결정하고 공급하였다. 또한 음극부의 인공폐수의 유입속도나 농도가 변화된다면 양극부에 공급하는 산소 농도도 또한 변할 것이라는 것을 알 수 있었다. 즉 산소의 요구량은 음극부에 공급되는 인공폐수의 농도에 의존할 것이며, 공기공급이 제한되면 양극부 반응이 원활하지 않게 되고 이것은 음극부에서 양극부로 전달되는 수소이온과 전자의 소비가 원활하지 않게 된다는 것을 뜻한다. 이때 수소

이온이 음극부에 누적된다는 것은 산성의 조건이 된다. pH는 미생물 활성화에 영향을 미치는 중요한 인자 중의 하나인데, 음극부가 acidic하게 된다는 것은 미생물 ecology에 영향을 미치게 되는 것을 의미한다. 결국은 음극부와 양극부의 반응은 유기적으로 서로에게 영향을 미칠 수 있는 관계로 반응이 원활히 이루어지지 않을 때는 current 발생 및 effluent COD가 증가하는 등 영향을 미친다 (그림 24, 그림 25).

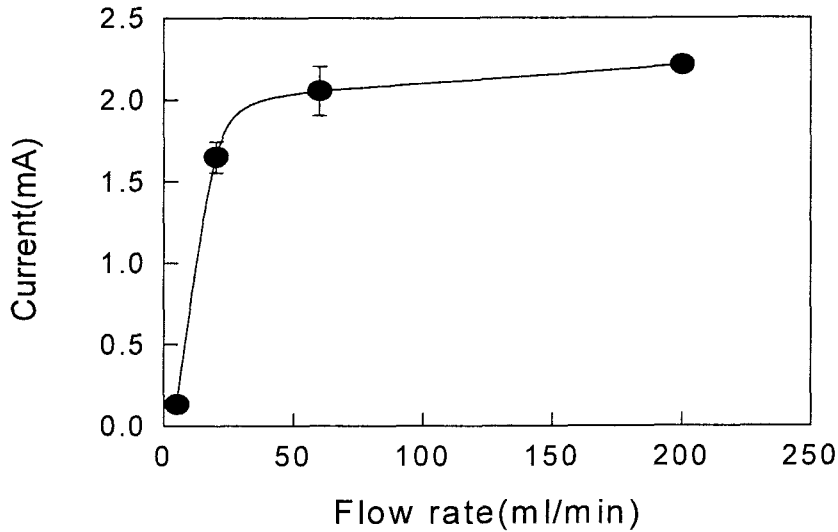


그림 24 Effect of aeration rate to the cathode compartment on the current generation

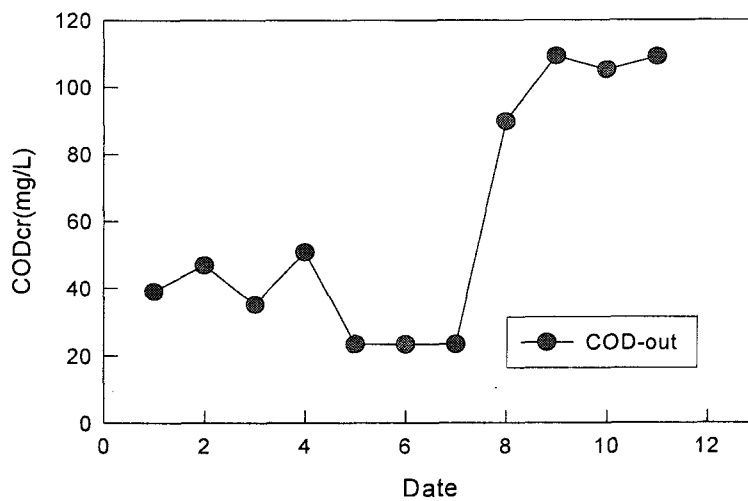


그림 25 Change of COD concentration of effluent

표 10 Effect of aeration rate to the cathode compartment on the performance of MFC

Cathode aeration rate (ml/min)	Mean current (mA)	Effluent COD (mg/l)	
		Top part of anode	Cathode compartment
20	1.21±0.15	171.8±7.3	175.2±8.6
30	1.99±0.04	172.3±8.2	161.2±7.4
60	2.37±0.03	177.7±9.1	57.8±5.4
100	2.52±0.03	177.3±9.8	40±5.1
150	2.59±0.05	176.8±9.5	25.3±5.2
200	2.60±0.02	176.0±8.7	14.6±4.3

자. Cathode로 백금 coated graphite의 사용

선행연구에서 양극부 전극으로 사용하는 graphite를 백금으로 coating하면 임계산 소농도를 6.6 mg/l에서 2.0 mg/l로 낮출 수 있다는 결과를 얻었다. 그러므로 본 실험에서도 양극부의 전극을 백금으로 처리하고 그 효과를 관찰하였다. 이때 electrode 양면에 loading된 평균 백금의 양은 각각 0.2818 Pt mg/cm<sup>2</sup>, 0.2845 Pt mg/cm<sup>2</sup>으로 하였다. 이와 같이 coating된 electrode 2개를 겹쳐 움직이지 않도록 고정한 실험하였다. 이때 current 발생은 백금을 사용하기 전과 비교하여 약 50% 이상 current가 증가하였다 (그림 26).

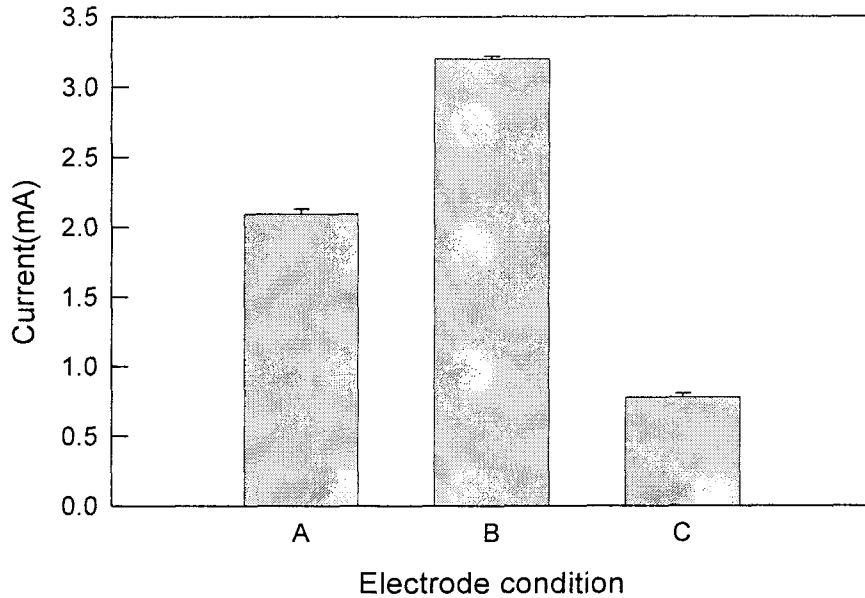


그림 26 Effect of Pt-coated electrode on the current generation  
 A: Graphite, surface area ( $465 \text{ cm}^2$ )  
 B: Pt-coated graphite, surface area ( $89 \text{ cm}^2$ )  
 C: Graphite, surface area ( $89 \text{ cm}^2$ )

#### 차. NaCl과 acidification의 영향

음극부에 연료로 인공폐수 (100 ppm)를 1.83 ml/min으로 공급하고, 양극부의 공기는 200 ml/min으로 공급하면서 양극부에 1 M NaCl 용액을 공급하였다. 이 실험은 음극부와 양극부 사이에 전해질액의 농도를 높이기 위한 실험이다. NaCl의 영향을 관찰하기 위하여 150 ml 공급한 경우와 연속적으로 공급할 때 변화를 관찰하였다. 그 결과 그림 27에 나타낸 것과 같이 1 M NaCl 용액을 batch type으로 첨가했을 때 current는 약 3.5 mA에서 4.7 mA까지 증가하였으며, 연속으로 공급했을 때는 7.7 mA까지 증가하였다. NaCl 용액은 charged particle의 mass transfer를 증진시키기 위하여 주로 이용되는 electrolyte이다. 따라서 연료전지의 performance가 NaCl을 첨가 후 proton의 이용도가 증가하는 것으로 생각된다.

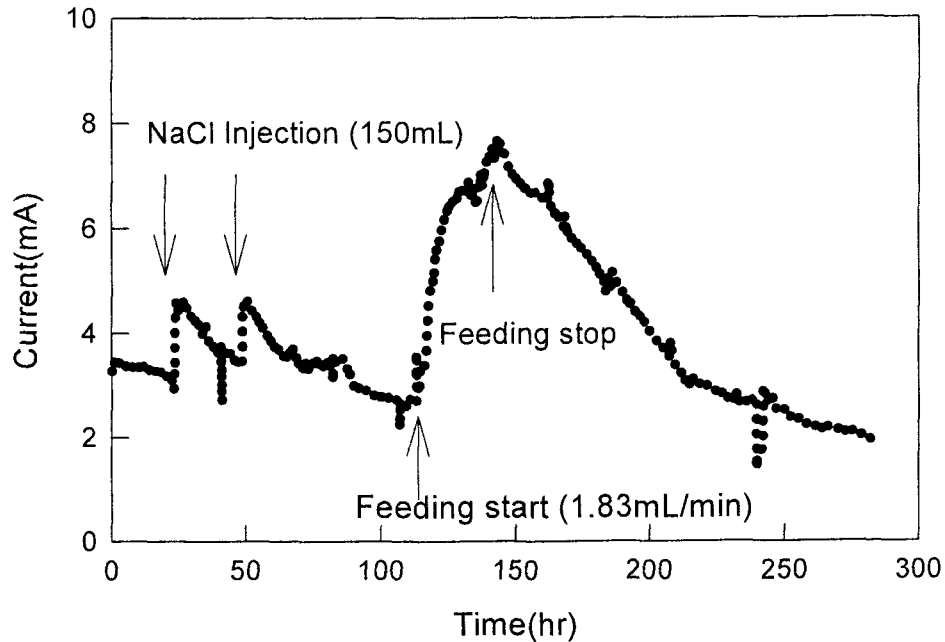


그림 27. Current generation with NaCl addition to the cathode as electrolyte

앞의 실험에서 NaCl을 공급함에 따라 current발생이 증가하는 것으로 양극부 반응에 proton의 이동이 제한된다는 것을 알 수 있었다. 이 실험은 양극부에 일시적으로 수소이온 농도를 증가시키고 제한효과를 확인하고자 0.5 N HCl을 양극부에 첨가한 후 current 발생을 monitoring하였다. NaCl을 첨가하여 current가 7.7 mA까지 증가하는 것을 확인한 후 HCl 용액 (0.5 N)을 첨가하였다. 이때 50 ml 첨가하였을 때는 11.5 mA까지, 그리고 100 ml를 첨가하였을 때는 13.5 mA까지 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과는 명백하게 ML-MFC의 양극부 반응에서 proton이 제한된 상태임을 확인한 것이다 (그림 28)



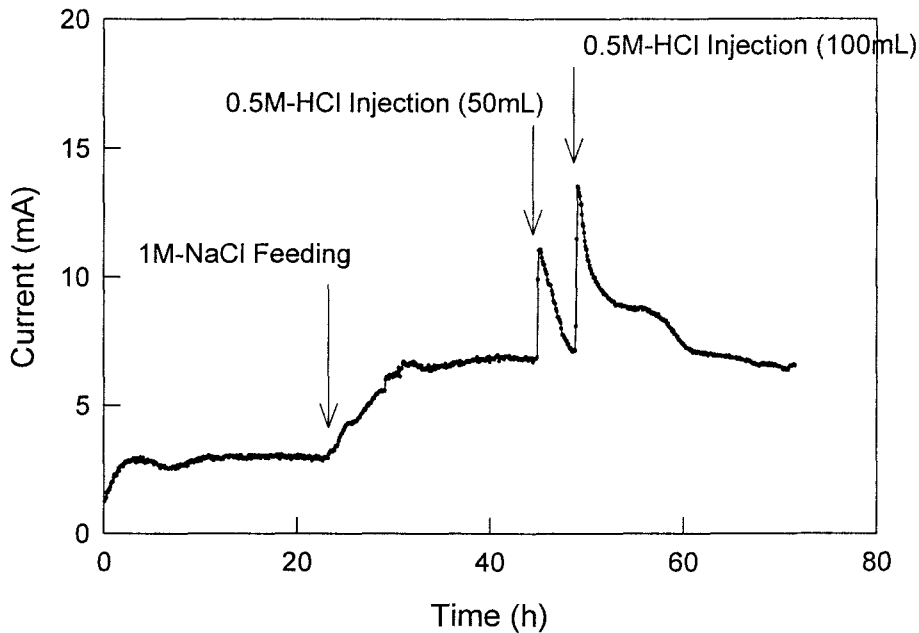


그림 28 Cathode acidification and current generation

#### 카. 미생물연료전지 구조 개선

앞에서 얻은 결과들로부터 미생물연료전지를 바탕으로 보다 효과적인 폐수처리용 미생물연료전지를 만들기 위하여 구조적 변화를 모색하였다. 우선 양이온교환막을 제거한 조건은 동일하게 하였다. 이 구조적 개선책에서는 먼저 음극부에 channeling 효과를 최소화하기 위하여 전극을 여러 모양으로 변화하여 충전하고 고정화 미생물의 density를 증진시키는 것으로 고안하였다. 앞에서 제시한 폐수처리용 생물연료전지인 ML-MFC-1을 운전할 때 발생하는 current가 sensor type과 비교하여 surface area를 증대 시켰음에도 불구하고 도리어 더 낮은 결과를 나타내었다. 또한 power density를 비교하더라도 그 값은 약 300배정도가 더 낮은 electricity generation을 보였다. 이러한 이유는 음극부의 전극이 전기활성미생물 및 발효미생물의 담체의 역할을 하는데 이때 미생물이 충전 전극의 면적을 충분히 이용하지 못하고 있는 것으로 생각된다. 이것은 내부에 channeling 현상이 존재, 생성된 channel로만 폐수가 음극부를 통과하게 되어 체류시간이 단축되고 폐수가 미생물과 충분히 반응하지 못한다는 것을 뜻한다. 더군나 완전히 처리되지 못한 상태의 유기물이 양극부로 전달되는데 유기물을 소비하기 위하여 호기성 미생물이 산소를 사용하게 된다. 그러나 미처리된 유기물의 농도가 높지 않다면 산소에 의한 산화반응에 의해 재처리 효과가 있으나, 유기물의 농도가 높다면 산소에 대한 친화력이 높은 호기성 세균이 유기물을 산화하는데 산소를 많이 소모하게 되므로 실제 전류발생을 위한 양극반

응에 이용되는 산소는 부족하게 되는 현상이 일어 날 수 있다. 또한 channeling 현상과는 달리 sensor type에서와 같이 전체 전극에서 일부분만이 이용되고 있을 수도 있을 것이라 생각된다. 즉, Sensor type에서 같이 membrane과 접촉한 면에서 보다 많은 microbes가 존재하는 것을 오랜 시간 운전한 연료전지를 해체했을 때 확인할 수 있었다. 이렇게 확연히 차이가 나는 것이 양극부로부터 transfer된 산소에 의해 호기성미생물이 존재할 수 있다는 것을 감안하더라도 다른 쪽의 electrode와 비교할 때 상대적으로 보이는 것으로도 그럴 수 있음을 추측할 수 있다. 따라서 실제로 반응기 (anode)의 하단에는 glucose를 에너지원으로 이용하는 fermentation microbes가 서식하고 fermentation microbes에 의해 생성되는 유기산을 이용하는 electrochemically active microbes가 상단에 주로 존재할 것이라 추측할 수 있다. 따라서 이러한 점을 고려하여 current density를 증대시킬 수 있는 형태로 ML-MFC의 구조를 개선하였다. 외형적으로는 육면체, 원통형으로 크게 구분되며 각각에 대해서는 아래에 자세히 설명하였다.

#### (1) 원통형 ML-MFC

원통형은 운전하고 있던 ML-MFC와 비교하여 외형은 크게 변화시키지 않으면서 크기와 폐수의 유입 방법에 차이가 있으며, 또한 음극부에 충전하는 electrode의 모양을 다양하게 변화시켰다.

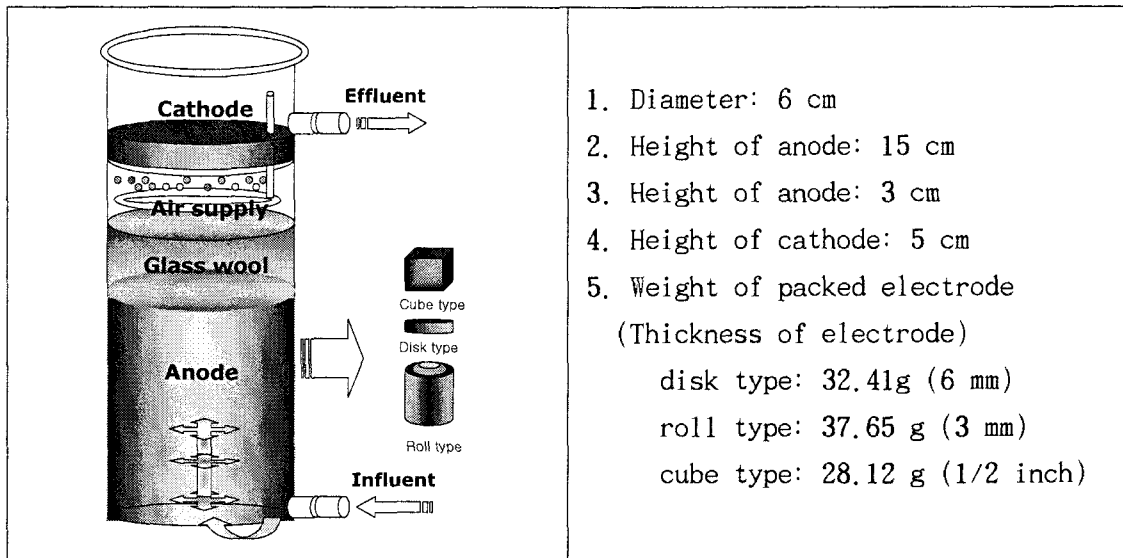
##### 1) Channeling 현상을 제어하기 위하여 wastewater를 분산 유입

이것은 폐수를 공급 할 때 연료전지 내부의 한 port를 통하여 유입되는 것이 아니고 그림에서와 같이 한 개의 port로 유입된 후 음극부 전극 내부에서 여러 개의 출구로 분산 공급되도록 modify한 것이다. 연료전지 내부의 ecosystem을 고려해볼 때, 여러 지점으로 fuel을 분산 공급시키면 fermentation microbes와 electrochemically active microbes의 community에 있어 전체 면적에 고른 population을 이룰 수 있을 것이라고 생각된다.

##### 2) Electrode의 shape을 disk type, roll type, regular square (cube) type으로 변화시켰다.

이때 전극간의 저항이 커져 electron의 전달이 용이 하지 않을 수 있으므로 이를 확인하였다 (dry 상태에서 저항은 disk type은 1.6 ohm; roll type은 1.1 ohm; cube type: 2.6 ohm이었으며, 내부에 물(tap water)로 채워져 있는 상태에서는 내부저항이 약 2 MΩ정도였다.

3) 양극부의 전극에는 Pt-coated graphite를 사용하였다.

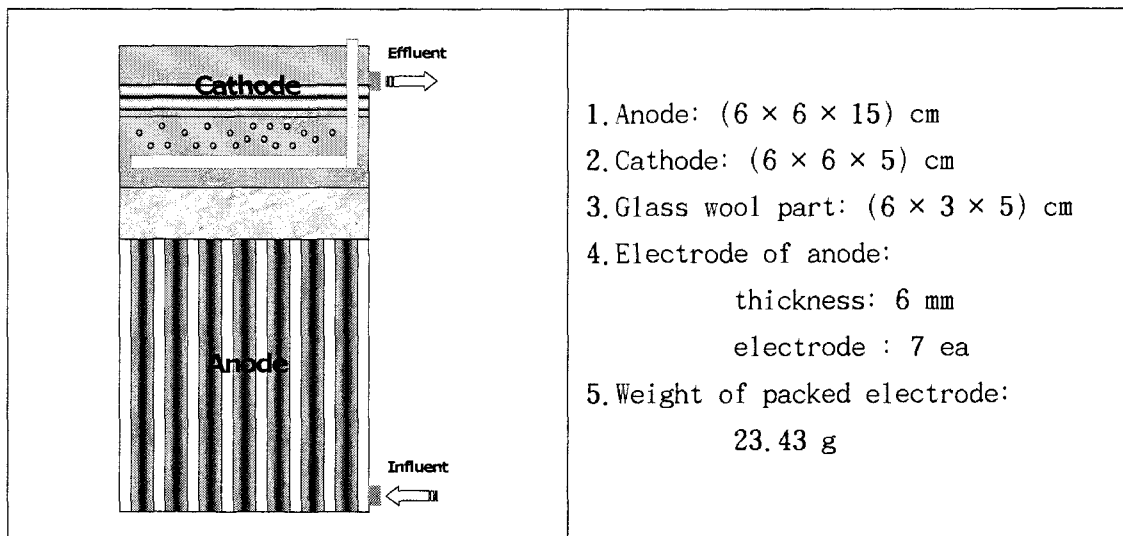


1. Diameter: 6 cm
2. Height of anode: 15 cm
3. Height of anode: 3 cm
4. Height of cathode: 5 cm
5. Weight of packed electrode  
(Thickness of electrode)  
 disk type: 32.41g (6 mm)  
 roll type: 37.65 g (3 mm)  
 cube type: 28.12 g (1/2 inch)

그림 29 New ML-MFC (cylinder type)

충진한 전극의 모양을 여러 개로 하여 충전하였다. 각각의 shape에 따라 전극의 surface 증대효과와 channeling 현상의 여부를 확인하고자 개선한 것이다.

(2) 사각형 ML-MFC



1. Anode: (6 × 6 × 15) cm
2. Cathode: (6 × 6 × 5) cm
3. Glass wool part: (6 × 3 × 5) cm
4. Electrode of anode:  
 thickness: 6 mm  
 electrode : 7 ea
5. Weight of packed electrode:  
 23.43 g

그림 30 New ML-MFC (square type)

사각형태의 전극을 음극부 부분에 3 mm 간격을 두고 세워서 끼워 놓은 형태이다. 이 연료전지형태는 channeling을 방지할 것과 전극이 띠어 있어 전극의 양면을 모두 이용할 수 있어 보다 효율적으로 전극을 이용할 수 있을 것이라 생각한 연료전지로서 단면적 증가 효과는 고정화 미생물을 증가시키는 것과 관련되므로 그 효과를 기대할 수 있겠다. 그림 31은 새로운 폐수처리용 미생물 연료전지를 연결한 구성도이다.

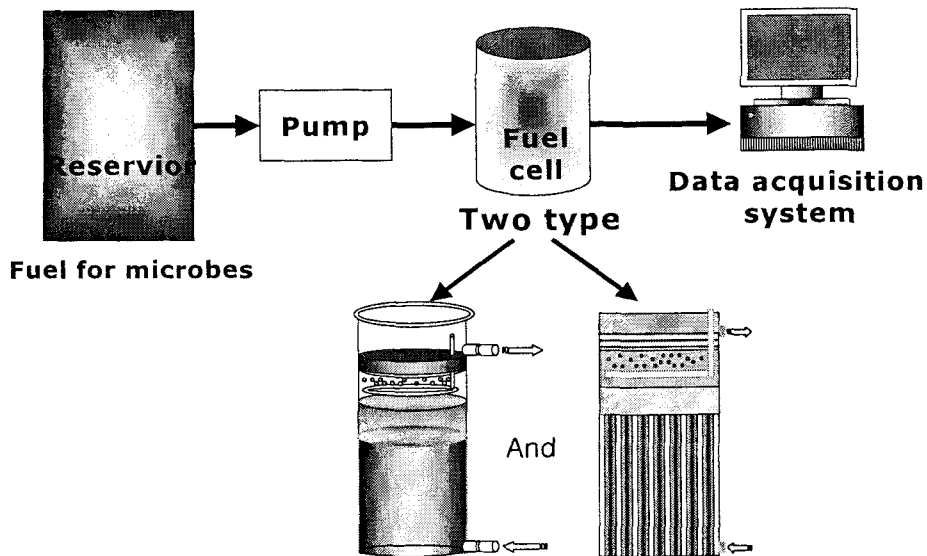


그림 31 Schematic of representation of process

#### 타. 개선한 미생물연료전지 운전

운전한 기간이 round type의 경우는 약 한달, square type이 2주가 경과된 상태에서 square type의 경우는 현재 완전히 enrichment가 완전하지 않은 상태로 판단된다. 이것은 통상적으로 enrichment는 약 3주 정도가 소요되었던 이전 실험 결과로부터 유추할 수 있다. 현재 current는 1.5 mA정도가 발생되고 있다. Round type의 경우는 음극부에 충전한 전극의 모양을 바꿔 surface area, channeling 방지 등을 목적으로 다른 모양으로 충전 하였으나 그 차이는 현재 보이지 않고 있다. 또한 effluent의 COD가 높은 것은 이전 reactor와 비교하여 양극부 용량의 차이로 인하여 머무름 시간이 짧아져 호기적으로 산화되는 정도가 감소한 것이 원인중의 하나로 보인다. 또한 양극부에 공급하는 산소의 압력에 의해 electrode와 up flow 되어 올라오고 있는 액이 공기 bubble에 의해 접촉 면적이 충분히 용액에 잠겨있는 것이 아니라 공기 bubble이 닿아서 두 계면을 연결하고

있는 상태로써 양극부 반응에 필요한 proton과 electron의 흐름에 barrier가 될 것으로 생각된다. 그림 32는 각 조건에서 농화배양 단계에서 발생하는 current변화를 나타낸 것이다.

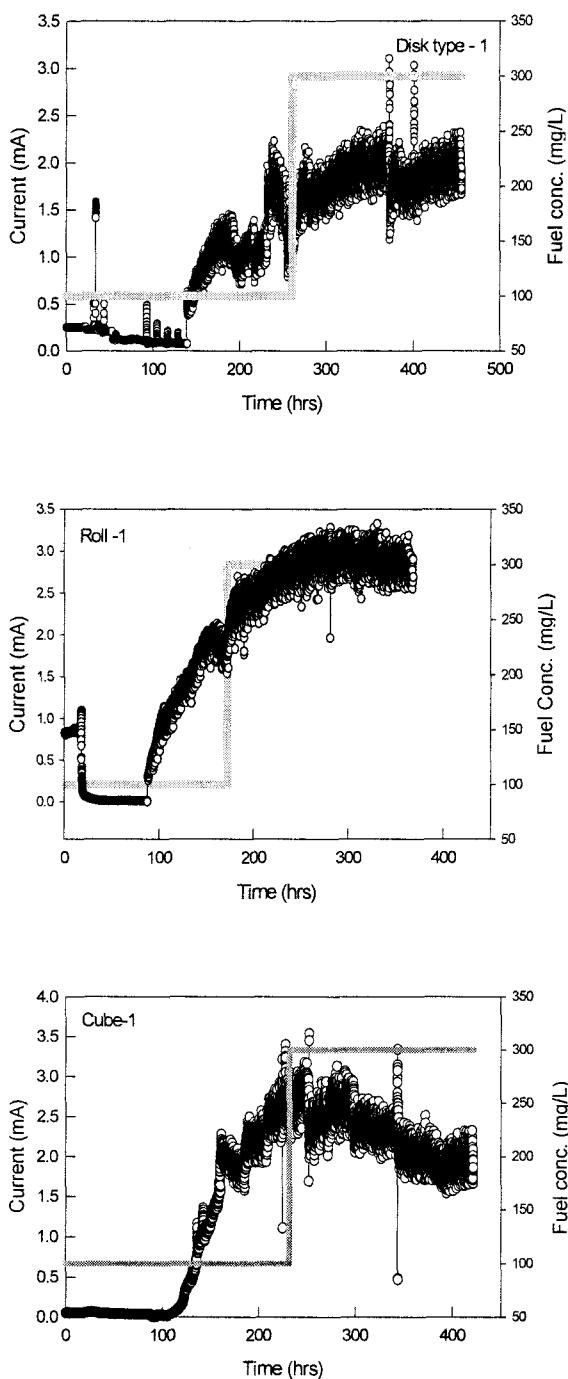


그림 32 새로운 폐수처리용 미생물 연료전지의 농화배양

그림 33과 34는 충전 electrode 모양에 따라 voltage vs current density와 power

density vs current density의 관계를 나타낸 그림이다. 이때 발생하는 current는 disk, roll, cube순으로 각각 약 2.8, 2.9 그리고 2.1 mA 정도였다. Polarization curve 작성을 위해 저항은 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 700, 900  $\Omega$ , 1 k $\Omega$ , 2 k $\Omega$ , 3 k $\Omega$ , 5 k $\Omega$ , 8 k $\Omega$ , 10 k $\Omega$ 과 open circuit에서 측정된 것으로 결과는 cube type의 ML-MFC-2의 경우는 power density, current density 및 volt가 모두 매우 낮았다. Current density의 경우, 낮은 저항에서는 세 type이 다른 것을 확인할 수 있었는데, 200  $\Omega$  이하에서는 disk type이 가장 좋은 current 발생과 power density값이 발생하는 것을 확인할 수 있었다. Power density는 세 종류 모두 300  $\Omega$ 에서 최대값을 나타냈다. 세 type중에서 가장 낮은 값을 나타낸 cube-ML-MFC의 경우는 다른 것과 비교하여 current가 보다 낮을 때 운전한 것이 원인이 된 것 같다. 표 11은 각 폐수처리용 미생물 연료전지의 COD제거율과 coulomb yield를 종합하여 표시한 것이다. 이 결과에서 MLMFC-1가 약 6%의 coulomb yield를 보인 것에 비하여 약 5-6 배이상 증가된 것을 알 수 있었다. 즉, MLMFC-2에서는 유기물 분해에서 발생하는 전자의 약 50% 정도가 전기로 회수된다는 것을 의미한다.

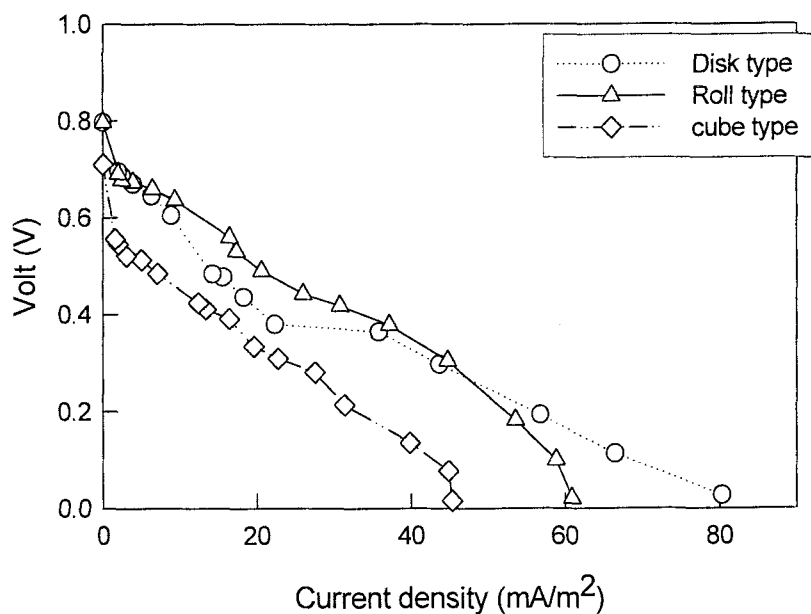


그림 33. Current density vs Voltage of ML-MFC-2

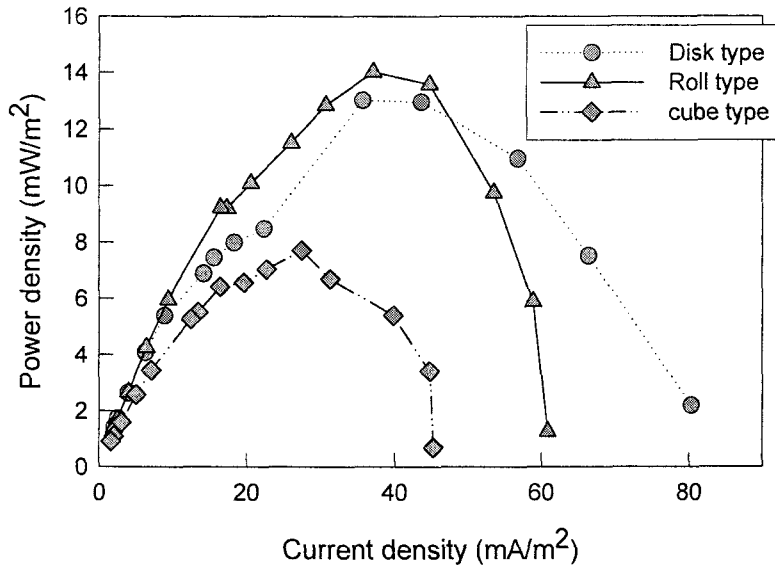


그림 34. Current density vs Voltage of ML-MFC-2

표 11 Fuel농도별 COD 제거 및 coulomb yield(%)

Anode electrode type	Anode vol. (l)	100 ppm wastewater		200 ppm wastewater				300 ppm wastewater			
		Effluent COD (ppm)	Capacity (g/ton/day)	Effluent COD (ppm)	Capacity (g/ton/day)	Current (mA)	Coulomb yield (%)	Effluent COD (ppm)	Capacity (g/ton/day)	Coulomb yield (%)	
Round type	Disk type	0.26	20	88.62	15.76	204.08	3.50±0.17	45.18 ~ 49.80	34.29	294.32	33
	Roll type	0.25	22.5	89.28	13.33	206.77	2.70±0.11	34.67 ~ 37.62	31.44	309.38	27.9
	Cube type	0.28	22.5	79.71	19.39	200.06	3.16±0.13	41.91 ~ 45.50	41.63	265.75	19.3

위의 결과로부터 폐수를 200 ppm으로 유입 시 effluent의 COD 농도는 20 ppm 이내로 90% 이상의 제거효율을 보였다. 하지만 처리수의 COD는 방류수기준으로 특별대책지역(한강수계 중 환경정책기본법 제 22조의 규정에 의하여 수질보전을 위하여 지정된 특별대책지역) 및 잠실수중보권역(팔당댐과 잠심수중보 사이의 하천(지천포함))에 허용농도

(COD 기준은 40 ppm이내, BOD 기준은 10 ppm) 보다 낮았다. 따라서 현재 effluent 농도는 기준 이내로 처리될 수 있음을 알 수 있다. 하지만 현재 처리속도가 느리기 때문에 HRT를 증가시켰을 때도 허용 기준 이하의 유출수를 얻을 수 있는지를 확인해야 한다. 더불어 coulomb yield를 높이는 연구가 필요하다. 즉, 폐수의 처리와 함께 전기를 발생효율을 극대화하여야 슬러지 감량효과를 기대할 있기 때문이다. 현재 운전 중인 조건에서 HRT는 1.56-1.67 day로 높지 않다. 이 전의 미생물 연료전지를 이용한 경우에는 coulomb yield가 5-6% 밖에 되지 않았는데 구조를 개선한 후, 200 ppm의 fuel을 공급할 때는 약 50 %까지 coulomb yield가 증가하는 결과를 보였다. 앞으로 2단계 연구에서는 coulomb yield를 더 증가시키기 위하여 stack 이나 양극부의 전극 물질 등을 고안하여 운전할 것이다.



### 제 3 절 미생물 연료전지의 microbial diversity

#### 1. 연구 내용

미생물의 다양성을 알아보는 생태학 (microbiology ecology)에서는 전통적으로 특정 환경에서 생물을 실험실에서 배양하여 분리, 동정하였다. 하지만 지구상의 97% 이상의 미생물은 배양이 어렵거나 아직 배양할 수 없기 때문에 배양에 의한 조사방법은 큰 단점을 가지고 있다. 따라서 자연 환경 (natural community)을 구성하는 미생물의 다양성을 분석하기 위해서는 그들의 DNA를 이용하는 분자생물학적 (molecular microbiology method)기법이 요구된다. 주로 16S ribosomal DNA gene sequences를 분석하여 미생물의 종류를 탐색하는 연구가 주로 사용되는데 이 경우 total genomic DNA를 template로 해서 16S rDNA만을 증폭하고 이를 다시 cloning하여 미생물들의 다양성을 조사하고 있다. 또한 최근에는 기존에 사용되었던 방법에서 vector에 들어가는 insert의 한계를 극복하고 보다 큰 size의 DNA를 넣을 수 있는 방법을 이용하여 library를 구축하기도 한다. 이러한 방법으로는 bacterial artificial clone을 이용하는데 이것을 metagenome이라고 한다. 16S gene만을 cloning할 경우에는 미생물의 종류만을 탐색할 수 있지만 metagenome을 수행할 경우에는 특정한 function을 포함한 gene 들 (functional gene)을 모두 host에서 발현할 수도 있기 때문에 최근에 생태학연구에서 많이 사용되고 있다. 이러한 접근 방법은 전통적인 미생물 생태학 및 분류학의 어려움을 해결해주고 있다.

DGGE는 environmental microbiology 분야에서 복잡한 미생물 population을 연구하거나 다른 미생물 집단을 비교하기 위한 목적으로 사용되는 방법이다. 이 기법은 200-700 bp 정도의 작은 DNA fragment가 가지고 있는 G+C의 함량 차이에 따른 melting behavior의 차이를 이용하는 방법으로 single base의 substitution까지도 detect 할 수 있다. DNA fragment가 화학적으로 변성된 gel에서 loading 될 때에 부분적으로 melting 되고 결국은 single strain으로 완전히 분리되게 되는데 이때에는 증폭 시 첨가된 primer에 GC rich region (30-50 GC)을 증폭함으로써 zipper like manner를 형성하게 하여준다. 이러한 fragment의 physical shape가 polyacrylamide gel 위에서 다른 motility로서 증명된다. 각기 다른 미생물들의 다른 gene fragment는 다른 position에서 band로서 확인될 수 있다. 이러한 technique은 신뢰성, 신속성, 경제성이 특징이다.

RFLP method는 restriction enzyme이 DNA sequence 염기서열의 특정 부위에 선택적으로 작용을 하게 되고 결국 처리된 DNA가 서로 다른 크기의 fragment를 나타내게 되는 것을 전기영동에서 비교하는 방법이다. 즉, 16S gene을 증폭한 후 보이는 일정한 크기의 서로 다른 미생물 유래의 16S rDNA를 서로 구별하고 같은 clone을 다시 sequencing하는 작업을 줄이기 위해서 수행된다. 한편 이 방법을 통해서 특정 환경에 분포하고 있는 미

생물 들의 cloning frequency를 추정할 수 있다.

현재 새로 출판된 Bergey's manual에서는 지구상의 모든 미생물 들을 크게 세 개의 kingdom으로 분류하고 있다. 이들은 *Eucarya* (all eukaryotes), *Archaea*, and *Bacteria* (*Eubacteria*) 이다. Bacterial system에서 사용되는 기본적인 taxonomic group은 species이다. Species는 공통적으로 많은 특징을 공유하는 strains의 collection으로 간주되기 때문이다. 이때 type strain은 species를 cover하는 permanent example로서 species level에서 classification에 매우 중요한 역할을 한다. 대략 1500개의 base로 이루어진 16S ribosomal DNA gene sequence를 이용하여 grouping을 하여 classification 하고, 이들의 similar relatives를 이용한 phylogenetic tree를 construction하여 highly similar population을 알아 볼 수 있다.

미생물연료전지는 미생물의 catalytic activity에 의한 chemical energy를 전기화학 energy로 전환시키는 장치로서 BOD sensor, 폐수처리 등의 다양한 목적을 위하여 연구되고 있다. 다양한 종류의 기질을 이용하여 미생물연료전지를 운전해왔는데 기질(연료, substrate)과 같은, 운전조건의 차이에 따라서 여러 미생물연료전지 전극(electrode)에서 다양한 미생물이 biofilm을 구성하고 있을 것으로 간주된다. 본 연구에서는 glucose와 glutamate로 구성된 인공 폐수를 연료로 이용하는 미생물연료전지와 acetate를 연료로 이용하는 연료전지와 전분 가공 폐수를 연료로 이용하는 미생물연료전지의 미생물학적 다양성을 분자 생물학적 방법을 이용하여 알아보려고 한다. 특히 acetate를 기질로 이용하는 미생물연료전지 안에는 대부분의 미생물들이 혐기적 호흡(anaerobic respiration)을 통하여 mediator 없이 전극을 직접 환원하는 것으로 생각되며 이러한 미생물들이 전기화학 활성과 크게 연관될 것으로 생각된다. 오랜 시간동안 운전되어온 연료전지는 각각의 기질을 이용하는 미생물들로 농화 배양되었으므로 이들의 DNA를 회수 하고 이들을 PCR (polymerase chain reaction)을 통하여 특정 유전자 단편(gene sequences fragment)을 증폭시키고 이들의 clone library를 구축하여 어떠한 미생물 군들이 연료전지에 존재하면서 음극부 반응에 관여하는지 알아본다. 또한 16S ribosomal DNA sequence 안에 존재하는 hypervariable region (대략 200-700 bp)을 증폭하여 DGGE를 통하여 different microbial consortia를 비교, 분석할 수 있다. 동시에 이들의 phylogenetic tree를 이용하여 발생계통학적인 분류(phylogenetical taxa)를 조사하였다. 본 실험에서는 위와 같은 분자생물학적인 기법을 이용하여 미생물연료전지 음극부에서 분포하고 있는 미생물들의 다양성을 확인하고 실제 전극에 전자를 전달하는 미생물을 규명하기 위한 기본 자료를 제공할 수 있을 것으로 판단된다.

2. 실험 재료 및 방법

가. 사용 연료 및 미생물 연료전지

미생물연료전지에 분포되어 있는 미생물을 조사하기 위하여 전극에서 추출한 genomic DNA의 16S rDNA를 증폭하고 cloning과 sequencing작업을 실시하였다. 표 12는 시료로 사용한 미생물 연료전지에 사용한 폐수를 포함한 운전조건이다.

표 12 Microbial diversity를 분석하기 위해서 사용한 생물연료전지의 운전조건

미생물 연료전지 type	폐수 및 기질 (COD 농도)	운전기간
NCBE type	전분가공폐수 (400-1500 ppm)	5년 이상
Sensor type	인공폐수 (100 ppm이상)	3년
Sensor type	Acetate (300 ppm)	2년

나. Biodiversity and taxonomy of microbial populations in the MFC

(1) Genomic DNA extraction from microbial community

대략 1 g의 electrode를 MFC에서 꺼내어 액체질소에 10-15초 동안 처리한 다음 곧바로 막자사발에서 완전하게 갈아주었다. 완전히 갈아진 electrode felt를 15 ml tube에 넣고 최종 부피가 1.85 ml이 되도록 cell을 suspension 시킨 다음, RNase(100 mg/ml)와 20% SDS, Lysozyme(50 mg/ml), Proteinase K(5 mg/ml)로 물리적으로 분쇄된 organism의 cell wall을 화학적으로 lysis하였다. Phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1)을 이용하여 protein을 제거하고 3 M sodium acetate (pH 5.2)와 100% ethanol 그리고 70% ethanol로 연이어 washing하였다. 최종적으로 TE buffer(10 mM, pH 8)에 용해시킨 후 별도의 실험이 없으며 -20℃에서 보관하였다.

(2) Polymerase chain reaction(PCR) of 16S rDNA

PCR을 통하여 원하는 DNA fragment 을 증폭하여 사용이 가능한데 보통 수 kbp DNA fragment의 증폭이 가능하다. PCR에 사용되는 polymerase는 내열성이 요구되므로 내열성 균 (*Thermus aquaticus*)에서 분리한 Taq polymerase( afamily)를 사용하였다. PCR에 있어서 polymerase의 내열성과 충실도가 PCR efficiency에 중요한 역할을 한다. 충실도 (fidelity)란 돌연변이 출현빈도로 나타낸다. 다음 primer set을 16S rDNA 증폭용으로

사용하였다.

\*primer set for 16s rRNA

27F :5'- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG -3'

1492R :5'- GGTTACCTTTGTTACGACTT-3'

PCR은 thermal cycler에 있는 200  $\mu$ l tube에 template와 증폭 효소인 Ex Taq polymerase(TaKaRa), buffer for Taq, primer(50nm/ml), salts, dNTP를 넣은 뒤, 반응시켰으며 증폭된 full DNA fragment size(1500bp)를 0.9-1% agarose에서 전기영동으로 결과를 확인할 수 있었다. 다음 조건은 PCR 조건이다.

- Step 1: 94°C 5 min
- Step 2: 94°C 1 min
- Step 3: 58°C 45 sec
- Step 4: 72°C 1.5 min
- Step 5: Repeat from step 2 to step 4=29 cycle
- Step 6: 72°C 10 min
- Step 7: Hold 4°C
- Total cycle 30 cycle

### (3) Cloning of 16S ribosomal DNA gene

Cloning을 하기 위해서는 pGEM-T vector (Promega)에 증폭된 PCR product (16S rDNA fragment)를 ligation을 manufacture가 요구하는 방법으로 수행하였다. Ligation과 정은 vector(50 ng/ $\mu$ l)에 PCR product(150 ng), T4 ligase, and buffer for enzyme를 넣은 후 16°C에서 overnight 하였다.

### (4) Transformation into competent cell, *E. coli DH5a*

Plasmid DNA를 30분 동안 얼음에 두고 ligation product와 competent cell을 42°C heat shock으로 1분 동안 transformation 시켜 준 뒤, 600  $\mu$ l LB medium을 넣어 37°C shaking incubation 하였다. Ampicillin, IPTG, X-gal을 포함하는 LB agar 위에 spread 하여 37°C incubator에서 overnight동안 배양하였다. plate상에 형성된 white colony를 각각 ampicillin을 포함하고 있는 LB broth에서 16시간 배양하여 plasmid DNA를 purification 하였다.

#### (5) Purification of plasmid DNA

Ampicilin (150 ppm)을 포함하는 LB broth에서 white colony를 37°C, 8-10 시간 동안 shaking incubation하였다. 14,000 rpm에서 5분 동안 centrifuge하여 pellet을 모은 다음 pellet에 cell resuspension solution을 250  $\mu$ l 첨가하여 pipet으로 잘 suspension 시켰다. cell wall을 깨기 위하여 sodium dodecyl sulfate (SDS)가 포함된 cell lysis solution 250  $\mu$ l을 첨가하여 4~5회 invert 하여 cell을 깨고 cell neutralization solution 250  $\mu$ l을 첨가하여 4~5회 invert하였다. 75% ethanol을 이용하여 800  $\mu$ l, 300  $\mu$ l로 각각 2회 wash 하여주고 최종적으로 50-100  $\mu$ l의 sterilized distilled water로 elution해서 -20°C에서 보관한다. purify 된 plasmid DNA는 전기영동 상에서 확인이 가능하며 insert(1500 bp amplicon)를 포함하는 plasmid DNA는 vector(3 kb)와 함께 거의 4.5kb를 나타내어야하고 insert가 들어가지 않은 vector의 경우에는 대략 3 kb 크기의 DNA fragment로 확인하였다.

#### (6) Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis

Transformation 후에 배양된 모든 colony를 purify한 다음의 plasmid DNA는 여러 미생물들의 DNA를 각각 포함하고 있기 때문에 이들 가운데 중복되는 DNA를 분리하기 위하여 restriction enzyme으로 digestion 하였다. 보편적으로 RFLP test에서 많이 사용되는 두 종류의 enzyme인 *Hae* III (TaKaRa), *Xho* I (TaKaRa)을 이용하여 각각의 buffer를 넣고 3시간동안 digestion 한 뒤, 3% Nusieve GTG agarose (BioRad Co.)에서 확인하였다. RFLP analysis 후에는 100 bp이하의 작은 DNA fragment에서 수 kb까지도 하나의 gel 상에서 확인할 수 있는 Nusieve GTG agarose 3%에서 1시간 전기영동 (120 V)하여 확인하였다.

#### (7) Sequencing of plasmid DNA

Insert의 sequencing은 마크로젠(주)에 의뢰하여 full length의 gene 염기서열을 분석하였다. 분석된 full length 1500 bp의 ribosomal DNA를 vector부분의 염기와 primer 부분의 염기를 제외하고 clone의 염기부분만을 읽었다.

#### (8) Construction of phylogenetic tree

미생물 연료전지에서 cloning을 마친 모든 clones의 sequences를 genbank (NCBI, BLASTN)에서 유사한 미생물을 확인하여 clones의 library를 작성하였다. 이들의

homology에 근거를 둔 MegAlign program (DNASTAR, Inc. Madison, WI, USA)을 사용하여 계통 발생을 보여주는 phylogenetic tree를 완성하였다.

다. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

DGGE를 수행하기 위해서 사용한 primer는 341F-GC clamp (5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCG CCC CCC TAC GGG AGG CGA CAG-3')와 534R (5'- ATT ACC GCG GCT GCT G-3')을 사용하였다. PCR은 tube에 template와 증폭 효소인 *La Taq* polymerase (TaKaRa Co.), GC buffer I for *Taq*, primers (50 ng/ml), salts, dNTP를 넣은 뒤, 아래의 조건과 같이 반응 시키면 원하는 부위가 GC clamped primer로서 증폭이 된다. 증폭된 대략 200 bp 크기의 DNA fragment를 1.2% agarose에서 전기영동으로 결과를 확인할 수 있었다.

**\* Touch down PCR Program**

- Step 1: 95°C, 10 min
- Step 2: 95°C, 1 min
- Step 3: 65°C, 45 sec
- Step 4: 72°C, 1.5 min
- Step 5: Repeat from step 2 to step 4: 19 cycles but after each cycle, the annealing temperature is decreased by 0.5°C
- Step 6: 95°C, 1 min
- Step 7: 55°C, 45 sec
- Step 8: 72°C, 45 sec
- Step 9: Repeat from the step 6 to step 8 : 20 cycle.
- Step 10: 72°C, 10 min
- Step 11: Hold at 4°C

DGGE는 Dcode Universal Mutation Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용하였고 10% polyacrylamide gel의 변성 농도의 범위는 30-60%로 gradient가 되도록 하였다 (Muyzer et al. 1993). 아래의 표는 원하는 농도 (30%,60%)의 변성 gel을 준비하기 위한 구성이며, 10% polyacrylamide gel sandwich를 만든 후, 7 l의 1X TAE buffer를 60°C로 preheating 하였다. Manufacture의 procedure에 따라서 gel sandwich를 설치한 후, 대략 10-15 µl GC clamps가 함께 증폭된 amplicons를 대략 5시간 동안 200 V에서 loading 시켰다. DNA staining solution인 10,000 X SYBR Green(BioRad) 25 µl를 250 µl 1X TAE buffer에 잘 희석한 뒤, staining 하여준 다음 UV illuminator에서 band를 관찰하였다.

표 13 Polyacrylamide(10%)의 denaturing gradient(30%, 60%)에 따른 화학적 변성제 첨가량

Denaturing Solution	30%	60%
40% Acrylamide/Bis	25 ml	25 ml
50X TAE buffer	2 ml	2 ml
Formamide	12 ml	24 ml
Urea	12.6 g	25.2 g
Total volume	100 ml	100 ml

표 14 Reagents for casting parallel gradient gel

Reagents	Low denaturing concentration (30%)	High denaturing concentration (60%)
Denaturing solution	16 ml	16 ml
10% APS	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l
Dcode Dye Solution	0	250 $\mu$ l
TEMED	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l

### 3. 실험 결과 및 고찰

#### 가. 미생물의 형태학적 관찰

각 연료전지는 최소 2년 이상 운전을 하였으며 폐수 또는 연료로 사용되는 기질에 대하여 농화배양이 완료된 것이다. 각 생물연료전지가 보이는 특성은 특정 연료(폐수)로 농화배양된 것은 다른 기질, 특히 성상이 전혀 다른 연료를 공급 시 전류가 급격히 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 각 생물연료전지에 사용한 유기물(폐수)을 이용하는 미생물이 농화배양된 것을 나타낸다. 먼저 각 생물연료전지에서 채취한 전극은 전자현미경을 통하여 형태학적 관찰을 실시하였다 (그림 35)

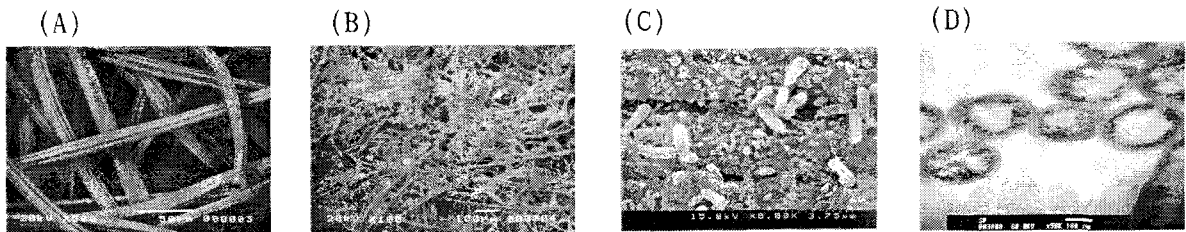


그림 35. 전분가공폐수로 운전한 생물연료전지의 음극의 전자현미경 사진

(A): 운전전 전극, (B) 운전 후 LVMM 사진, (C) 운전 후 SEM 사진, (D) 운전 후 TEM 사진

#### 나. 16S rDNA 증폭과 RFLP analysis

Genomic DNA를 template로 하고 primer set을 이용해서 증폭한 16S rDNA를 확인하기 위하여 agarose gel에서 전기영동을 하고 증폭된 DNA의 크기를 확인하였다 (그림 36).

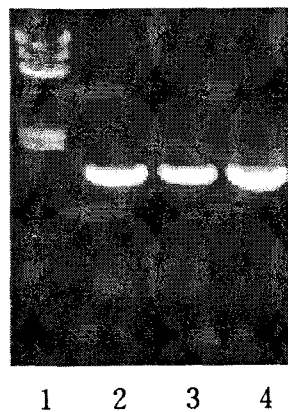


그림 36 16S rDNA의 전기영동 사진

1: marker, 2: acetate fed MFC, 3: 인공폐수 MFC, 4: control (inoculum)



그림 36에서 보는 바와 같이 증폭된 약 1,500 b의 DNA가 증폭된 것을 확인할 수 있었다. 증폭된 16S rDNA는 다시 ligation과 transformation 작업을 수행하여 *E. coli*에 cloning하였다. Conning 작업을 마친 후 insert를 가지고 있는 균주들은 plate 상에서 분리하여 배양하고 다시 plasmid를 분리한 후 서로 다른 clone들을 확인하기 위하여 RFLP 분석을 시도하였다. 그림 37은 전형적인 RFLP 분석을 위하여 시도된 전기영동 결과이다. RFLP analysis 에서도 확인 할 수 있는 바와 같이 다른 clones는 다른 base를 가지기 때문에 enzyme의 reaction site가 다르고 결과적으로 다른 크기의 DNA fragment로 잘라지게 된다. 전기 영동상의 결과를 보면 일부의 clone 들은 같은 band pattern을 보이게 된다. 전극에서 extracted DNA를 모두 cloning한 뒤, 중복되는 미생물의 DNA를 제거하기 위해서 RFLP test를 사용하였고, 다른 pattern의 clones들은 곧바로 염기서열 분석을 하였다. 총 330개의 transformation clones 가운데 81개의 서로 다른 RFLP pattern을 골라내어 염기서열을 분석하였다. 그중에서 29개의 sequencing은 읽지 못했다. 동시에 clones의 identify를 위하여 NCBI의 database (BLASTN)을 이용하여 homology를 조사하였다.

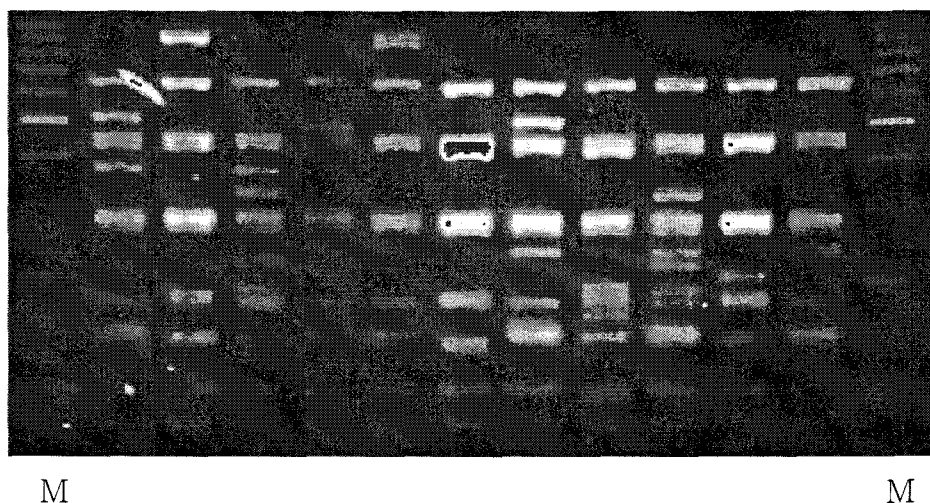


그림 37 DNA 제한 효소(*HeaIII* and *XhoI*)를 이용한 RFLP pattern  
M: marker

다. DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis)

각각의 연료전지의 전극에서 total DNA를 추출하고 16S RNA 유전자 특이 서열을 primer로 PCR한 다음 DGGE법으로 비교한 결과 acetate 미생물연료전지에 농화배양된 미생물은 다른 기질을 사용하여 농화배양한 것과는 다른 것으로 나타났다. 그림 38에서 볼

수 있는 것처럼, 어떤 band들은 모든 경우에 다 존재하지만 뚜렷한 대표적인 band는 약간씩 차이가 있다는 것을 관찰 할 수 있다. Acetate를 기질로 농화배양한 미생물연료전지의 전극에서 추출된 DNA를 이용한 경우가 가장 단순한 미생물 다양성(simplest microbial diversity)을 보인다. 이들은 접종원으로 사용한 activated sludge (lane 1) 과도 상당히 달랐다. 이는 연료전지안의 농화배양을 보여준다. 외부 저항을 연결하지 않은 연료전지의 대조구에서 추출한 DNA를 실험에 이용한 결과 (lane 6)는 저항을 통하여 전자를 이동시킨 acetate MFC의 DNA band pattern (lane 2)과 상당히 다르게 나타났다. 이러한 결과들을 통하여 연료전지안의 미생물들이 전자를 전극으로 전달시키는 반응에 관여한다고 알 수 있었다. 전체적으로 매우 다양한 미생물들이 각각의 연료전지에서 전기 활성을 가지며 존재하며 이들은 기질의 차이 뿐 아니라, 전자 전달과 관련된 coulomb yield의 차이에 따른 결과로 생각할 수도 있겠다. 즉 acetate 연료전지의 coulomb yield는 최소한 70% 이상이고 80-90% 정도의 높은 수준인 반면에 인공 폐수 연료전지는 30% 미만이었다.

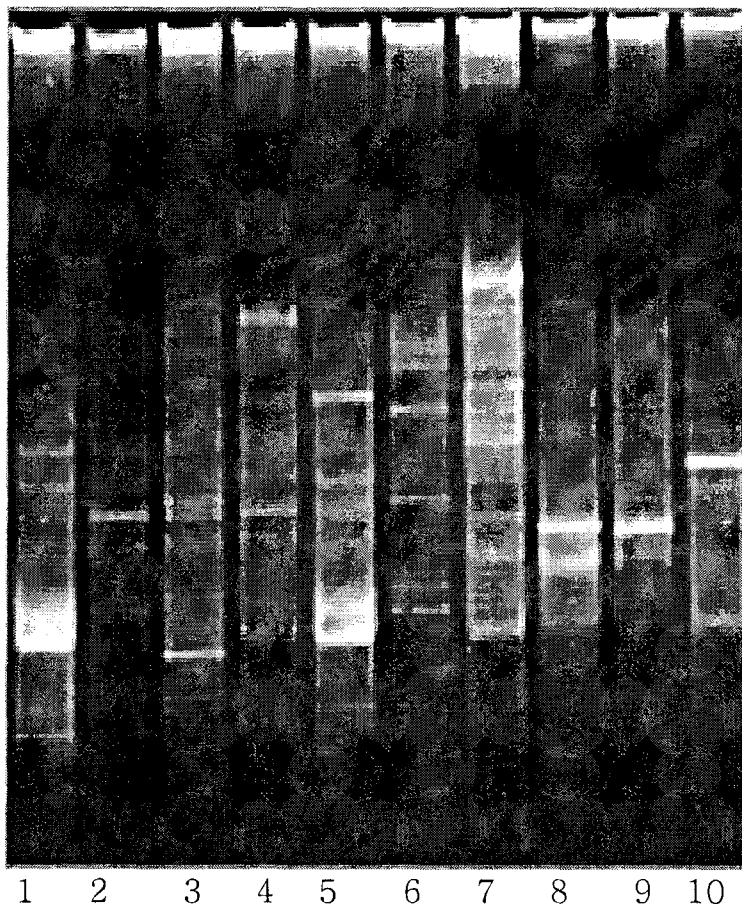


그림 38. Comparison of DGGE patterns of microbial communities of various microbial fuel cells.(denaturing gradient 30% to 60%)

lane 1: sludge (used to initiate enrichment)  
 lane 2: acetate enriched electrode  
 lane 3: copiotrophic electrode  
 lane 4: copiotrophic electrode using corn processing wastewater  
 lane 5: corn processing wastewater  
 lane 6: acetate control  
 lane 7: oligotrophic electrode  
 lane 8, 9: single strain from acetate electrode  
 lane 10: *Escherichia coli*

#### 라. 미생물연료전지의 미생물 다양성의 분석

Acetate를 기질로 농화배양한 미생물연료전지와 전분가공폐수를 기질로 농화배양시킨 미생물연료전지환경에서 형성된 미생물의 population은 매우 다르며 상당히 다양하다는 것을 DGGE를 통하여 확인하였다. RFLP analysis를 통해서 sequencing된 81개 clone 중에서 높은 비율의 similarity를 보이는 같은 Genus에 속하는 대표적인 clone들을 표 15와 16에 나타내었다. 또한 16S rDNA gene 염기서열을 가지고서 DNASTAR\* program을 이용하여 alignment하고 phylogenetic tree를 작성하였다. Acetate 연료전지에서 분석된 DNA clone library의 330개 clone 들 가운데 207개의 clone이 *Geobacteria metallireducense*가 포함되는 *Deltaproteobacteria* subclass에 포함되었으며 21개의 *Alphaproteobacteria*, 5개의 *Betaproteobacteria*, 52개의 *Gammaproteobacteria*, 그리고 13개의 *Bacteroides*와 *Flavobacteria*로 이루어졌다.

고영양성 인공 폐수(copiotrophic artificial wastewater)로 농화 배양한 연료전지안의 DNA clone library 결과는 acetate의 그것과는 상당히 다른 결과를 보여주었다. copiotrophic 연료전지에서는 총 100개의 clones이 선택되었고 그중에서 18개의 sequencing이 이루어지지 않았다. sequencing 결과를 BLAST search 한 뒤, 서로 다른 31개의 phylotype을 확인하였고 이들을 표 17에 나타내었다. 이들의 구성은 2개의 *Alphaproteobacteria*, 5개의 *Betaproteobacteria*, 27개의 *Gammaproteobacteria*, 10개의 *Deltaproteobacteria*, 20개의 *Firmicutes*, 8개의 *Bacteroides*, 7개의 *Spirochaetes*, 2개의 *Actinobacteridae*, 1개의 *Cyanobacteria* 이다. 특히 highly similar strain이 달랐지만 그들이 포함된 subclass들도 거의 대부분이 proteobacteria였고 많은 clones들이 *Firmicutes (Clostridia)*에 포함되고 있는 것이 인공폐수 (copiotrophic, 고영양성)로 농화배양한 연료전지의 큰 특징이라고 생각할 수 있겠다.

☒ 15 Bacterial community representing clones from acetate enriched microbial fuel cell

Clone No.	Similar relative	Iden. (%)	Phylum (subclass)
8#2	<i>Uncultured Geobacter (205)</i>	99	$\delta$ proteobacteria
42#2	<i>Clostridium amniobutyricum (1)</i>	96	Firmicute
50#2	<i>Acidovorax sp. (1)</i>	98	$\beta$ proteobacteria
79#2	<i>Azovibrio restrictus (4)</i>	98	$\beta$ proteobacteria
95#2	<i>Acinetobacter sp. (2)</i>	98	$\gamma$ proteobacteria
20#4	<i>Stenotrophomonas acidaminiphila (48)</i>	99	$\gamma$ proteobacteria
68#4	<i>Dusulfovibrio intestinalis (1)</i>	98	$\delta$ proteobacteria
45#2	<i>Dysgonomonas gadei (4)</i>	97	Bacteroides
31#2	<i>Porphyromonas gulae (1)</i>	92	Bacteroides
AC11	<i>Brevibacillus formosus (2)</i>	97	Firmicutes
AC37	<i>Ochrobactrum anthropi (20)</i>	97	$\alpha$ proteobacteria
AC55	<i>Pseudomonas sp. (1)</i>	99	$\gamma$ proteobacteria
AC58	<i>Ochrobacterum tritici (1)</i>	96	$\alpha$ proteobacteria
AC93	<i>Flavobacteriales bacterium (3)</i>	90	Bacteroides
AC77	<i>Sphingobacterium facium (1)</i>	86	Bacteroides
AC181	<i>Bacteroides acidofaciens (1)</i>	92	Bacteroides
AC13	<i>Trichlobacter thiogenes (1)</i>	93	$\delta$ proteobacteria
AC155	<i>Aeromonas hydrophila (1)</i>	98	$\gamma$ proteobacteria
AC122	<i>Environmental sample (3)</i>	98	Environmental sample

表 16 Bacterial community representing clones from starch processing wastewater enriched microbial fuel cell

Clone No.	Similar relative	Iden. (%)	Phylum (subclass)
BK4	Uncultured bacterium VC2.1 Bac22(13)	95%	Unclassified bacteria
BK5	<i>Azoarcus</i> sp. (12)	97%	$\beta$
BK6	<i>Cytophaga hutchinsonii</i> (4)	85%	Cytophagaceae
BK18	<i>Riemerella columbina</i> (6)	91%	$\beta$
BK25	<i>Thauera mechernichii</i> (5)	98%	$\beta$
BK50	Uncultured eubacterium (8)	88%	unclassified
BK53	Uncultured bacterium (7)	88%	Green non-sulfur
BK57	Unidentified eubacterium (9)	98%	CFB/Green sulfur bacteria
BK61	<i>Capnocytophaga gingivalis</i> (7)	88%	Flavobacteriaceae
BK81	<i>Thauera</i> sp. (10)	97%	$\beta$
BK82	Uncultured cytophagales clone (15)	90%	Flavobacteria
BF5	<i>Planctomycete</i> sp (4)	96%	Planctomycetacea
BF9	<i>Methylocystis parvus</i> (7)	88%	$\alpha$
BF20	Metal-contaminated soil clone (14)	94%	$\alpha$
BF26	<i>Azozrus</i> sp. (5)	95%	$\beta$
BF27	Uncultured bacterium (4)	99%	Unclassified bacteria
BF32	<i>Thauera</i> sp. (4)	97%	$\beta$
BF33	<i>Azospirillum brasilense</i> (5)	94%	$\alpha$
BF36	Uncultured bacterium (9)	91%	Unclassified bacteria
BF53	Uncultured eubacterium (12)	88%	Green non-sulfur bacteria
BF67	Unidentified bacterium (9)	97%	Unclassified bacteria
BF71	<i>A. lipoferum</i> (3)	92%	$\alpha$
BF76	<i>Thauera mechernichii</i> (4)	98%	$\beta$
BF98	<i>Pedobacter</i> sp (8)	90%	$\alpha$

표 17 Diverse clone similarity from copiotroph (glucose + glutamate) enriched Microbial fuel cell

Clone	Similar relative(RFLP types)	Iden. (%)	Phylum (subclass)
COPI 1	<i>Burkholderia multivorans</i> (2)	96	$\beta$ proteobacteria
COPI 3	<i>Eubacterium pyruvivorans</i> (1)	90	Firmicutes
COPI 4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (16)	98	$\gamma$ proteobacteria
COPI 6	<i>Halothiobacillus</i> sp. WJI8 (1)	96	$\gamma$ proteobacteria
COPI 9	Acinetobacter sp. 16S rRNA gene (4)	98	$\gamma$ proteobacteria
COPI 12	<i>Selenomonas-like</i> sp. oral strain GAA14 (6)	92	Firmicutes
COPI 13	<i>Geobacter metallireducens</i> (4)	94	$\delta$ proteobacteria
COPI 16	<i>Desulfurella acetivorans</i> (4)	95	$\delta$ proteobacteria
COPI 17	<i>Chryseobacterium joostei</i> (1)	97	Bacteroides
COPI 18	<i>Agromyces mediolanus</i> (1)	91	Actinobacteridae
COPI 20	<i>Pseudanabaena PCC7408</i> gene (1)	86	Cyanobacteria
COPI 25	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> VPI-5482 (2)	93	Bacteroides
COPI 29	<i>Acidaminococcus fermentans</i> (1)	92	Firmicutes
COPI 31	<i>Raoultella ornithinolytica</i> (1)	98	$\gamma$ proteobacteria
COPI 35	<i>Desulfovibrio alcoholovorans</i> (1)	98	$\delta$ proteobacteria
COPI 36	<i>Dysgonomonas gadei</i> (2)	93	Bacteroides
COPI 39	<i>Acidocella</i> sp. WJB-3 (2)	97	$\alpha$ proteobacteria
COPI 43	<i>Dechloromonas</i> sp. LT-1 (1)	96	$\beta$ proteobacteris
COPI 44	<i>Citrobacter amalonaticus</i> (2)	97	$\gamma$ proteobacteria
COPI 45	Uncultured Spirochaete gene (7)	98	Spirochaetes
COPI 47	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. Allii (1)	97	$\gamma$ proteobacteria
COPI 51	<i>Salmonella enterica</i> subsp. (1)	92	$\gamma$ proteobacteria
COPI 52	<i>Acidaminococcus fermentans</i> (2)	92	Firmicutes
COPI 53	<i>Desulfurella kamchatkensis</i> (1)	96	$\delta$ proteobacteria
COPI 60	<i>Ideonella</i> sp. B513 (1)	98	$\beta$ proteobacteris
COPI 62	<i>Bacteroides acidifaciens</i> (3)	91	Bacteroides
COPI 72	<i>Brachymonas denitrificans</i> (1)	99	$\beta$ proteobacteris
COPI 74	<i>Actinomyces canis</i> (1)	91	Actinobacteridae
COPI 76	<i>Centipeda periodontii</i> (1)	89	Firmicutes
COPI 80	Uncultured Gammaproteobacterium (1)	99	$\gamma$ proteobacteria
COPI 83	<i>Acetobacterium paludosum</i> (9)	90	Firmicutes

마. Construction of phylogenetic tree of MFCs

Acetate, 전분가공폐수와 고영양성 인공 폐수(copiotroph artificial wastewater) MFC 의 phylogenetic tree를 각각 그림 39, 40, 41에 나타내었다. Cloning과 sequencing 과정 다음 RFLP test를 통하여 중복되는 clone을 줄인 다음에 genbank database에서 homologous relative strain을 찾았다. Acetate 연료전지와 고영양성 연료전지

(copiotroph artificial wastewater)의 proteobacteria에 속하는 대부분 clones들이 매우 다양하다는 것을 확인 할 수 있다.

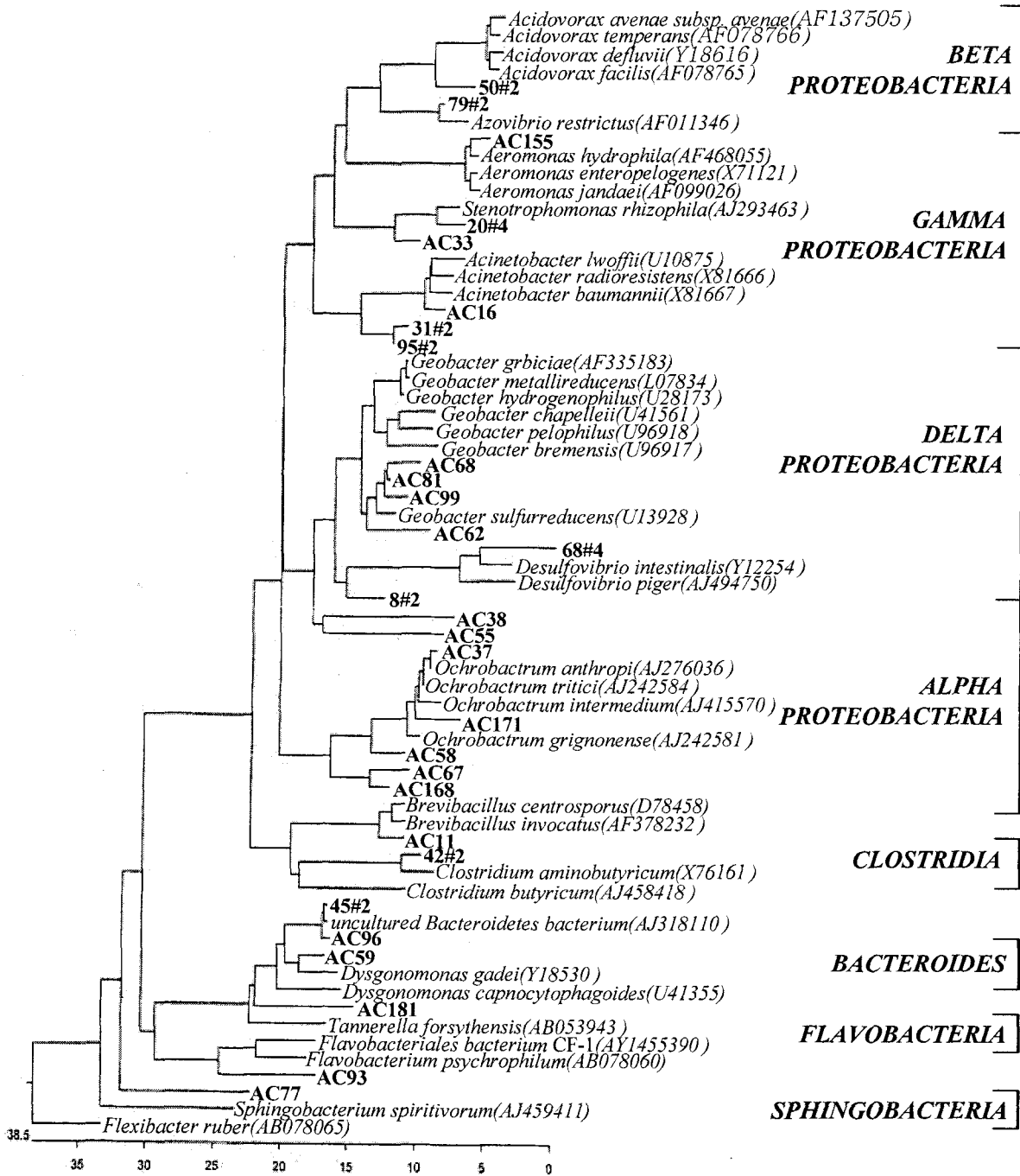


그림 39 acetate를 기질로 농화배양한 연료전지의 microbial population의 phylogenetic lineages

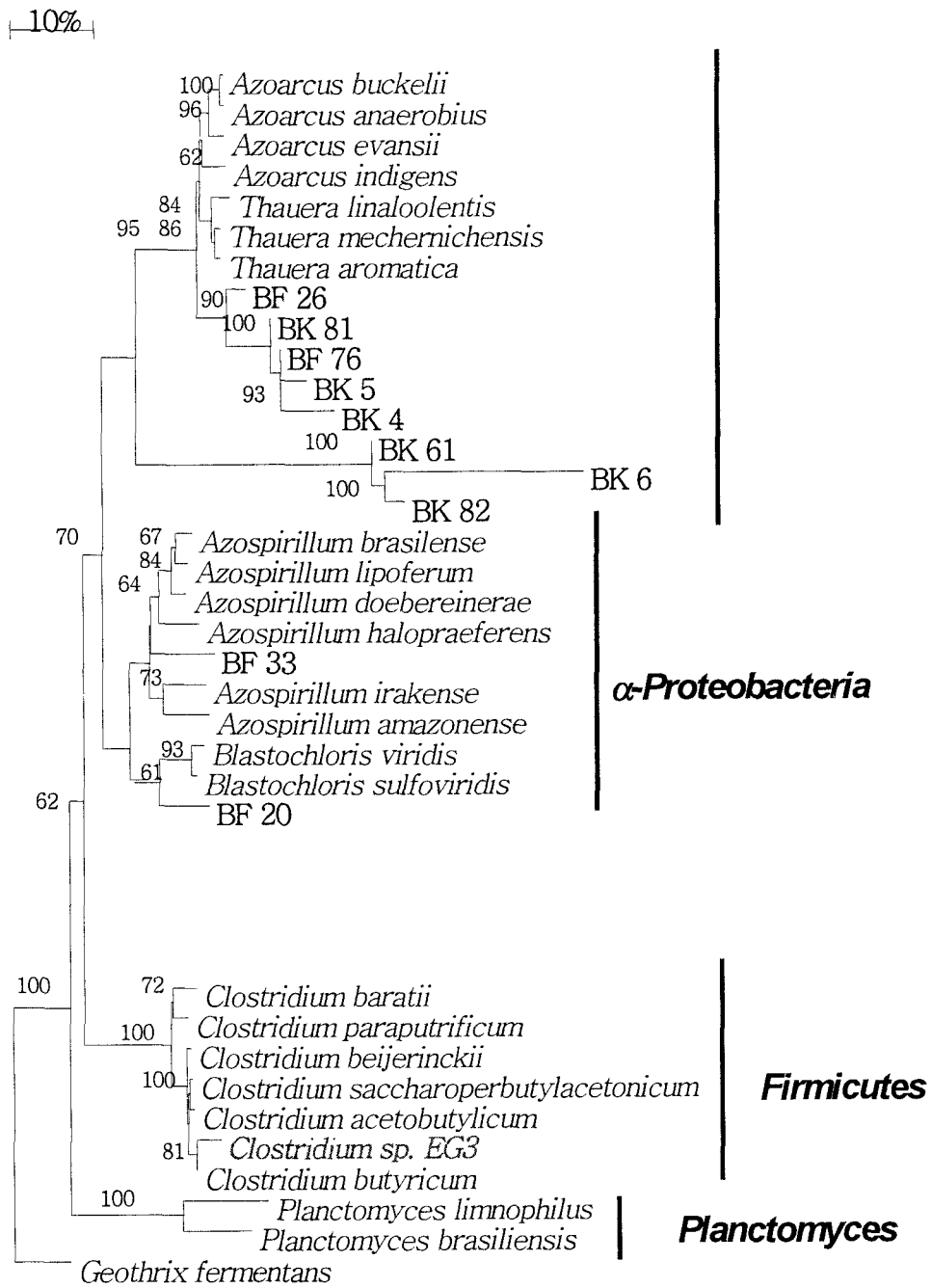


그림 40 전분가공폐수를 기질로 농화배양한 연료전지의 microbial population의 phylogenetic lineages



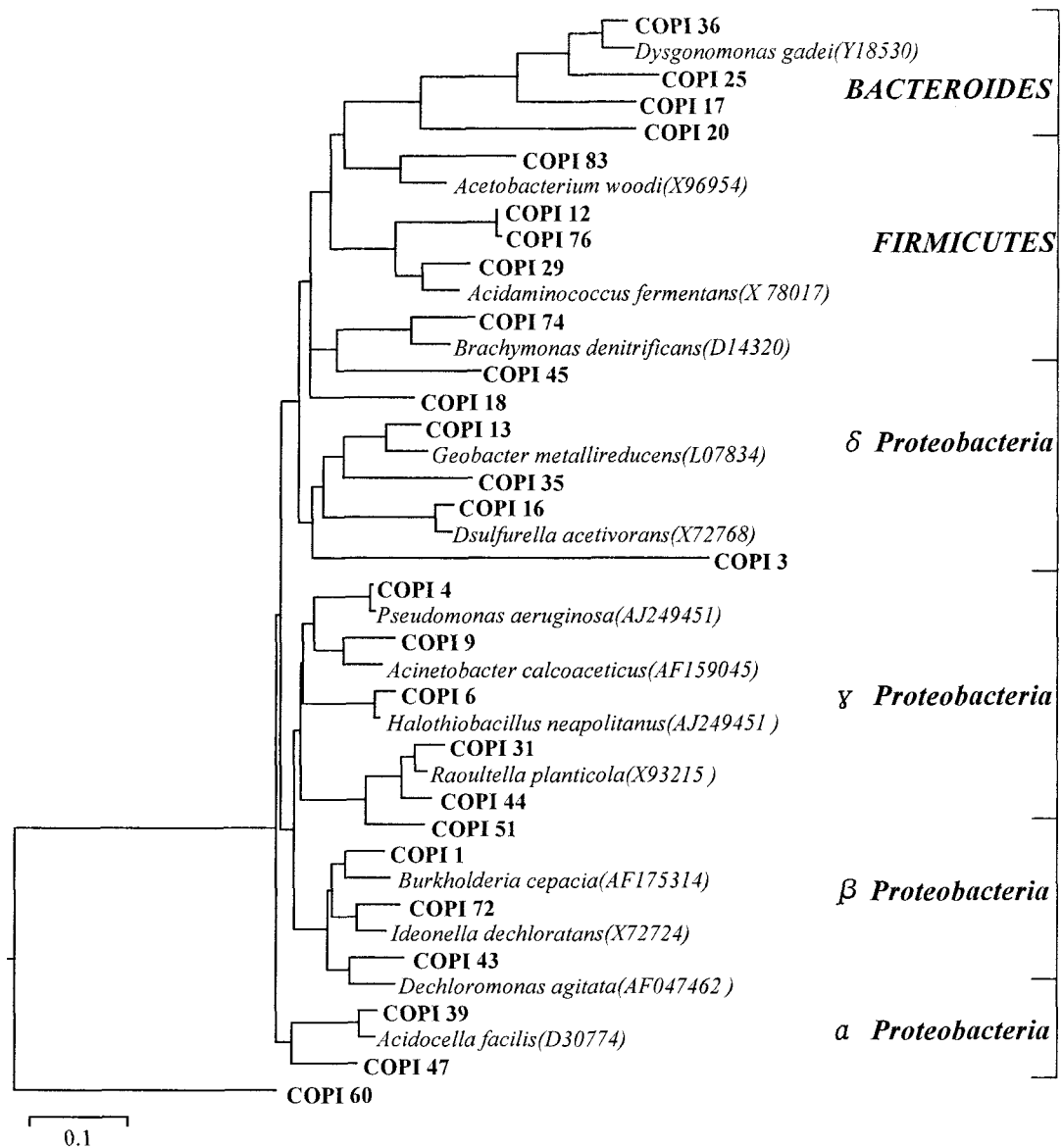


그림 4i 고영양성 인공 폐수(copiotrophic artificial wastewater)를 이용하여 농화배양한 연료전지의 microbial population의 phylogenetic lineages

Acetate와 인공 폐수(artificial wastewater)로 농화 배양한 연료전지 각각의 clone의 다양성은 그림 42와 표 18에 나타내었다. acetate community에서는 68.8%를 *Deltaproteobacteria*가 차지하고 있으며 상대적으로 copiotroph community는 *Gammaproteobacteria*가 32.9%로 가장 높은 비율을 나타내고 있다. 각기 다른 연료전지 환경에서의 상대적 abundance를 뚜렷하게 관찰할 수 있다. 이러한 차이는 acetate가 비발효성 전자공여체인 반면 glucose와 glutamate는 발효성 전자공여체인 차이점에서 기인한 것으로 생각된다.

표 18. 인공폐수와 acetate로 농화배양한 미생물연료전지의 microbial community의 16S rRNA gene sequence에 따른 subdivision 비교

Subdivision	Clone No. of Coptotrophs MFC	Clone No. of Acetate MFC
<i>α proteobacteria</i>	2(2.4%)	21(7.0%)
<i>β proteobacteria</i>	5(6.1%)	5(1.7%)
<i>δ proteobacteria</i>	10(12.2%)	207(68.8%)
<i>γ proteobacteria</i>	27(32.9%)	52(17.3%)
<i>Firmicutes</i>	20(24.4%)	3(1.0%)
<i>Bacteroides</i>	8(9.7%)	10(3.4%)
Spirochaetes	7(8.5%)	-
<i>Actinobacteridae</i>	2(2.4%)	-
Cyanobacteria	1(1.2%)	-
<i>Flavobacteria</i>	-	1(0.4%)
Total clones	82(99.9%)	301(100%)

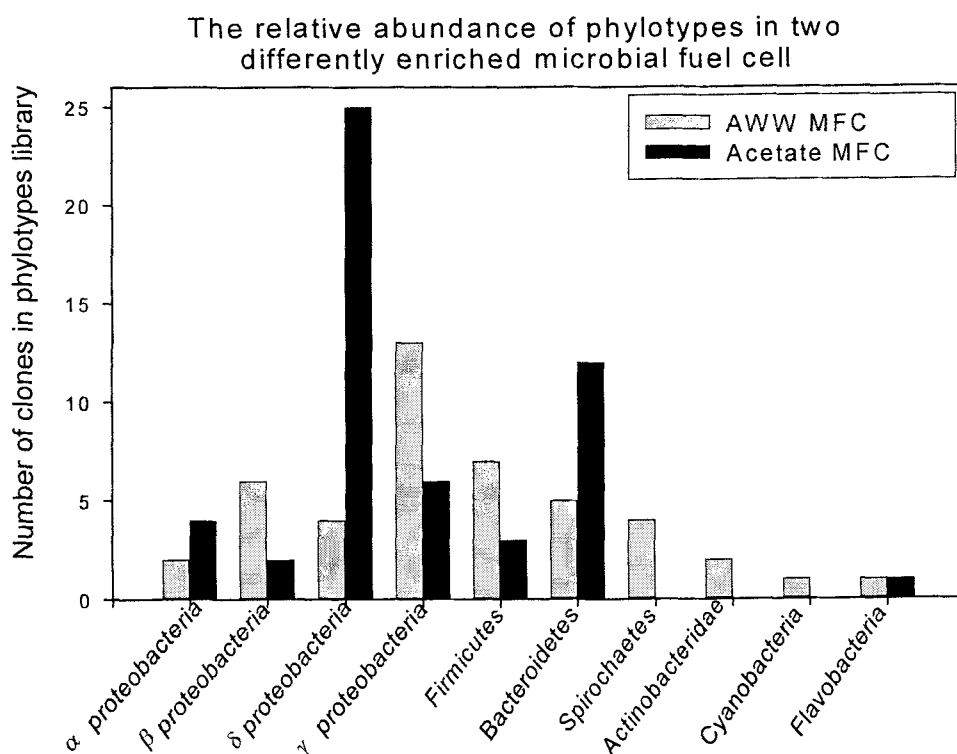


그림 42 The relative abundance of phylotypes in two 16S rDNA clone libraries from microbial fuel cell enriched with acetate and copiotrophic(glucose + glutamate)

각각 다른 연료전지의 bacterial community에서 분리된 clones들의 16S rDNA sequence를 genebank (BLAST)에서 비교해 본 결과를 분석하였다. Bergey's manual에 의하면 97% 이상의 homology를 나타내는 경우 동일종으로 간주하며, 그이하인 경우 새로운 종으로 판단한다. 표 19에서 보는 바와 같이 97% 이하인 clone이 55 - 60%로 미생물연료 전지에 농화배양된 미생물에는 지금까지 알려지지 않은 세균이 50% 이상임을 알 수 있다. 또한 97% 이상의 homology를 보인 clone 중에도 아직 배양되지 않은 세균이 다수 포함되어 있기 때문에 이 비율이 60% 이상임을 알 수 있다. 특히 각 전극에서 homology가 90% 이하인 clone이 각각 한개 씩 분석되었다. 이러한 결과는 59 clone의 새로운 세균종을 확인한 것을 나타낸다.

표 19 인공폐수와 acetate를 기질로 사용한 생물연료전지의 16S rDNA sequence에 의한 closest match homology

폐수 (기질)	Total clone	homology with closet match		
		90% 이하	90% 이상, 97% 이하	97% 이상
인공폐수	55	1	30	24
Acetate	44	1	27	16

## 제 4 절 전기화학활성 미생물의 분리, 동정 및 전기화학활성측정

### 1. 연구내용 및 결과

#### 가. 미생물의 분리 및 전기화학활성

생물연료전지의 음극부의 미생물 분포를 16S rDNA sequence를 분석하여 조사한 결과 매우 다양한 미생물들이 분포되어 있음을 알 수 있었다. 하지만 어떤 미생물이 전기화학활성을 띠고 있으며 또한 우점종인지를 확인할 수 없었다. 그러므로 생물연료전지의 미생물을 분리하고 동정을 시도하였다. 미생물 분리는 먼저 폐수 또는 sodium acetate를 기질로 첨가하고 ferric citrate를 전자수용체로 해서 제조한 고체 배지를 제조하였다. 접종원으로 음극부의 전극을 채취하고 이를 혐기적인 상태로 제조한 인산염완충 배지 (phosphate buffered basal medium, PBBM)에 suspension하고 이를 plating해서 일부의 시료는 혐기적인 상태 (anaerobic glove box)와 호기적인 상태에서 배양하고 colony를 확인하였다. colony는 다시 Gram staining을 한 후 광학현미경으로 관찰하였으며 API kit (API 20E, API NE systems)를 이용하여 동정을 실시하였다. 또한 분리균들은 다시 액체배지에서 배양을 하고 얻은 균체로부터 genomic DNA를 얻고 16S rDNA를 증폭한 후 cloning과 sequencing 작업을 거쳐 BLAST search를 실시하였다. 표 20과 21은 각각 호기적 상태와 혐기적 상태에서 분리한 균을 나타낸 것이다.

표 20 Acetate를 기질로 사용한 생물연료전지에서 분리한 분리균 (호기성)의 동정과 전기화학활성

Isolates	Cell morphology	Gram staining	Identification		Homology with closetmatch using 16SrDNA	전기 화학활성
			APIKit	16SrDNAanalyses		
EFA1	cocci	-	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Serratia marcescens</i>	99%	-
EFA2	thin rod	-	<i>Alcaligenes xylooxidans</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	96%	-
EFA3	thin rod	-	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	<i>Chryseobacterium joostei</i>	97%	-
EFA4	thin rod	-	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas citronellolis</i>	99%	-
ENA1	thin rod	variable	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	96%	-
ENA2	thin rod	-	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas citronellolis</i>	99%	-
ENA3	thin rod	-	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Pseudomonas huttiensis</i>	98%	-
ENA4	cocco-bacilli	-	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Flavobacterium indologenes</i>	96%	-
EOA1	thin rod	-	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	<i>Chryseobacterium joostei</i>	93%	-
EOA2	cocco-bacilli	-	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	91%	-
EOA3	thick rod	-	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	<i>Flavobacterium gleum</i>	96%	-
PA1	cocci	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	88%	-
PA2	cocci	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	93%	-
PA3	cocco-bacilli	-	<b><i>Aeromonashydrophila</i></b>	<b><i>Aeromonashydrophila</i></b>	99%	+
PA4	thin rod	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterobacter agglomerans</i>	93%	-
PA5	cocco-bacilli	-	<i>Pasteurella pneumotropica</i>	<i>Serratia marcescens</i>	97%	-
PA6	thion rod	-	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Pandoraea prnomenusa</i>	98%	-
PA7	thin rod	-	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	96%	-
PA9	thick rod	+	<i>Bordetella</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	91%	-

표 21 Acetate와 전분가공폐수를 기질로 사용한 생물연료전지에서 분리한 분리균 (혐기성)의 동정과 전기화학활성

Isolates	Cell morphology	Gram staining	Identification		Homology	전기 화학 활성
			API Kit	16SrDNA analyses		
AnAO2	Rod	-	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Desulfotomaculum guttoideum</i> <i>Clostridium sphenoides</i> <i>Cl. celerecresens</i>	99% 97%	+
AnFA1	Rod	-	<i>Chryseomonas luteola</i>	<i>Desulfotomaculum guttoideum</i> <i>Cl. celerecresens</i> <i>Cl. sphenoides</i>	99%	+
AnFA2	Rod	-	<i>Burkholderia cepacia</i>	Uncultured <i>Bacteroidetes bacterium</i> <i>Dysgonomonas gadei</i>	99% 91%	+
EG3	Rod	+	<i>Clostridium butyricum</i>	<i>Clostridium butyricum</i>	98%	+

이 결과에서는 전기화학활성이 없는 분리균주의 경우 API kit로 동정한 결과와 16S rDNA를 기준으로 동정한 결과가 일치하는 것을 확인하였지만 전기화학활성이 있는 균주는 PA3를 제외하고는 API kit로 동정한 결과와 다르게 나타났다. 이런 결과는 전기화학활성이 있는 균주가 아직 보고되지 않은 종임을 의미한다. 분리균의 전기화학활성 측정은 cyclic voltametry (CV)에 의해 실시하였다. 호기적인 조건에서 분리한 균들은 LB/ferric citrate를 기본 배지로 혐기적인 상태에서 약 4일간 배양을 하고 균체를 회수하여 CV를 측정하였다. 이 결과 PA3는 호기적인 상태에서 분리한 균주이지만 혐기적인 상태에서 LB/ferric citrate에서 배양이 되고 ferric ion이 첨가된 배지에서 배양한 균체만이 전기화학활성이 있음을 확인하였다. 또한 전기화학활성은 ferric ion이 첨가된 배지에서 배양한 균체만이 보였고 활성은 산소의 노출에 의해 저해를 받다가 다시 혐기적인 처리를 하면 복구되는 현상을 보였다 (그림 43)

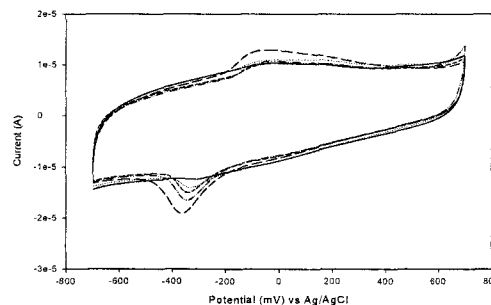


그림 43 Cyclic voltammograms of *Aeromonas hydrophila* PA3 cell suspension grown under anaerobic conditions with (dotted line) or without (solid line) ferric citrate as an electron acceptor, and Cyclic voltammograms (B) of anaerobically grown *Aeromonas hydrophila* PA3 cell suspension treated under different conditions after 30 min exposure to air.

나. 미생물의 동정

분리균 PA3는 16S rDNA분석과 DNA-DNA hybridization 분석에 의하여 그림 44(A)와 같이 *Aeromonas hydrophila*로 동정되었다. 전분가공폐수를 이용한 연료전지에서 분리한 EG3 균주도 비슷한 방법을 통해 *Clostridium butyricum*으로 동정되었다. 또한 그림 44(B)는 나머지 3주의 전기화학활성 분리균들의 phylogenic tree를 보여주고 있다.



그림 44 Phylogenetic position of electrochemically active bacteria with related taxa

다. 전기화학 활성 분리균을 이용한 생물연료전지의 운전

CV를 이용하여 확인된 전기화학활성 분리균을 이용해서 생물연료전지를 구성하였다. 미생물연료전지는 NCBE type cell을 사용하였으며 연료로는 yeast extract를 사용하였다 (그림 45).

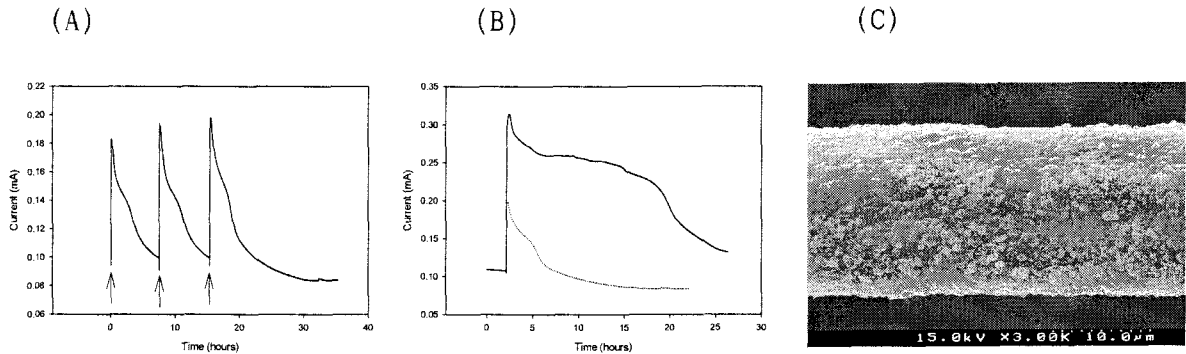


그림 45(A) Current generation of single strain *Aeromonas hydrophila* PA3 in a microbial fuel cell. The fuel cell was connected through a resistance of 500 ohm. Yeast extract with COD value of 250 mg/L was injected as fuel at the points indicated by arrows.

(B) Current generation by cell suspension of *A. hydrophila* PA3 in MFCs with different fuel concentration. The fuel cell was run with a resistance of 500 ohm. Yeast extract with COD value of 250 mg/L (dotted line) or 1,260 mg/L (solid line) was injected as fuel to monitor the current generation.

(C) Scanning electron micrograph of the anode from the MFC inoculated by cell suspension of *A. hydrophila* PA3. The electrode was removed after 5 days of operation with yeast extract as fuel

#### 라. Electron transfer inhibitor의 영향

전기화학활성미생물을 포함한 생물연료전지의 음극부에 구성되어 있는 biofilm이 폐수의 유기물을 분해하고 전극으로 전자를 전달하는 mechanism이 electron transfer, 특히 anaerobic respiration의 한 종류일 것으로 생각된다. 일반적으로 진핵생물의 mitochondria의 내막에 존재하는 electron transport system (ETS)에 존재하는 전자전달체가 있으며 세균의 경우 여러 가지 변형된 전자전달체를 갖고 있는 것으로 알려져 있다. 그러므로 ETS inhibitor를 사용해서 생물연료전지에서 일어나는 미생물과 전극간의 전자 전달 시스템을 밝히고자 실험을 하였다 (그림 46).

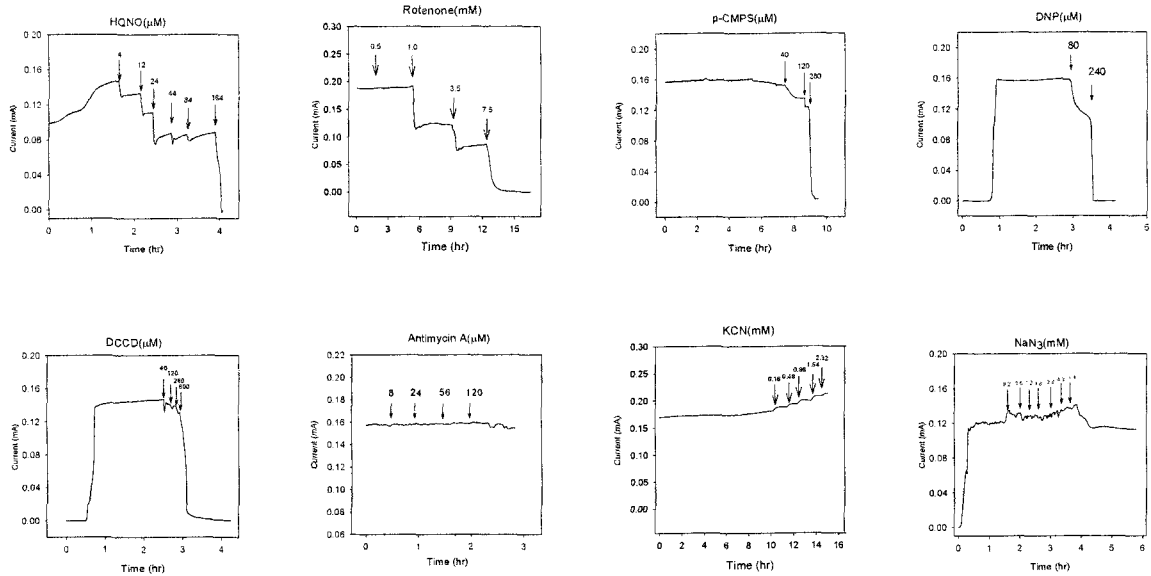


그림 46 Electron transport inhibitor와 ATP synthesis inhibitor의 영향

결과는 전기화학미생물과 전극간의 반응이 anaerobic respiration의 한 종류일 것으로 판단할 수 있다. 전기화학활성 미생물은 NADH로부터 coenzyme Q를 통해 전자를 전달하며 호기성 호흡의 terminal oxidase는 작용하지 않는다는 것을 알 수 있다. 또한 ATP 합성을 저해하는 inhibitor가 작용하는 것으로 보아 이 전자전달 반응은 ATP합성 반응으로 생각된다. 이상의 결과를 토대로 그림 47은 생물연료전지의 전극에 전자를 전달하는 전기화학활성 미생물의 ETS의 모식도와 특정 site에 작용하는 ETS inhibitor를 표시한 것이다.

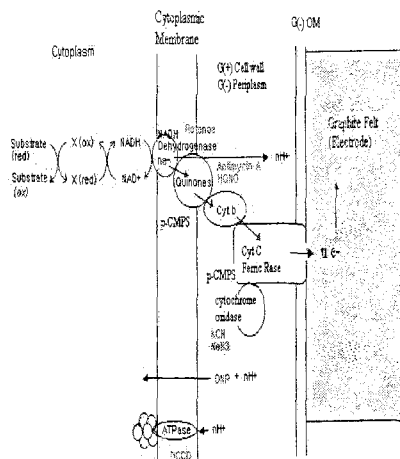


그림 47 전기화학활성 미생물의 전자전달 반응 모식도



## 2. 고찰

폐수 처리용 생물연료전지에서 미생물 또는 미생물이 포함된 biofilm에 분포하고 있는 미생물을 파악하기 위하여 전극에서 genomic DNA를 분리하고 이를 template로 해서 16S rDNA를 증폭, cloning, sequencing 작업을 수행하였다. 생물연료전지는 폐수처리용 cell은 물론이고 생물학적 다양성을 확보하고 이러한 미생물들이 공통적으로 갖고 있는 특정 전자전달체를 찾기 위하여, 전분가공 공정폐수 (실폐수), 인공폐수, 아세트산, surface water 등 다양한 유기물로 운전하는 cell에서 16S gene을 증폭하고 이를 template로 해서 cloning과 sequencing 작업을 수행하였다. 그 결과 전분가공폐수로 운전한 cell에서는 25개, 혐기성 소화조를 접종원으로 사용하고 인공폐수로 운전한 cell에서는 55개, natural surface water를 접종원으로 하고 acetate를 연료로 사용한 cell에서는 44개의 다른 clone을 얻고 이를 library로 구축할 수 있었다. 한편 전극의 일부를 시료로 대상 폐수를 유기물로 하고 여러 전자수용체를 첨가한 고체 배지에서 미생물들을 약 38종 분리하였다. 이 분리군들 중에서 일부는 cyclic voltamogram을 통하여 전기화학적으로 활성이 있음을 확인하였다. 특히 분리군 PA3는 *Aeromonas hydrophila*로 동정되었는데 type strain의 경우에도 동일한 전기화학활성을 보이는 것을 확인하였다. 한편 지금까지 연구실에서 분리한 전기화학활성미생물과 type strain은 거의 비슷한 cyclic voltamogram을 보이는 것으로 보아 전기화학활성 미생물의 특정 전자전달체는 비슷한 물질일 것으로 추정하였다. 이 결과는 앞으로 제2단계 연구에서 전자전달체 분리과정에서 중요한 자료로 이용될 것이다.

제 2단계에서 실시할 중요 연구인 전기화학활성 미생물의 전자전달체의 규명을 본 연구결과에서는 c-type cytochrome일 것임을 ETS inhibitor를 사용하여 알 수 있었다. 이 결과는 미생물의 전기화학활성을 측정하는 방법으로 사용하는 cyclic voltametry를 이용해서 얻은 결과를 분석하면 전기화학활성 미생물의 전자전달체의 redox potential은 표준 산화환원전위 ( $E^0$ ) 기준으로 0V 수준일 것으로 판단된다. 이는 지금까지 알려진 철 환원세균의 c-type cytochrome과는 다를 것으로 생각된다. 본 연구결과는 제 2단계에서 보다 집중적으로 연구할 예정이다

## 제 4 장 목표 달성도 및 관련 분야에의 기여도

### 제 1 절 목표 달성도

본 연구에서는 다음과 같은 연구 세부 목표를 설정하였으며 그에 해당하는 연구를 진행하였다.

번호	세부연구개발목표 (연구계획서상에 기술된 연구목표)	달성내용	달성도 (%)
1	생물연료전지의 최고대사속도 측정 (1차 년도)	- 생물연료전지 각 구성단계 파악 - NCBE cell, 68.1 ppm/h	100
2	폐수처리용 생물연료전지의 이온교환막의 선정 및 사용 (1차 년도)	- 이온 교환막을 제거한 생물연료전지 운전 - 폐수처리용 생물연료전지 운전 성공	100
3	COD 제거에 필요한 산소요구량 및 전달속도 측정 (2차 년도)	- 폐수의 유기물 분해속도에 응답하는 양극부 산소요구량 측정 - 임계산소농도 측정 (6.6 ppm) - 임계산소농도가 낮은 전극 개발 (2.0 ppm 이하)	100
4	폐수처리용 생물연료전지 (1,2차 년도)	- 이온교환막 제거한 폐수처리용 생물연료전지 개발 - 폐수처리용 생물연료전지의 개선 (MLMFC-1,2)	100
5	PCR에 의한 16S rDNA 염기서열분석 (1차 년도)	- 수종의 폐수를 적용한 cell에서 총 128 clone 확인 (전분폐수: 25개, 인공폐수: 55개, acetate: 44개)	100
6	전기화학활성 미생물분리법 개발 (2차 년도)	- 전기화학활성 미생물용 plate (ferric citrate 첨가)	100
7	전기화학활성 미생물 분리 동정 (2차 년도)	- Acetate cell기준: 38 isolates 분리 - 전기화학활성 미생물 5종 동정	100
8	분리균의 전기화학특성 조사 (2차 년도)	- 분리한 전기화학활성 미생물의 CV 양성 반응	100

### 제 2 절 관련 분야에의 기여도

#### 1. 미생물 연료전지 분야

##### 1) 생물연료전지를 구성하는 각 반응단계의 파악 및 최적화 작업

“국가지정연구실사업“의 연구최종 목표인 “폐수처리용 무매개체 생물연료전지”를 개

발하기 위해서는 우선 기본적으로 무대개체 생물연료전지의 구성을 파악할 필요가 있다. 본 연구의 1차년도 (2001.7-2002.7)에서는 이 반응단계들을 5가지로 규정하고 생물연료 전지를 최적화할 수 있는 운전조건을 확립한 바 있다. 이 연구에서 특히 생물학적 산소 요구량이 높은 폐수 (100 ppm이상)에서는 외부저항 (external resistance)이 매우 critical하다는 것을 알았다. 또한 폐수처리 process로 현실화하기 위해서는 음극부와 양극부를 절연시키고 수소이온만을 선택적으로 전달하는 “양이온교환수지 (Nafion membrane)”를 대체할 수 있거나 제외하고 운전해야 함을 파악하였다.

## 2) 폐수처리용 생물연료전지의 개발

앞의 결과를 바탕으로 “mediator- and membrane-less microbial fuel cell”을 폐수 처리용 생물연료전지를 시작으로 제작하였다. 폐수처리용 생물연료전지는 반응기의 하부를 음극부로 상부를 양극부가 되도록 하였으며 폐수처리용으로 사용하기에는 너무 고가 (\$1,000/m<sup>2</sup>)인 Nafion membrane대신에 일정한 zone을 형성하도록 하였다. 운전형식은 up-flow mode로 음극부에 유입된 폐수의 유기물을 분해하고 발생하는 전자를 외부 저항을 통하여 circuit이 형성하도록 구성하였다. 이때 양극부는 효율을 최대화하기 위하여 음극부와 거리를 유동적으로 하거나 혹은 양극부의 재질을 변경하여 다양화할 수 있도록 하였다. 여러 실험을 통하여 폐수처리에 적합하도록 하기 위하여 먼저 음극부에서 처리되고 다시 양극부를 통하여 배출되는 유출수가 환경법규 (10 ppm as BOD)이하가 되는 조건을 찾았다. 앞에서 제작된 시작품이 폐수처리용 process로 가능성을 확인할 수 있었지만 최종 연구 목표에 보다 부합하기 위하여 생물연료전지를 개선하였다. 우선 양극부는 critical oxygen concentration을 낮추기 위하여 백금으로 처리한 graphite를 사용하였다. 한편 음극부와 양극부의 volume ratio는 음극부에서의 폐수처리속도와 유속을 고려하여 제작하였다. 이러한 이유는 음극부에서 폐수가 충분히 처리되지 않게 되면 양극부에서 호기성 미생물에 의해 일부의 폐수가 처리되면서 양극부의 산소농도가 급격히 감소하게 되고 효율적인 생물연료전지를 구성할 수 없었기 때문이다. 이러한 결과를 바탕으로 폐수처리용 생물연료전지의 구조를 개선하고 현재 운전하고 있으며 향후 제2단계 연구가 종료 시 최적화된 구조를 제시할 수 있을 것으로 판단된다.

## 2. 전기화학활성 미생물 분야

### 1) 생물연료전지에서 16S gene clone library 구축과 전기화학 활성 미생물의 분리

폐수 처리용 생물연료전지에서 미생물 또는 미생물이 포함된 biofilm에 분포하고 있는 미생물을 파악하기 위하여 전극에서 genomic DNA를 분리하고 이를 template로 해서 16S rDNA를 증폭, cloning, sequencing작업을 수행하였다. 생물연료전지는 폐수처리용 cell은 물론이고 생물학적 다양성을 확보하고 이러한 미생물들이 공통적으로 갖고 있는

특정 전자전달체를 찾기 위하여, 전분가공 공정폐수 (실폐수), 인공폐수, 아세트산, surface water 등 다양한 유기물로 운전하는 cell에서 16S gene을 증폭하고 이를 template로 해서 cloning과 sequencing작업을 수행하였다. 그 결과 전분가공폐수로 운전한 cell에서는 25개, 혐기성 소화조를 접종원으로 사용하고 인공폐수로 운전한 cell에서는 55개, natural surface water를 접종원으로 하고 aceate를 연료로 사용한 cell에서는 44개의 다른 clone을 얻고 이를 library로 구축할 수 있었다. 한편 전극의 일부를 시료로 대상 폐수를 유기물로 하고 여러 전자수용체를 첨가한 고체 배지에서 미생물들을 약 38종 분리하였다. 이 분리균들 중에서 일부는 cyclic voltamogram을 통하여 전기화학적으로 활성이 있음을 확인하였다. 특히 분리균 PA3는 *Aeromonas hydrophila*로 동정되었는데 type strain의 경우에도 동일한 전기화학활성을 보이는 것을 확인하였다. 한편 지금까지 연구실에서 분리한 전기화학활성미생물과 type strain은 거의 비슷한 cyclic voltamogram을 보이는 것으로 보아 전기화학활성 미생물의 특정 전자전달체는 비슷한 물질일 것으로 추정하였다. 이 결과는 앞으로 제2단계 연구에서 전자전달체 분리과정에서 중요한 자료로 이용될 것이다.

### 3. 생물연료전지를 이용한 BOD 센서의 개발 (IR52 장영실상 수상)

본 연구실에서는 과학기술부 특정연구개발사업 “금속염환원세균을 이용한 무매개체 생물연료전지의 개발”과 기관고유사업 “수질오염물질의 모니터링기술 및 현상연구” 사업에서 얻은 결과를 토대로 생물연료전지를 이용한 BOD 센서를 개발 산업화한 바 있다. BOD 센서는 차 후 생명공학 실용화 사업을 통하여 연속적으로 monitoring할 수 있는 BOD 센서로 개발되었다. 이러한 결과들로부터 본 연구실의 연구책임자는 한국산업기술진흥협회와 매일경제신문사가 공동 주관하는 IR52 장영실상 (2002년도 제30주)을 수상한 바 있다.

여 백

## 제 5 장 연구 개발 결과의 활용계획

### 1. New wastewater treatment process for sludge reduction

생활하수와 같은 폐수를 처리하기 위해서는 사용되는 활성슬러지법은 현재 시설용량 1만톤 이상 하수종말처리장에서 발생하는 슬러지는 2003년 7월부터는 육상매립이 금지(폐기물관리법)되며 1만톤 미만의 하수종말처리장에서 발생하는 슬러지도 전체 발생량의 약 3% (약 16톤)만이 매립이 허용될 예정이다. 차선책으로 해양 투기 등이 강구되고 있으나 이는 심각한 환경오염을 야기 할 수 있다. 현재 소각으로 처리되는 것은 전체 발생량의 약 10% 수준이지만 육상매립의 금지와 해양 투기의 환경오염 문제 등을 고려한다면 향후 소각으로 슬러지를 처리할 것으로 판단된다. 현재 소각으로 처리하기 위해서는 톤당 약 55,000원이 소요되는 것으로 (2001년 환경부 집계자료) 보고 되었지만 이는 100% 고형 슬러지를 대상으로 산출한 금액이고 함수율 약 80%의 슬러지의 운반 및 탈수 등을 고려하면 약 25만원/ton이 소요된다. 하루 서울시 하수슬러지의 발생량이 약 1,848 톤이며 이를 금액으로 환산한다면 1일 기준 4억6천만원이 필요하다. 이를 다시 전국발생량으로 환산할 경우 약 14억원이 소요된다 (2002년 환경부 집계자료). 그러므로 슬러지 감소 효과를 얻을 수 있는 폐수처리장치의 개발은 매우 중요하다.

생물연료전지를 폐수처리 공정으로 이용하게 되면 폐수의 처리와 함께 일부의 에너지를 전기의 형태로 전환할 수 있다. 이때 활성슬러지법으로 폐수를 처리한다면 수소의 산화환원전위 ( $2H^+/H_2$ ,  $-0.42 V$ )를 기준으로 산소를 최종 전자수용체로 사용할 경우 ( $1/2 O_2/H_2O$ ,  $+0.82 V$ ) 약  $1.24 V$ 의 에너지가 나오는데 생물연료전지에서  $0 V$  수준의 전자전달체가 작용한다면 동일한 수소로부터 약 34% 만이 미생물 성장에 필요한 에너지로 전환되고 나머지 66%는 전기로 전환될 수 있다. 그러므로 생물연료전지가 효과적인 폐수처리장치로 개발된다면 막대한 경비를 절감할 수 있으며 한편으로 일부의 전기를 얻을 수도 있게 된다.

### 2. Novel anaerobic respiration in the Microbiology

본 연구에서 생물연료전지에서 분리 동정되는 전기화학활성 미생물들이 자연계에 높은 농도로 분포되어 있을 가능성이 크다. 그렇다면 실제로 이러한 미생물들이 성장할 수 있는 환경과 자연계에서의 역할이 무엇인지를 연구할 필요가 있다. 이는 지금까지 알려진 미생물의 대사에서 혐기성 호흡 (sulfate reduction, metal reduction, methane fermentation, acetogenesis)과 다른 형태의 anaerobic respiration일 가능성이 있다. 만약 이것이 규명된다면 본 연구를 통해서 얻은 결과는 새로운 미생물의 성장 mechanism을 규명하는 연구그룹이 될 수 있을 것이다.

여 백

## 제 6 장 연구개발 과정에서 수집한 해외과학기술정보

본 연구실에서 세계최초로 증명한 “무매개체형 미생물연료전지”는 국가지정 연구실 사업으로 현재 1단계 사업이 종료되는 시점에서 많은 변화를 가져 왔다. 국내적으로는 “9th International symposium on Genetics of Industrial Microorganisms (GIM)”의 Satellite Meeting을 “Microbial Fuel Cell & Bioelectrochemistry”라는 주제로 2002년 7월에 개최한 바 있으며 2003년 6월에는 “한국미생물 생물공학회” symposium에서 동일한 주제로 symposium을 개최한 바 있다. 이와 같이 국내에서는 미생물연료전지가 미생물 생리학과 환경 미생물분야에서 한 분야로 자리를 잡고 있는 실정이다. 국외적으로는 미국의 Massachusetts 대학 (Dr D. R. Lovley)과 Michigan 주립대학 (Dr. J. G. Zeikus)에서 미국 에너지성 (Department of Energy)에서 연구비를 받아 각각 미생물연료전지 연구를 수행하고 있다. 이 중 특히 Massachusetts 대학은 미국 해군성 연구소 (the Naval Research Laboratory, Dr L. Tender)와 공동 연구를 통하여 미생물연료전지의 prototype을 2개 제작하고 이를 marine sediment에서 시험 운행하고 있다. 이 연구 결과의 일부는 2002년에 각각 *Science*와 *Nature Biotechnology*에 투고 게재한 바 있다. 특히 이 연구그룹들은 생물연료전지에서 분포하고 있는 미생물의 중요성을 인식하고 미국의 genome project를 수행하고 있는 The Institute For Genome Research (TIGR)를 통하여 *Geobacter sulfureducens*의 whole genome sequencing 작업을 진행하고 있으며 2003년에 완성을 계획하고 있다. 또한 본 연구그룹에서 미생물과 전극간의 전자전달 현상을 파악하기 위하여 사용한 type strain인 *Shewanella putrefaciens*도 동일한 목적으로 미국 Oak Ridge National Lab. Michigan 주립대학, USC등의 공동 연구로 TIGR와 함께 2002년에 whole genome sequence를 완성하였다. 현재 미국에서 genome projects를 통하여 whole genome sequencing이 완료된 prokaryote (*Archaeobacteria* 포함)이 26 strain 그리고 현재 진행 중인 strain이 48개 인 것을 감안하면 미생물 연료전지를 통하여 연구되었던 strain이 여기에 포함된다는 사실만으로도 그 중요성을 짐작할 수 있다. 현재 국가지정연구실 사업의 제 1단계 (2년) 사업을 통하여 얻은 결과 들은 미생물 연료전지를 폐수 처리 공정으로 이용할 수 있는 연구를 진행하였고 그 가능성을 제시한 바 있다. 이 연구는 세부적으로 미생물 연료전지를 구성하고 있는 반응 단계를 5단계로 구분하고 각각을 분석한 연구 결과와 함께 이를 토대로 양이온교환막을 사용하지 않더라도 미생물 연료전지를 구성하여 폐수처리에 적용할 수 있다는 것이다. 한편 본 연구실에서는 연료인 폐수의 종류를 발효성 기질, 비 발효성 기질, 실 폐수와 surface water등을 사용하여 각각의 연료전지를 운전하고 미생물 연료전지의 전극에 분포되어 있는 미생물의 다양성을 조사하였다. 이 연구 결과는 자연계에 미생물 연료전지를 구성할 수 있는 “전기화학활성 미생물”이 많이 분포되어 있음을 보였다. 그러므로 향후 연구는 이러한 전기화학활성 미생물이 자연계에서 어떤 역할을 하고 있는 지를 규명하는 것이며 이를 위하여 제 2단계 연구에서는 우선 전기화학활성 미생물의 생물학적 다양성과 함께 공통적으로 가지고 있는 특정 전자전달체의 특성을 파악할 수 있는 기초자료를 제공할 계획이다. 이를 통해서



연구의 최종 목표인 “폐수 처리 공정으로 적합한 실험실 규모의 coulomb 효율이 90% 이상인 매개체를 사용하지 않는 미생물연료전지를 개발”하고 이를 위해 연료전지의 구조와 운전 방법을 개선할 계획이다. 또한 1단계 사업 후 평가의견인 슬러지 발생량을 측정하여 미생물 연료전지를 폐수처리 장치로 사용할 경우에 얻을 수 있는 막대한 슬러지 감소효과를 명확하게 제시할 계획이다.

본 연구실이 국가지정연구실 사업으로 제시한 “폐수 및 폐수처리용 활성슬러지를 사용한 생물 연료전지” 특허 (특허 출원 제 1999-27168, 특허 등록번호 33293)가 특허청이 주관하는 2003년도 특허기술상, 충무공상을 수상하였다. 또한 연구책임자는 동일한 연구업적을 바탕으로 2003년도 한국미생물 생명공학회가 주관하는 2003년도 학술상을 시상한바 있다. 그러므로 현재 본 연구그룹이 가지고 있는 미생물 연료전지의 구성과 운전에 관한 know-how는 세계 어느 연구그룹보다 앞서고 있다고 생각된다. 하지만 현재 미국의 여러 연구 그룹과 경쟁관계를 갖고 있으며 본 연구그룹이 수행하고 있는 국가지정연구실 사업은 세계수준에서 경쟁할 수 있는 연구 분야임을 확신할 수 있다.

## 제 7 장 참고 문헌

김병홍, 장인섭, 김형주, 김미아. 저영양성 전기화학 활성 미생물을 이용하는 연료전지형 생화학적 산소요구량 측정기를 이용한 생화학적 저농도 산소 요구량 측정방법. 2001 한국특허출원 01-39947.

김병홍. 생물연료전지를 이용한 저농도 BOD SENSOR의 개발 연구. 2003 금수강산 21 연구프로그램 3차년도 보고서.

Allen R. M. and H. P. Bennetto, 1993. Microbial fuel-cells: electricity production from carbohydrates, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 39,27-40.

Amann, R. I., W. Ludwig, and K. H. Schleifer, 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59:143-169.

American Public Health Association, 1995. Standard methods for the examination of water and wastewater, 19th ed, Washington, DC.

Chang I. S., J. K. Jang, G. C. Gil, M. Kim, H. J. Kim, B. W. Cho and B. H. Kim (in press) Continuous determination of biochemical oxygen demand sensor using a microbial fuel cell type biosensor. *Biosen. Bioelectron.*

Delaney G. M., H. P. Benetto, J. R. Mason, H. D. Roller, J. L. Stirling and C. F. Thurston, 1984, Electron transfer coupling in microbial fuel cells: 2. performance of fuel cells containing selected microorganism-mediator-substrate combinations, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 34B, 13-27.

Gerhardt P., 1993, *Methods for General and Molecular Bacteriology*, American Society for Microbiology, Washington, DC, 803 pp

Gil G. C., I. S. Chang, B. H. Kim, M. Kim, J. K. Jang, H. S. Park and H. J. Kim, 2003, Operating parameters affecting the performance of a mediator-less microbial fuel cell. *Biosen. Bioelectron.* 18, 327-334.

Herbert, D., P.J. Philips and R.E. Strange. 1971. Analysis of microbial cells, p 209-344. *In* J.R. Norris, and D.W. Ribbons (ed.) *Methods in microbiology*. Academic

Press, New York

Jaffari S. A. and A. P. F. Turner, 1997, Novel hexacyanoferrate(III) modified graphite disc electrodes and their application in enzyme electrodes, *Biosen. Bioelectron.* 12, 1-9.

Katz E., I. Wilmer and A. B. Kotlyar, 1999, A non-compartmentalized glucose/O<sub>2</sub> biofuel cell by bioengineered electrode surfaces, *J. Electroanal. Chem.*, 479, 64-68.

Kim, B. H. H. J. Kim, M. S. Hyun and D. H. Park, 1999a. Direct electrode reaction of Fe(III) reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 9, 127-131.

Kim H. J., M. S. Hyun, I. S. Chang and B. H. Kim, 1999b, A microbial fuel cell type lactate biosensor using a metal-reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 1999, 365-367.

Kim B. H., H. S. Park, H. J. Kim, G. T. Kim, I. S. Chang, J. Lee and N. T. Phung. (in press). Enrichment of microbial community generating electricity using a fuel cell type electrochemical cell. *Appl. Microbiol. Biotechnol*

Kim B. H, I. S. Chang, G. C. Gil, H. S. Park and H. J. Kim, 2003, Novel BOD (biological oxygen demand) sensor using mediator-less microbial fuel cell. *Biotechnol. Lett.* 25, 541-545.

Kim H. J., H. S. Park, M. S. Hyun, I. S. Chang, M. Kim and B. H. Kim, 2002, mediator-less microbial fuel cell using a metal reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*. *Enzyme Microb. Technol.* 30, 145-152.

Laane C., W. Pronk, M. Franssen and C. Veeger, 1984, Use of a bioelectrochemical cell for the synthesis of (bio)chemicals, *Enzyme Microb. Technol.*, 6, 165-168.

Lithgow A. M., L. Romero, I. C. Sanchez, F. A. Souto and C. A. Vega, 1986. Interception of electron-transport chain in bacteria with hydrophilic redox mediators, *J. Chem. Res.* 178-179.

Lovley D. R. and E. J. P. Phillips, 1986, Organic matter mineralization with

reduction of ferric iron in anaerobic sediments. Appl. Environ. Microbiol., 51, 683-689.

Myers, C. R. and J. M. Myers, 1992, Localization of cytochromes to the outer membrane of anaerobically grown *Shewanella putrefaciens* MR-1. J. Bacteriol. 174:3429-3438.

Myers, C. R. and J. M. Myers, 1993, Ferric reductase is associated with the membrane of anaerobically grown *Shewanella putrefaciens* MR-1. FEMS Microbiol. Lett. 108, 15-22.

Palmore G. T. R. and H. H. Kim, 1999, Electro-enzymatic reaction of dioxygen to water in the cathode compartment of a biofuel cell, J. electroanal. Chem., 464, 110-117.

Ruzgas T., E. Csoregi, J. Emneus, L. Gorton and G. Marko-Varga, 1996, Peroxidase-modified electrodes: fundamentals and application, Anal. Chim. Acta, 330, 123-138.

Xue J., Y. Xian, X. Ying, J. Chen, L. Wang and L. Jin, 2000, Fabrication of an ultramicrosensor for measurement of extracellular myocardial superoxide, Anal. Chim. Acta, 405, 77-85.

여 백



여 백

# 연구결과 활용계획서

## 1. 연구목표 및 내용

폐수 처리 공정으로 적합한 실험실 규모의 coulomb 효율이 90%이상인 매개체를 사용하지 않는 미생물연료전지를 개발하는 것을 최종 목표로 하고 이를 달성하기 위해 연료전지의 구조와 운전 방법을 개선하고 전기화학활성 미생물의 특성과 세포 표면 전자전달체의 특성을 규명한다.

## 2. 연구수행결과 현황 (연구종료시점까지)

### 가. 특허(실용신안) 등 자료목록

구분	국명	특허제목	출원자	출원번호	출원년 월	등록 번호	등록년 월
특허-1	한국	저농도 생화학적 산소요구량 계측기용 미생물연료전지 및 이를 이용한 저농도 생화학적 산소요구량 계측기	김병홍, 장인섭, 강귀현, 장재경, TH Pham	03-24708	2003.04.1		
특허-2	한국	양이온 교환막이 없는 무매개체 미생물 연료전지	김병홍, 장인섭, 장재경, 김근철	02-26351	2002.05.1		
특허-3	PCT	Membrane-, mediator-less microbial fuel cell	김병홍, 장인섭, 장재경, 김근철		2003.05.14		
특허-4	한국	미생물연료전지를 이용한 폐수의 바이오닉 연속 모니터링	김병홍, 장인섭, 김미아	02-26739	2002.05.1		
특허-5	한국	저영양성 전기화학 활성 미생물을 이용하는 연료전지형 저농도 생화학적 산소요구량 측정기	김병홍, 장인섭, 김형주, 김미아	01-69947	2001.11.1		
특허-6	중국	A biofuel cell using wastewater and active sludge for wastewater treatment	김병홍, 장인섭, 현문식, 김형주, 박형수	00810805.6	2002.01.24		
특허-7	캐나다	A biofuel cell using wastewater and active sludge for wastewater treatment	김병홍, 장인섭, 현문식, 김형주, 박형수		2002.01.07		
특허-8	EP	A biofuel cell using wastewater and active sludge for wastewater treatment	김병홍, 장인섭, 현문식, 김형주, 박형수	00 911 467.9	2002.01.16		
특허-9	중국	An electrochemical method for enrichment of microorganisms a biosensor for analyzing organic substance and BOD	김병홍, 장인섭, 현문식, 김형주, 박형수	008009995.2	2002.01.31		
특허-10	미국	An electrochemical method for enrichment of microorganisms a biosensor for analyzing organic substance and BOD	김병홍, 장인섭, 현문식, 김형주, 박형수	PCT/KR001 00230	2002.2.24		
특허-11	캐나다	An electrochemical method for enrichment of microorganisms a biosensor for analyzing organic substance and BOD	김병홍, 장인섭, 현문식, 김형주, 박형수		2002.01.07		
특허-12	EP	An electrochemical method for enrichment of microorganisms a biosensor for analyzing organic substance and BOD	김병홍, 장인섭, 현문식, 김형주, 박형수	00 913 115.2	2001.12.31		
특허-13	한국	미생물의 전기화학적 농화배양 방법 및 BOD분석용바이오센서	김병홍, 장인섭, 현문식, 김형주, 박형수			30361	2001.07.12
특허-14	한국	폐수 및 폐수처리용 활성슬러지를 사용한 생물연료전지	김병홍, 장인섭, 현문식, 김형주, 박형수			33293	2002.04.03



나. 프로그램 등록목록

다. 노하우 내역

라. 발생품 및 시작품 내역

마. 논문게재 및 발표 실적

구분	논문제목	저자	학술지명	제출 일	발행년도 권호	발행기관 (국명)	SCI 여부
논문-1	Operating parameters affecting the performance of a mediator-less microbial fuel cell	길근철, 장인섭, 김병홍, 김미아, 장재경, 박형수, 김형주	Biosensors & Bioelectronics	2002.10	2003.18	Elsevier (영국)	○
논문-2	A mediator-less microbial fuel cell using a metal reducing bacterium, <i>Shewanella putrefaciens</i>	김형주, 박형수, 현문식, 장인섭, 김미아, 김병홍	Enzyme and Microbial Technology	2001.4	2002.30	Elsevier (영국)	○
논문-3	A novel electrochemically active and Fe(III) reducing bacterium phylogenetically related to <i>Clostridium butyricum</i> isolated from a microbial fuel cell	박형수, 김병홍, 김효숙, 김형주, 김광태, 김미아, 장인섭, 박용근, 장효일	Anaerobe	2001.3	2001.7	Academic press (영국)	○
논문-4	Novel BOD (biological oxygen demand) sensor using mediator-less microbial fuel cell	김병홍, 장인섭, 길근철, 박형수, 김형주	Biotechnology Letters	2002.12	2003.25	Kluwer (영국)	○
논문-5	Continuous determination of biochemical oxygen demand using a microbial fuel cell type novel biosensor	장인섭, 장재경, 길근철, 김형주, 김미아, 조병원, 김병홍	Biosensors & Bioelectronics	2003.1	In press	Elsevier (영국)	○
논문-6	Use of acetate for enrichment of electrochemically active microbes and their 16S rDNA analyses	이지영, TN Phung, 장인섭, 김병홍, 성하진	FEMS Microbiology Letters	2003.4	2003.8	Elsevier (영국)	○
논문-7	A novel electrochemically active and Fe(III)-reducing bacterium phylogenetically related to <i>Aeromonas hydrophila</i> , isolated from a microbial fuel cell	CA Pham,, 정성제, TN Phung, 이지영, 장인섭, 김병홍, 이하나, 천종식	FEMS Microbiology Letters	2003.3	2003.8	Elsevier (영국)	○
논문-8	A microbial fuel cell with improved cathode reaction as a low biological oxygen demand sensor	강귀현, 장재경, TH Pham,, 문현수, 장인섭, 김병홍	Biotechnology Letters	2003.4	2003.8	Elsevier (영국)	○
논문-9	Dynamic characteristics of a microbial fuel cell as a continuous biochemical oxygen demand sensor	문현수, 장인섭, 강귀현, 장재경, 김병홍	Enzyme and Microbial Technology	2003.3	In review	Elsevier (영국)	○
논문-10	Enrichment of microbial community generating electricity using a fuel cell type electrochemical cell	김병홍, 박형수, 김형주, 김광태, 이지영, TN Phung	Applied Microbiology and Biotechnology	2003.3	In press	Springer (독일)	○
논문-11	Construction and operation of a novel mediator- and membrane-less microbial fuel cell.	장재경, TH Pham, 장인섭, 강귀현, 문현수, 김병홍	Process Biochemistry	2003.3	In press	Elsevier (영국)	○
논문-12	Cathode reaction in a mediator-less microbial fuel cell with graphite or platinum-coated graphite as the cathode	TH Pham, 장재경, 장인섭, 김병홍	Journal of Microbiology and Biotechnology	2003.1	In review	Elsevier (영국)	○

○ 학술회의 발표 실적

구분	학술발표제목	발표자	발표장소 (국명)	일시
발표-1	Mediator-less microbial fuel cells (Plenary Lecture)	김병홍	Fed. Asia-Pacific Microb. Soc. Congress Kuala Lumpur (Malasia)	October 15-18, 2003
발표-2	Mediator-less microbial fuel cell using electrochemically active microbes	장인섭, 김병홍	무주리조트(한국)한국미생물생명공학회	2003.6.25
발표-3	Phylogenetic analysis of microbial population in a mediator-less microbial fuel cell enriched with acetate	김병홍	FEMS Congress, Ljubljana, (Slovenia)	June 29- July 3, 2003
발표-4	Mediator-less microbial cell and beyond	김병홍	KAIST 정기 세미나 과학기술원 (한국)	June 4, 2003
발표-5	Enrichment of electrochemically active bacteria using acetate as fuel and acetate oxidation in a fuel cell-type device	이지영, NTPhung, 장인섭, 김병홍, 성하진	한국미생물학회 강원대학교(한국)	May 2-3, 2003
발표-6	Improvement of cathode reaction in microbial fuel cell	THPham, 장재경, 장인섭, 김병홍	ASM, Washington DC (USA)	May 18-22, 2003
발표-7	Construction and optimization of a membrane-less microbial fuel cell	장재경, THPham, 강귀현, 문현수, 장인섭, 김병홍	ASM, Washington DC (USA)	May 18-22, 2003
발표-8	Microbial cell and beyond	김병홍	KJIST 정기세미나, 광주과학기술원 (한국)	March 27, 2003
발표-9	A primary study on the microbial population in an acetate-fed mediator-less microbial fuel cell	CAPham,, 정성제, 이지영, NTPhung, 김병홍	GIM2002, Gyeongju (한국)	July 1, 2002
발표-10	Diversity of Microbial population in a mediator-less microbial fuel cell	NTPhung, 박형수, 이지영, 김병홍	GIM2002, Gyeongju (한국)	July 1, 2002
발표-11	A membrane-less microbial fuel cell	장재경, 장인섭, 조경숙, 김병홍	GIM2002, Gyeongju (한국)	July 1, 2002
발표-12	Mediator-less microbial fuel cells operated by acetate wastewater	이지영, 김병홍, 성하진	GIM2002, Gyeongju (한국)	July 1, 2002
발표-13	Enrichment of oligotrophs using a microbial fuel cell to monitor low BOD value	강귀현, 이지영, 장인섭, 정성제, 김병홍	GIM2002, Gyeongju (한국)	July 1, 2002
발표-14	Improvement of cathode reaction of the mediator-less microbial fuel cell	THPham,, 김병홍	GIM2002, Gyeongju (한국)	July 1, 2002
발표-15	A mediator-less microbial fuel cell, enrichment and optimization	김병홍	GIM2002, Gyeongju (한국)	July 1, 2002
발표-16	A membrane-less microbial fuel cell using an electrochemically active enrichment culture	장재경, 장인섭, 이지영, 정성제, 조경숙, 김병홍	IUMS, Paris (France)	August, 2002
발표-17	A mediator-less microbial fuel cell enriched with oligotrophs as a low BOD sensor	이지영, 정성제, 장인섭, 장재경, 성하진, 김병홍	IUMS, Paris (France)	August, 2002
발표-18	Use of acetate as fuel in a microbial fuel cell	김병홍, 이지영, 장인섭, 김미아	ASM, Salt Lake City (USA)	May, 2002
발표-19	A Mediator-less Microbial Fuel Cell as Biosensor to Measure Biochemical Oxygen Demand (BOD)	김병홍, 장인섭	Int. Sensor Conference, Seoul (Korea)	October, 2001
발표-20	Continuous Determination of BOD in Wastewater Using Microbial Fuel Cell Type of Novel Biosensor	장인섭, 장재경, 김미아, 김근철, 김병홍	Int. Sensor Conference, Seoul (Korea)	October, 2001

3. 연구성과

연도	수상명 (수상자)	수상내용
2002	IR52 장영실상 (김병홍)	생물연료전지를 이용한 바이오디젤측기
2003	미생물생명공학회 학술상 추천 (김병홍)	생물연료전지 개발
2003	특허기술상 충무공상(김병홍외 4인)	폐수처리용 미생물연료전지개발

4. 기술이전 및 연구결과 활용계획 :2 단계 연구종료시

## 5. 기대효과

### 가. 기술적 측면

**폐수처리** : 기존의 활성오니법과 비교하여 처리시간이 짧고 오니의 발생량을 1/3 이하로 줄일 수 있는 새로운 공정 개발. 이 때 발생하는 전기로 폐수 처리장을 운전할 수 있음.

**BOD 계측기** : 성능이 향상된 정밀 계측기로 개량.

**파급 효과** : 세포 표면 전자전달체의 전기화학적 특성의 규명으로 산화-환원 효소를 이용하는 생물전기화학합성에 필수적인 co-factor generation 기술 개발의 기초를 다질 수 있으며, 다음 세대 computer의 주 기능을 담당할 biochip 개발의 기초로 활용할 수 있다.

### 나. 경제·산업적 측면

**폐수처리** : 본 연구의 성공적인 종료로 현장에 적용할 공정이 개발되는 것이 아니어서 경제적 성과를 정량화하기는 어려움. 그러나 획기적인 폐수 처리 공정을 국내 기업에 이전하여 세계 시장을 석권할 수 있을 것으로 판단함. 특히 오니의 발생량을 1/3 이하로 줄여 2차 환경 오염을 줄일 수 있다. 이 경우 우리 나라 전체 폐수 처리에서 발생하는 오니 처리비용을 16억원/일 절감할 수 있다.

**BOD 계측기** : 세계 최고의 계측기로 개량하여 수입을 완전히 대체하고 년 US\$20,000,000 이상의 수출을 기대함.

**파급 효과** : 생물공학을 나노공학에 접목시켜 새로운 산업으로 육성할 수 있다.

## 6. 문제점 및 건의사항

없음

[첨부2]

## 기술 요약서

■ 기술의 명칭

미생물 연료 전지 기술, 폐수처리 기술, 전기화학활성 미생물 배양 기술
---

■ 기술을 도출한 과제현황

과제관리번호	M1-0104-00-0024			
과제명	특정연구개발사업			
사업명	국가지정연구실사업			
세부사업명	폐수처리를 위한 무매개체 미생물연료전지의 개발			
연구기관	한국과학기술연구원	기관유형	정부 출연연구소	
참여기관(기업)				
총연구기간	2001. 7. 11 - 2003. 7. 10			
총연구비	정부(681,882)천원    민간(0)천원    합계(681,882)천원			
연구책임자 1	성명	김 병 흥	주민번호	450406-1025014
	근무기관 부서	한국과학기술연구원 수질환경 및 복원	E-mail	bhkim@kist.re.kr
	직위/직급	책임연구원	전화번호	02-958-5831
연구책임자 2	성명		주민번호	
	근무기관 부서		E-mail	
	직위/직급		전화번호	
실무연락책임자	성명	장 인 섭	소속/부서	한국과학기술연구원 수질환경 및 복원
	직위/직급	연구원	E-mail	ischang@kist.re.kr
	전화번호	02-958-5841	FAX	02-958-5839
	주소	(136-791) 서울시 성북구 하월곡동 39-1		

## ■ 기술의 주요내용

### [기술의 개요]

본 연구에서는 미생물연료전지 형태의 폐수처리 장치를 만들고자 한다. 이를 위해서는 먼저 미생물연료전지의 대사속도를 측정하고 각 구성단계를 파악할 필요가 있다. 구성을 파악한 미생물연료전지는 폐수처리장치에 적합한 형태로 제작을 한다. 특히 연료전지에서 반드시 필요하다고 알려진 양이온교환막을 대체하거나 제거한 형태의 폐수처리용 미생물연료전지가 필요하다. 또한 전극으로 사용하고 있는 graphite의 재질 변화를 통하여 양극부에서는 임계산소농도를 낮추는 방법을 추진한다. 또한 부서지기 쉬운 graphite felt를 대체할 전극도 탐색한다. 한편 미생물연료전지의 음극부에 존재하고 있는 미생물의 다양성을 분자생물학적인 방법으로 조사한다. 또한 전기화학적으로 활성이 있다고 알려진 미생물을 분리하고 이들 미생물들의 전기화학활성과 이에 관여하는 전자전달체의 특성을 제 2단계 연구에서 규명한다.

### <기술적 특징>

- (1) 미생물 연료전지를 이용한 신개념의 폐수처리 기술
- (2) 폐수처리와 함께 전기 발생 기술
- (3) 슬러지 저감 기술
- (4) 난배양성 미생물 배양 기술

### [용도 · 이용분야]

- (1) Wastewater treatment 기술
- (2) Microbial fuel cell 기술
- (3) Electrochemically active bacteria 배양 기술





■ 기술의 개발단계 및 수준

[기술의 완성도] (1개씩 선택(√호 표시)하여 주십시오)

	① 기초, 탐색연구단계 : 특정용도를 위해 필요한 신 지식을 얻거나 기술적 가능성을 탐색하는 단계
√	② 응용연구단계 : 기술적 가능성의 실증, 잠재적 실용화 가능성의 입증 등 실험실적 확인 단계
	③ 개발연구단계 : Prototype의 제작, Pilot Plant Test 등을 행하는 단계
	④ 기업화 준비단계 : 기업화에 필요한 양산화 기술 및 주변 기술까지도 확보하는 단계
	⑤ 상품화 완료단계

[기술의 수명주기] (1개씩 선택(√호 표시)하여 주십시오)

	① 기술개념 정립기 : 기술의 잠재적 가능성만 있는 단계
√	② 기술실험기 : 기술개발에 성공했으나 아직 실용성, 경제성 등이 확실치 않은 단계
	③ 기술적용 시작기: 최초의 기술개발국에서만 활용되고 있는 단계
	④ 기술적용 성장기: 기술개발국 및 일부 선진국에서 활용되고 있는단계
	⑤ 기술적용 성숙기: 선진국사이에서 활발한 기술이전이 일어나며, 기술의 표준화가 되어가는 단계
	⑥ 기술적용 쇠퇴기: 선진국에서 개도국으로 기술이전이 활발하게 일어나고, 선진국에서는 기술의 가치가 저하되나, 개도국에서는 아직 시장의 가치가 높은 기술

[기술발전 과정상의 기술수준] (1개씩 선택(√호 표시)하여 주십시오)

	① 외국기술의 모방단계 : 이미 외국에서 개발된 기술의 복제, reverse Eng.
	② 외국기술의 소화·흡수단계 : 국내시장구조나 특성에 적합하게 적응시킴
	③ 외국기술의 개선·개량단계 : 성능이나 기능을 개선시킴
√	④ 신기술의 혁신·발명단계 : 국내 최초로 개발

■ 본 기술과 관련하여 추가로 확보되었거나 개발중인 기술

[ 기술개요]

기술명	
개발단계	<input type="checkbox"/> 연구개발 계획 <input type="checkbox"/> 연구개발 중 <input type="checkbox"/> 연구개발 완료
기술개요	

[ 기술을 도출한 과제현황]



과제관리번호			
과제명			
사업명			
세부사업명			
연구기관		기관유형	
참여기관(기업)			
총연구기간			
총연구비	합계 : (            )백만원 - 정부 : (            )백만원    민간 : (            )백만원		
연구책임자	소속		성명
	전화번호		E-mail
연구개발 주요내용			