

수소생산을 위한 *Enterobacter cloacae* YJ-1의 배양조건

이 기 석 · † 강 창 민 · 정 선 용

전남대학교 공과대학 환경공학과, ¹초당대학교 공과대학 환경공학과

(접수 : 2004. 9. 14., 게재승인 : 2004. 12. 2.)

Culture Conditions for Hydrogen Production of *Enterobacter cloacae* YJ-1

Ki-Seok Lee, Chang-Min Kang[†], and Seon-Yong Chung

Department of Environmental Engineering, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

¹Department of Environmental Engineering, Chodang University, Muan, Chonnam 534-701, Korea

(Received : 2004. 9. 14., Accepted : 2004. 12. 2.)

We investigated the effective culture conditions of anaerobic bacteria, *Enterobacter cloacae* YJ-1 on hydrogen production. It was cultured with 60 mL of working volume at 35°C, 120 rpm for 40 h. With culture time, hydrogen production and cell growth increased, but residual glucose and pH decreased. When the 2% of glucose was used as single carbon source, hydrogen production was 975.1 mL/L. To enhance hydrogen productivity, mixed carbon sources of glucose and sucrose were added. The maximum hydrogen production was earned at the mixing ratio of 25:75, and it was 1319.5 mL/L. When we added 50 mM of phosphate to protect the pH drop in culture broth, hydrogen production increased 1.3 times more than that of initial concentration. The organic nitrogen sources were more effective than inorganic nitrogen for hydrogen production. Among organic nitrogen, yeast extract was the most effective and its hydrogen production was 1691.3 mL/L. Among 9 of mineral sources, Ferric citrate and NaMoO₄ were especially effective, and their productions were 1782.3 mL/L and 1784.8 mL/L, respectively.

Key Words : Hydrogen production, organic acid, inhibition, mixed carbon sources

서 론

석탄, 석유, 가스 등과 같은 화석연료의 고갈로 인하여 전 세계적으로 이미 수차례에 걸쳐 에너지 위기를 야기시키고 있다. 뿐만 아니라 연소시 발생하는 이산화탄소는 지구온난화의 주원인으로 지목되고 있다. 이와 같은 관점에서 볼 때 바이오매스 자원은 화석자원과는 달리 무공해 에너지임과 동시에 무한 재생성의 산업원료이다(1-3). 바이오매스 자원으로부터 생물학적 방법으로 생산되는 수소는 효율이 높고 수송과 저장이 용이한 미래 청정에너지원으로 주목되고 있다(4).

현재 수소생산을 위해 시도되고 있는 생물학적 방법은 크게 혐기성 박테리아에 의한 환원당의 발효와 광합성 박

테리아를 사용한 물의 광분해가 있다(5, 6). 이 두 방법 간에는 관여 미생물, 수소발생 기작, 배양조건 및 기질이용 효율 등에서 상당한 차이가 있다(7, 8). 혐기성 박테리아에 의한 수소생산의 경우에는 광에너지를 필요로 하지 않기 때문에 소규모 시설로 수소생산이 가능하다는 이점을 가지고 있다(9-11). 혐기성 박테리아는 발효조건에서 탄수화물을 이용하여 배양액 중에 각종 유기산, 유기용매를 축적하고 동시에 수소와 이산화탄소를 발생한다. 생성되는 발효산물의 종류와 비율은 초기 배양조건인 pH, 온도, 기질의 종류와 농도, 무기물의 농도 등에 영향을 받는다(12, 13). 그 외에도 발효과정에서 생성된 대사산물인 유기산과 유기용매에서도 수소생산에 영향을 준다. 혐기성 박테리아를 이용하여 고농도 유기성 폐수로부터 청정 에너지와 여러 가지 산업원료 물질로 전환시키는 연구가 넓게 시도되고 있으며 수소생산능을 개선할 목적으로 고정화 기술, 반응기 형태, 폐수이용 등 많은 연구가 진행 중이다(14, 15). 더욱이 혐기성 박테리아에 의해 수소생산의 효율증대와 전자공여체의 유효이용, 그리고 장기간 지속적인 생산을 위하여 세포생육과 효소활성의 유지로서 적절한 탄소원과

† Corresponding Author : Department of Environmental Engineering, Chodang University, Muan, Chonnam 534-701, Korea

Tel : +82-61-450-1266, Fax : +82-61-450-1266

E-mail : cmkang@chodang.ac.kr

질소원을 함유한 배지의 공급이 필요하다.

본 연구에서는 수소생산능을 향상시키기 위하여 *Enterobacter cloacae* YJ-1을 이용한 수소생산에 영향을 미치는 이들 주요조건들을 검토하여 배양의 최적화를 기하고자 하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양방법

본 실험에서 사용한 균주는 *Enterobacter cloacae* YJ-1 균주이다(16). 균주배양에 사용한 기초배지는 1 L에 yeast extract 1.0 g, ethanol 0.5 mL, disodium succinate 1.0 g, ferric citrate solution (0.1%) 5 mL, KH₂PO₄ 0.5 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.4 g, NaCl 0.4 g, CaCl₂ · 2H₂O 0.05 g, NH₄Cl 0.4 g, CaCl₂ · 2H₂O 0.05 g, Trace element solution 0.1 mL의 조성으로 이루어졌다. Trace element solution은 1 L당 ZnSO₄ · 7H₂O 0.1 g, MnCl₂ · 4H₂O 0.03 g, CoCl₂ · 6H₂O 0.02 g, NiCl₂ 6H₂O 0.02 g, NaMoO₄ · 2H₂O 0.03 g이다 배양배지는 100 mL crimp top 바이얼에 60 mL을 working volume으로 하여 35°C 그리고 120 rpm의 조건에서 실험을 수행하였다.

분석방법

배양 중 발생하는 가스는 바이얼에 포집되었으며, 수소 함량은 바이얼의 head space 가스를 gas tight syringe로 0.2 mL 취하여 gas chromatography (Shimadzu, GC-14B)로 분석하였다. 사용된 column은 300 mm × 200 mm (길이 × 지름) glass로 molecular sieve 5A (supel. Inc)를 충전물질로 사용하였으며, thermal conductivity detector (TCD)로 분석하였다. 수소분석의 조건은 column 온도 80°C, injector 온도 100°C, detector 온도 120°C이었으며, carrier gas는 argon으로 flow rate는 35 mL/min으로 유지하였다. 배양액 내에 잔존하는 glucose를 정량하기 위하여 배양액을 0.45 µm syringe filter (Whatman, England)로 여과시켜 균체를 제거시켰다. Glucose 농도는 enzyme method (Glucose-E kit, Yong Dong, Korea)에 의해 측정하였다. 균주의 성장은 spectrophotometer (Beckman USA.)를 사용하여 660 nm에서 그 흡광도를 측정하였다. 배양액의 pH는 pH meter (Orion, model 420A)로 실온에서 측정하였다.

결과 및 고찰

수소생산에 미치는 단일당의 영향

Fig. 1에서는 단일당으로 glucose를 이용하여 배양시간에 따른 수소생산을 나타내었다. 초기 0.5% glucose를 이용하였을 때 수소생산은 세포성장과 같이 8시간부터 급격히 증가하다가 30시간에서 거의 정지하여 총 수소생산량은 415.9 mL이었다. 잔존 glucose는 수소생산과 반대인 양상을 보여 30 시간에 거의 전량이 소모됨을 확인할 수 있었다. 따라서 기질 이용성을 증가시키기 위하여 glucose 농도를 0.5%에서 5%까지 점차 증가시켜 기질농도에 따른 수소생산을 Fig. 2에서 보여준다. 초기 glucose 농도가 증가함에 따라 수소생산도 같이 증가하여 최대의 수소는 2%에서 나

타났으며 생산된 수소는 975.1 mL이었다. 그 이상의 농도에서는 수소생산이 증가하지 않았다. 이는 glucose의 발효가 진행됨에 따라 고농도의 기질에서 더 많은 catabolite repression가 일어나기 때문에 세포성장에 더 많은 저해가 있게된다(17). 비슷한 결과로 수소생산능력 또한 감소하게 된다. Fig. 3은 본 연구에 사용된 균주 배양으로부터 생성된 발효가스를 연소한 것으로 불꽃을 육안으로 확인할 수 있었다. Fig. 4는 위에 얻어진 최적 탄소원 농도로 하여 다양한 탄소원에 따른 수소생산능을 비교하였다. 시험된 탄소원은 glucose, sorbitol, galactose, sucrose로서 이들의 수소생산량을 비교한 결과 각각 975.1 mL, 310.3 mL, 770.6 mL, 1068.6 mL이었다. Glucose와 sucrose가 비교적 다른 탄소원보다 더 높은 생산량을 보였다. 일반적으로 수소생산의 특성은 균주, 기질이용 그리고 대사의 다양성에 따라 많은 차이가 있는 것으로 보고되고 있다(18).

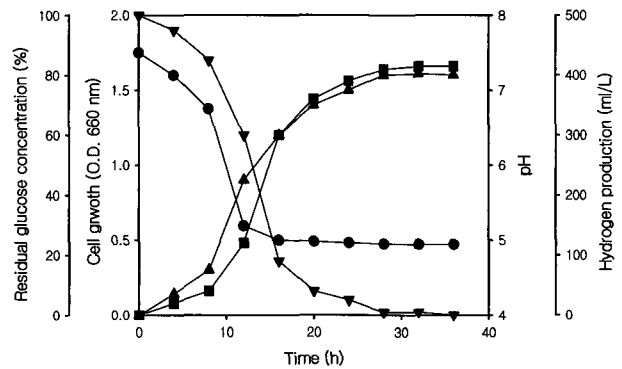


Figure 1. Time courses on residual glucose concentration, cell growth, pH and hydrogen production with 0.5% glucose concentration. ▼ : residual glucose concentration, ▲ : cell growth, ● : pH, ■ : hydrogen production.

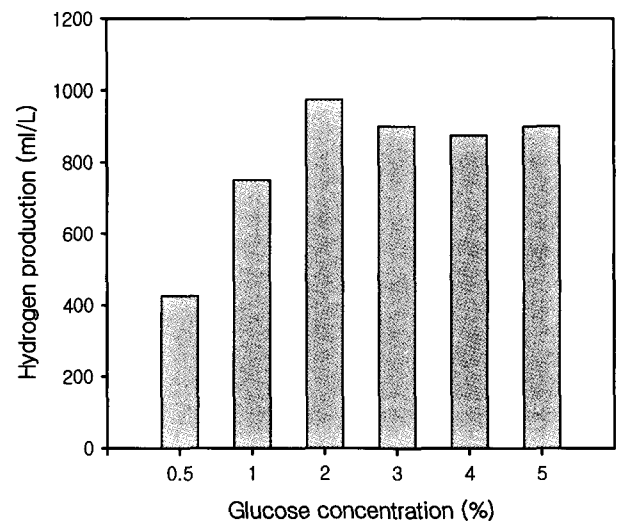


Figure 2. Effects of glucose concentration on hydrogen production.

수소생산에 미치는 혼합당의 영향

위의 단일당 실험으로 glucose 농도가 2% 이상일 때

catabolite repression 현상이 일어나 수소생산을 저해하였다. 수소생산량은 사용한 탄소원의 종류에 따라 다를 수 있지만 일정농도까지는 증가하다가 그 이상의 농도에서는 catabolite repression으로 인하여 감소됨을 알 수 있었다.



Figure 3. Demonstration of combustion using hydrogen produced by *E. cloacae* YJ-1.

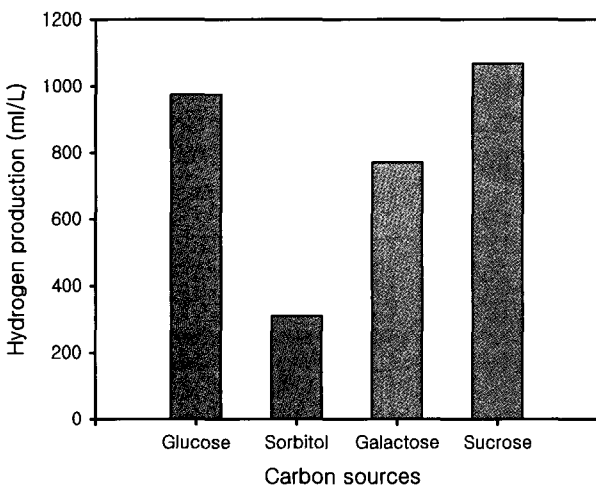


Figure 4. Effects of carbon sources on hydrogen production.

Fig. 5에서는 glucose와 sucrose를 혼합하였을 때 catabolite repression 현상을 알아보기 위하여 탄소원의 혼합비에 따른 수소생산의 영향을 조사하였다. Glucose와 sucrose의 혼합당 농도를 2%로 결정하였다. Sucrose 비율이 증가할수록 수소생산이 약간 증가하여 glucose와 sucrose 비가 25 : 75일 때 가장 높아 1319.5 mL/L을 생산하였다. 혼합당을 이용하여 다양한 목적산물을 증가시키는 연구가

많이 진행되고 있는데 이 결과는 Son 등이 탄소원으로 glucose와 fructose의 혼합하여 좋은 수율을 얻었다는 보고와 상이하였다(19). Kim 등(20)은 각 다른 기질을 혼합하여 경쟁적 저해효과를 고려함으로써 catabolite repression을 완화하였다고 보고하였다. 혼합당을 이용함으로써 효율적인 수소생산 얻어져 다음 실험에서는 최적 혼합당의 비로 수행하였다.

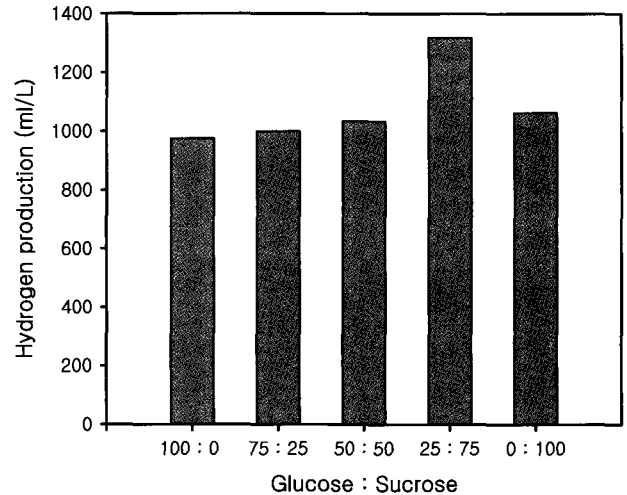


Figure 5. Effects of mixed carbon sources based on the ratio of glucose to sucrose on hydrogen production.

수소생산에 미치는 인산염의 영향

회분식 배양에서 초기 주어진 배지가 증식의 개시에는 적당할지라도 그 후의 세포성장은 그 생물 자체의 대사산물로 인해 초래되는 화학적 변화에 의해 심각하게 제한될 수 있다. 수소생산 박테리아에 의해 탄소원의 발효가 진행되면 배양액에 부산물로 각종 유기산이 생성하게 된다. 생성된 유기산은 배양액의 pH를 급격히 낮추어 세포성장을 저해하기 때문에 수소생산능을 감소시키는 원인이 된다. 따라서 pH를 완화하기 위하여 완충제로서 인산염을 첨가하였다. Fig. 6은 인산염을 5 mM에서 300 mM까지 농도범위로 첨가하여 수소생산량을 조사하였다. 그 결과로서 50 mM에서 초기농도보다 1.3배 향상되는 결과를 보여 그 생산량은 1664.7 mL이었다. 세포성장 또한 가장 높은 수준을 보였다. 다른 결과로 pH는 초기에서부터 계속적으로 증가하는 경향을 보였다. 인산염은 비교적 미생물에게 유독하지 않고 중성 근처의 생리적으로 중요한 범위에서 완충작용을 하는 유일한 무기물로 알려진다. 하지만 인산염은 높은 농도에서는 성장을 저해하므로 배지에 사용될 수 있는 완충제의 양은 특정생물체의 내성에 의해 제한될 수 있다.

수소생산에 미치는 질소원의 영향

앞의 실험에서 얻어진 최적 탄소원의 비와 인산염의 농도를 기초로 하여 질소원이 수소생산에 미치는 영향을 조사하였다. Table 1은 각종 질소원의 농도를 0.5%로 하였을 때 수소생산량을 나타내었다. 무기질소원의 경우 NH₄NO₃를 제외하고 비교적 많은 양의 수소가 생산되었다. 이들

중 가장 생산량이 많은 무기질소원은 NH_4Cl 로 1559.8 mL을 생산하였다. 이 결과는 Williams 등(21)이 무기질소원으로 NH_4Cl 을 첨가하여 가장 좋은 수율을 얻었다는 보고와 일치하였다. 세포성장 또한 수소생산과 비슷한 결과를 주었다. 유기질소원의 경우, 수소생산은 무기질소원보다 모두 높은 수준을 보여 가장 좋은 질소원은 yeast extract로서 총 1691.3 mL를 생산하였다. 세포성장도 역시 무기질소원에 비해 높게 나타났다. 이 결과로서 무기질소원 배지에는 yeast extract와 malt extract와 같은 복합질소원에 함유되어 있는 아미노산, 비타민 등이 없기 때문에 유기질소원 배지보다 수소생산량이 더 낮다는 것을 알 수 있었다. 또한 Fang과 Cheng 등(22)에서도, 무기질소원보다는 유기질소원에서 더 좋은 수율을 얻었다는 보고와 일치하였다. 따라서 다음 실험에는 질소원으로 가장 좋은 yeast extract를 선정하였다. 실질적으로 대량배양시에 고가인 yeast extract와 비교하여 NH_4Cl 에서도 비교적 높은 생산량을 주었기 때문에 적절한 무기질소원을 선정하면 대체 질소원으로서 가할 수 있다고 사료된다.

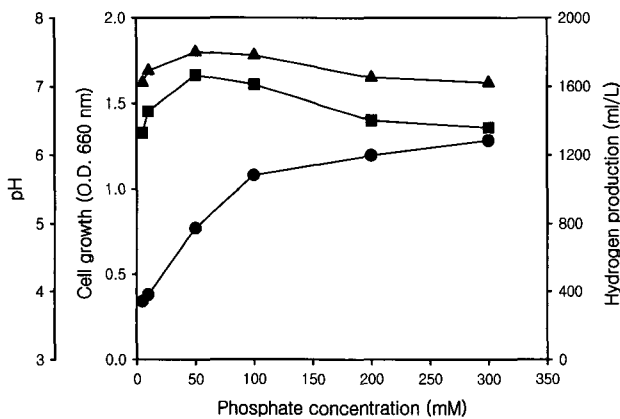


Figure 6. Effects of phosphate concentration on hydrogen production. ● : pH, ▲ : cell growth, ■ : hydrogen production.

Table 1. Effects of various nitrogen sources on hydrogen production

Compounds	Cell growth (O.D. 660 nm)	Hydrogen production (mL/L)
Inorganic nitrogen		
NH_4Cl	1.96	1599.8
KNO_3	1.87	1447.8
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.82	1572.7
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	1.76	1553.4
NH_4NO_3	1.51	92.3
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	1.71	1530.2
NaNO_2	1.53	1231.2
Organic nitrogen		
Yeast extract	2.03	1691.3
Tryptone	1.81	1599.8
Beef extract	1.98	1630.1
Malt extract	1.93	1643.7
Bactopeptone	1.82	1622.6

최적조건하에서 미네랄의 영향

미생물에 의한 산물 생산시 Fe, Zn, Mn, Cu, SO_4 등과 같은 미네랄원은 생성물을 억제하거나 조절하는 것으로 알려져 있다. 미네랄 첨가의 영향을 조사하기 위하여 위의

최적조건하에서 미네랄원으로 MgSO_4 , CaCl_2 , Ferric citrate, ZnSO_4 , MnSO_4 , CoCl_2 , NiCl_2 , Na_2MoO_4 를 0.2%의 농도로 하였을 때 수소생산 실험을 수행하였다.

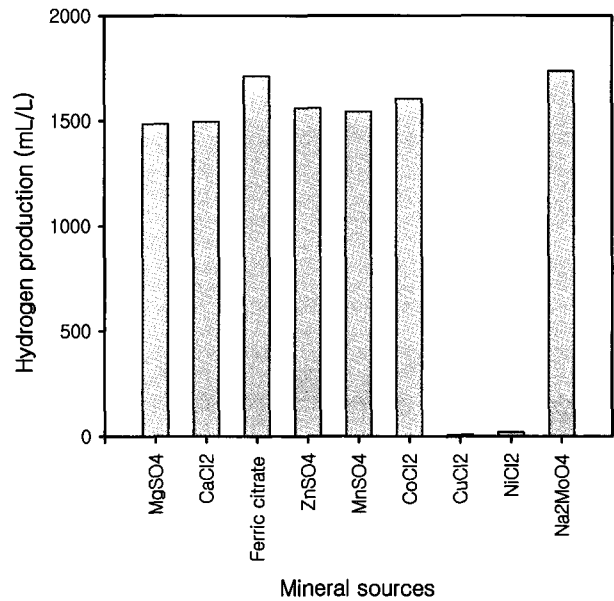


Figure 7. Effects of mineral sources on hydrogen production.

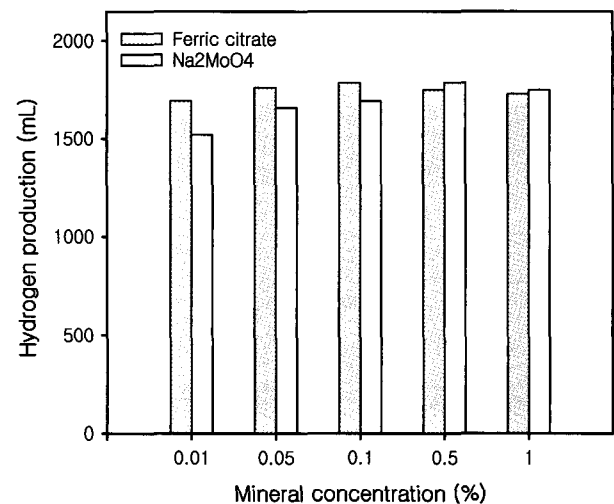


Figure 8. Effects of mineral concentration on hydrogen production.

Fig. 7에서 보여주는 것과 같이 CuCl_2 와 NiCl_2 에서는 수소가 무시할 정도로 적은 양의 수소가 생산되었으나 다른 미네랄에서는 1500 mL 이상의 수소가 생산됨이 확인되었다. 특히 Ferric citrate와 Na_2MoO_4 에서 더 많은 양의 수소가 생산되어 이 두 물질이 수소생산을 촉진한다는 것을 알 수 있다. 즉 다양한 종류에 미네랄의 첨가에 따라 수소생산이 달라지므로 영양 요구인자가 다르다는 결과를 보여준다. Fig. 8에서는 Ferric citrate와 Na_2MoO_4 를 0.1%부터 1%까지 농도범위에서 수소생산을 조사하였다. 이 두 물질은 수소생산에 상당한 변화를 보이지 않았지만 Ferric citrate는 0.1%에서 최대를 보여 1782.3 mL이었고 Na_2MoO_4 는 Ferric citrate보다 약간 더 높은 농도인 0.5%이었다. 그

생산량은 1784.8 mL이었다.

혐기성 박테리아는 Nitrogenase가 관여하는 것으로 알려져 있다. 이 Nitrogenase는 Mo-Fe 단백질과 Fe 단백질로 나누어진다(23). 관여하는 효소는 수소생산 수율에 차이를 주기 때문에 효소들과 기질의 해명으로 대량 배양시에 많은 이점이 될 수 있다.

요 약

수소생산을 증진하기 위하여 탄소원의 농도가 수소생산에 미치는 영향을 조사하였다. 단일당으로 glucose를 이용하였을 때 최적 농도는 2%로서 975.1 mL을 생산하였다. 혼합당을 이용하여 수소생산을 향상시킬 목적으로 그 혼합비를 조사한 결과 glucose와 sucrose의 비가 25 : 75이었을 때 가장 높은 수율을 보였다. 수소를 생산할 때 기질의 발효가 진행됨에 따라 배양액의 pH 저하가 생겨 세포성장 에 영향을 주게 된다. 인산염의 첨가로 pH 저하에 따른 완충작용을 하여 생산능이 향상되었음을 확인할 수 있었다. 특히 회분식 배양시에는 배양액의 유출이 없기 때문에 수율을 향상하기 위하여 적절한 농도의 인산염의 첨가가 필수적이다. 미네랄의 영향을 시험하기 위하여 배지에 각종 미네랄원을 첨가하여 그 영향을 조사한 결과 CuCl₂와 NiCl₂을 제외하고 모두 높은 수소생산성을 나타내었다. 그 중에서도 Ferric citrate와 Na₂MoO₄에서 더 많은 수소가 생산됨이 확인되었다. 이는 수소생산에 있어 Ferric citrate와 Na₂MoO₄가 중요한 요소라고 생각된다. 반대로 CuCl₂와 NiCl₂는 필수적인 물질이 아님을 보여준다. 따라서 이들 Ferric citrate와 Na₂MoO₄를 첨가하여 수소생산을 증가시키는 원인으로 앞으로 세밀히 관여한 효소의 생리적 역할에 많은 연구가 필요하다.

REFERENCES

- Boillinger, R., H. Zurrer, and R. Bachofen (1985), Photoproduction of molecular hydrogen from waste of a sugar refinery by photosynthetic bacteria, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 147-151.
- Sawada, H. and P. L. Rogers (1977), Photosynthetic bacteria in waste treatment: Pure culture studies, *J. Ferment. Technol.* **55**, 297-310.
- Vignas, P. M., A. Coleau, J. C. Wilson, and Y. Jouanneau (1985), Hydrogenase, nitrogenase and hydrogen metabolism in the photosynthetic bacteria, *Advance in Microbial Physiology* **26**, 155-234.
- Nagai, S., T. Kodama, K. Ohmiya, K. Miyamoto, S. Yokoyama, and H. Saiki (1996) Interim evaluation report of development of environmentally friendly technology for the production of hydrogen, NEDO, Tokyo, Japan.
- Kondratieva, E. N. and I. N. Gogotov (1983), Production of molecular hydrogen in microorganism, *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology* **28**, 139-191.
- Zajic, J. E., Kosaric, and J. D. Brosseau (1978) Microbial production of hydrogen, *Advances in Biochemical Engineering* **9**, 57-109.
- Gray, C. T. and H. Gest (1965), Biological formation of molecular hydrogen. *Science* **148**, 186-192.
- Ueno, Y., S. Otsuka, and M. Morimoto (1996), Hydrogen production from industrial wastewater by anaerobic microflora in chemostat culture, *J. Ferm. Bioeng.* **82**(2), 194-197.
- Bae, M (1995), Production of bio-hydrogen from waste materials, Research Report, Ministry of Trade, Industry, and Energy 941C401-364FP1.
- Tanisho, S. and Y. Ishiwata (1994), Continuous hydrogen production from molasses by the bacterium *Enterobacter aerogenes*, *Int. J. Hydrogen Energy* **19**(10), 807-812.
- Tanisho, S., Y. Suzuki, and N. Wakao (1987), Fermentation hydrogen evolution from various substrates by *Enterobacter aerogenes* **67**, 29-34.
- Heyndrix, M., P. De Vos, B. Thibau, P. Stevens, and J. De Ley (1987), Effect of various external factors on the fermentative production of hydrogen gas from glucose by *Clostridium butyricum* strains in batch culture system, *Appl. Microbiol.* **9**, 163-168.
- Van Andel, J. G., G. R. Zoutberg, P. M. Crabbendam, and A. M. Breau (1985), Glucose fermentation by *Clostridium butyricum* grown under a self generated gas atmosphere in chemostat culture, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 21-26.
- Lieno, Y., S. Kawai, S. Sato, Otsuka, and M. Morimoto (1995), Biological production of hydrogen from cellulose by natural anaerobic microflora, *J. Ferm. Bioeng.* **79**(4), 395-397.
- Ueno, Y., S. Otsuka, and M. Morimoto (1996), Hydrogen production from industrial wastewater by anaerobic microflora in chemostat culture, *J. Ferm. Bioeng.* **82**(2), 194-197.
- Lee, K. S., C. M. Kang, and S. Y. Chung (2003), Isolation and characterization of hydrogen production bacterium, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **18**, 149-154.
- Landwall, P. and T. Holme (1977), Influence of glucose and dissolved oxygen concentrations on yield of *E. coli* B in dialysis culture, *J. Gen. Micro.* **103**, 353-358.
- Odom, J. M. and J. D. Wall (1983), Photoproduction of H₂ from cellulose by an anaerobic bacterial coculture, *Appl. Environ. Microbiol.* **45**(4), 1300-1305.
- Son, C. J., S. Y. Chung., J. U. Lee, and S. J. Kim (2002) Isolation and Cultivation Characteristics of *Acetobacter xylinum* KJ-1 producing Bacterial Cellulose in Shaking Cultures, *J. Microbiol. Biotechnol.* **12**(5), 722-728.
- Kim, H. C., Y. H. Ko., and J. H. Ko (1996), The production of Vancomycin Using High concentration of Mixture of carbon sources by *Nocardia orientalis* Mutant, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**(4), 404-407.
- Williams, C. M., C. S. Richter, J. M. Mackenzie, and J. C. H. Shih (1990), Isolation, identification, and characterization of a feater-degrading bacterium, *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1509-1515.
- Fang, T. J. and Y. S. Cheng (1993), Improvement of Astaxanthin Production by *Phaffia rhodozyma* through Mutation and Optimization of Culture Conditions, *J. Ferment. Bio-eng.* **75**, 466-469.
- Miyake, J., Y. Asada, and S. Kawamura (1989), Nitrogenase In: Kitani O., Hall C. W., editors, *Biomass handbook*. New York, Gordon and Breach Science Publishers, pp362-370.