

수소생산 증진을 위한 *Enterobacter cloacae* YJ-1의 배지조성

¹이 기 석 · † ²강 창 민 · ¹정 선 용

¹전남대학교 공과대학 환경공학과, ²초당대학교 공과대학 환경공학과
(접수 : 2005. 3. 14., 게재승인 : 2005. 10. 23.)

Medium Composition of *Enterobacter cloacae* YJ-1 for Maximizing Hydrogen Production

Ki-Seok Lee¹, Chang-Min Kang^{2†}, and Seon-Yong Chung¹

¹Department of Environmental Engineering, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

²Department of Environmental Engineering, Chodang University, Muan, Chonnam 534-701, Korea

(Received : 2005. 3. 14., Accepted : 2005. 10. 23.)

In order to maximize hydrogen production by *Enterobacter cloacae* YJ-1, an anaerobic hydrogen producing bacteria, the medium composition was optimized. Glucose was better than other carbon sources in hydrogen production and its production was 975.4 mL/L at 2% (w/v) for 48 h. Organic nitrogen sources were more effective than inorganic nitrogen sources and also yeast extract among organic nitrogens was the most effective in hydrogen production. Among metal ions, Na₂MoO₄ was most effective, and its production was 1753.3 mL/L at 0.04% (w/v). Addition of amino acid was very effective with compare to another components of medium, and cystein was most effective among them. Under the optimum medium obtained in batch culture, semi-batch culture in order to produce continuous hydrogen was run. The highest hydrogen production was earned at 3% (w/v) of glucose and the amount was 2215.4 mL/L.

Key Words : Hydrogen production, *Enterobacter cloacae* YJ-1, medium composition, amino acid, semi-continuous culture

서 론

현재 사용되고 있는 석유, 석탄, 천연가스 등과 같은 화석연료는 사용 후 재생이 불가능하고 매장량이 한정되어 있으며, 연소가스에 의한 지구온난화와 대기오염물질 배출 등 심각한 환경문제를 야기하고 있다. 따라서 화석연료의 의존에 벗어나 무한하고 깨끗한 대체에너지의 개발이 시급하다. 이러한 문제점을 해결하기 위한 대체에너지원으로 가장 주목되고 있는 것은 수소이다(1, 2). 수소는 연소과정에서 오염물질을 전혀 배출하지 않으며, 높은 에너지 효율(122 kJ/g)을 가지고 있다. 또한 연료전지 등의 기술을 사용하면 전기를 생산할 수 있기 때문에 기존의 에너지 체계를 대신하여 사용할 수 있다는 이점이 있다. 기존 수소생산 방법인 물의 전기분해나 탄화수소의 열분해 등은 공정에 많은 에너지가 소비되는 단점이 있어, 현재는 미생물을 이용하여 수소를 생산하는 연구가 활발히 진행되고 있

다(3, 4).

생물학적 수소생산 기술로는 유기물로부터 광조건이나 혐기적 조건에서 수소를 생산하는 기술(5, 6)과 조류에 의한 광합성을 통해 수소를 생산하는 기술(7)로 나눌 수 있다. 이 중 혐기적 수소생산의 경우는 태양광 유무에 관련 없이 지속적이며, 소규모로 수소생산이 가능하다는 이점을 가지고 있다(8, 9). 그 외에도 혐기성 대사를 통한 수소생산은 광발효공정보다 더 빠르고 고농도의 유기폐수로부터 수소를 발생시킬 수 있다는 많은 장점을 지니고 있다. 혐기성 세균에 의한 수소생산은 환경조건의 대사경로에 따른 변화에 민감하게 반응하는데, 특히 탄소원의 종류나 pH 등의 환경요인이 크게 지배하는 것으로 알려져 있다(10, 11).

본 연구에서 이용한 혐기성 균주인 *Enterobacter cloacae* YJ-1은 이전 연구(12)에서 수소생산을 위해 담수에서 분리한 균주로 최적 배양조건은 35°C와 pH 7.5이었다. 따라서 수소생산의 배양 최적화를 위하여 탄소원, 질소원 및 보조기질 제한조건으로 수소생산에 미치는 영향을 살펴보았다. 이어서 회분식 배양하여 얻은 최적 조건하에 반연속배양을 행하여 연속적인 수소생산의 가능성을 고찰하고자 하였다.

† 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

재료 및 방법

균주 및 배양조건

본 연구에 사용된 혐기성 세균 *Enterobacter cloacae* YJ-1의 수소생산 배지는 다음과 같다. 배지의 조성은 1 L당 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 mL이다. 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. 전 배양은 100 mL 바이알에 배지를 40 mL를 넣고, 고무마개와 알루미늄 덮개로 밀폐한 후, 아르곤 가스를 흘려서 혐기적 조건을 만들었다. 배양조건은 35°C, 120 rpm에서 약 2일간 배양시켰다. 본 배양에서는 Fig. 1에서 보여주는 바와 같이 2 L 반응기에 1 L를 배양액으로 하여 전 배양과 같은 조건으로 하였다. 전 배양에서 성장시킨 균주를 1% (v/v) 접종하여 회분식 배양과 반연속배양을 행하였다.

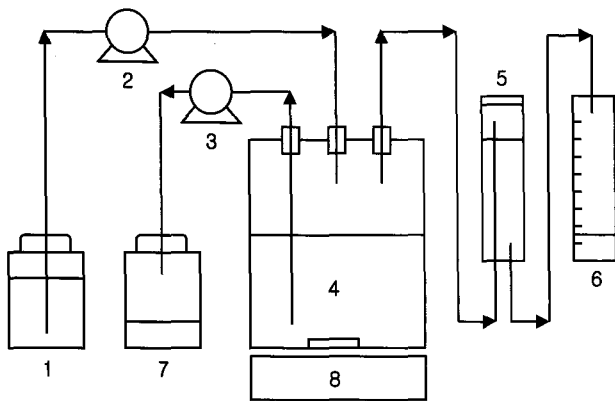


Figure 1. Schematic diagram of the experimental apparatus for hydrogen production (1. nutrient tank, 2. influent pump, 3. effluent pump, 4. 2 L reactor, 5. gas collector, 6. gas volume meter, 7. liquid sampling, 8. magnetic stirrer).

수소가스분석

배양 중 발생하는 전체가스는 acetic acid buffer (pH 3)를 담은 gas collector에서 포집하였으며, 수소함량은 반응기내 head space 가스를 gas tight syringe로 0.2 mL 취하여 gas chromatography (Shimadzu, GC-14B)로 분석하였다. 사용된 column은 300 mm × 2 mm (길이 × 지름) glass로 molecular sieve 5A (Supelco Inc.)를 충전 물질로 사용하였으며, thermal conductivity detector (TCD)로 분석하였다. 수소분석의 조건은 column 온도 80°C, injector 온도 100°C, detector 온도 120°C이었으며, carrier gas는 argon을 이용하고 flow rate는 35 mL/min으로 유지하였다.

기타 분석방법

균체농도는 일정시간 간격으로 배양장치의 effluent pump를 이용해 혐기적 조건하에서 채취한 발효액을 UV-visible spectrophotometer (Hewlet Packard, 8452A Diode Array

Spectrophotometer)로 파장 660 nm에서 측정하였다. 배양액의 pH는 pH meter (Orion, model 420A)로 실온에서 측정하였다.

결과 및 고찰

탄소원이 수소생산에 미치는 영향

수소생산능은 배지의 조성에 크게 영향을 받는데 적정 농도의 탄소원과 질소원에서 수소생산이 향상된다. 특히 배지의 탄소원은 이용율에 차이가 많아 단당류 및 이당류의 배양기질로서 사용이 중요하다. 회분식 배양을 행하여 수소생산이 정지하였을 때 수소생산량과 세포성장을 조사한 것으로, 각종 탄소원이 수소생산에 미치는 영향을 알아보기 위하여 기본배지에 각각 1% (w/v) 농도로 하였다. Fig. 2에 나타난 바와 같이 세포성장 및 수소생산은 탄소원의 종류에 따라 상이한 결과를 나타내었다. Glucose를 사용시 수소생산성과 세포성장이 가장 우수하여 생산된 수소는 750.3 mL/L로 가장 높았으며, 다음은 maltose, mannitol, fructose, galactose, lactose, sorbitol순으로 높았다. 이는 *E. cloacae* YJ-1 균주가 이용하기 쉬운 glucose를 우선적으로 세포내로 흡수하였다고 생각된다.

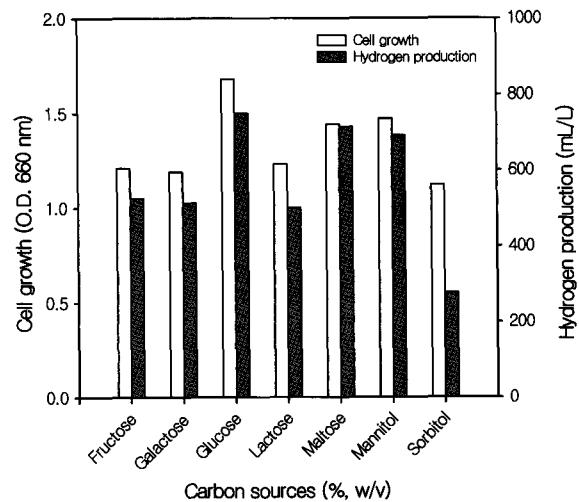


Figure 2. Effect of carbon sources on hydrogen production.

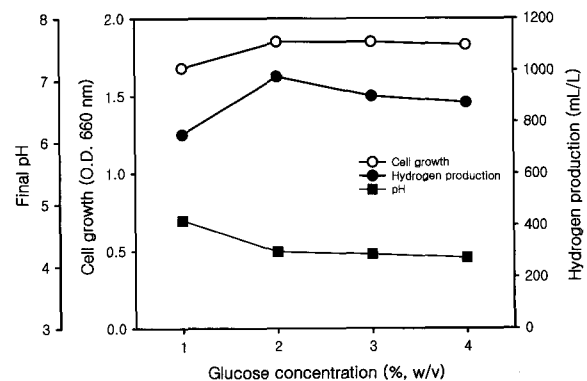


Figure 3. Effect of various glucose concentration on hydrogen production.

Fig. 3은 탄소원에 대한 실험결과 가장 높은 생산량을 보인 glucose를 1 - 4% (w/v)의 농도범위로 하였을 때 세포 성장과 수소생산을 조사하였다. Glucose가 2% (w/v) 농도이었을 때 세포성장인 1.85로 가장 좋은 생육을 보였으며, 수소생산량도 975.4 mL/L로 가장 높게 나타났다. 2% (w/v) 이상에서는 최종 pH가 4.3 이하로 더 낮아졌고 수소생산량에 증가를 보이지 않아 발효동안 생성된 유기산에 의한 세포 저해로 생각된다. 특히 회분식 배양시 낮은 pH는 세포의 생육과 수소생산량에 상당한 차이를 가져온다. 본 실험에 생성된 유기산 분석한 결과 배양액 중에 formic acid와 acetic acid가 주로 생성되어 이전 연구와 유사하였다(12). Heyndrix 등(13)은 각종 기질을 이용하여 수소 및 유기산을 생성할 때 발효성상 및 세포증식의 최적 pH 범위는 균주의 특성에 따라 다르다고 보고하였다.

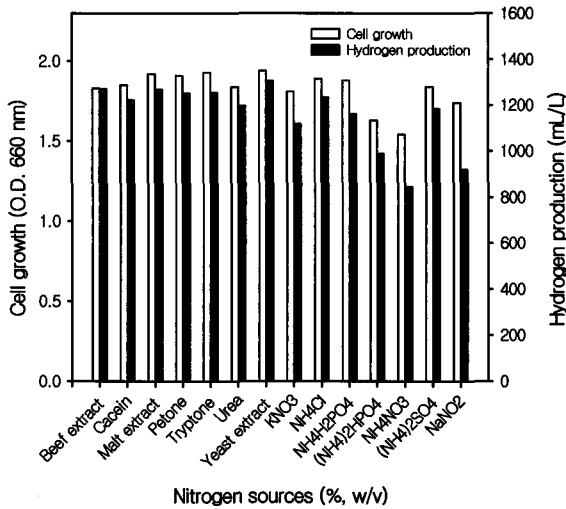


Figure 4. Effect of nitrogen sources on hydrogen production.

질소원이 수소생산에 미치는 영향

질소원이 수소생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 최적 탄소원으로 선정된 2% (w/v) glucose의 기본배지에 각종 유기질소원과 무기질소원을 각각 0.5% (w/v) 농도로 하여 생산된 수소를 Fig. 4에 나타내었다. 이 균주는 무기질소원 중에 NH₄Cl을 첨가한 경우, 수소생산이 가장 우수하여 1234.9 mL/L을 생산하였다. 특히 NO₂나 NO₃보다 NH₄ 형태의 질소원을 더 잘 이용함을 알 수 있었다. 유기질소원의 경우 무기질소원보다 상대적으로 높아 yeast extract 첨가시 1306.3 mL/L를 생산해 가장 높게 나타났다. 다음은 beef extract, malt extract, tryptone, peptone 등 순으로 높았다. 이 결과로 yeast extract 등의 복합질소원에 함유되어 있는 아미노산, 비타민 등이 수소생산에 증가를 주었다고 사료된다. 한편 NH₄Cl에서도 비교적 많은 양의 수소가 생산되었기 때문에 산업적인 생산을 고려하여 고가의 yeast extract의 대체 질소원으로 가능하리라 생각된다. Fig. 5는 최적 질소원으로 yeast extract를 선정하여 0.1 - 2.0% (w/v) 농도범위로 하였을 때 1.5% (w/v) 첨가시 1651.5 mL/L로 가장 높은 생산량을 보였다. 그러나 1% (w/v) yeast extract 첨가시 수소생산량에 큰 차이가 없고 세

포성장도 높아 다음 실험에 이를 고려하여 1% (w/v)를 최적 농도로 선정하였다.

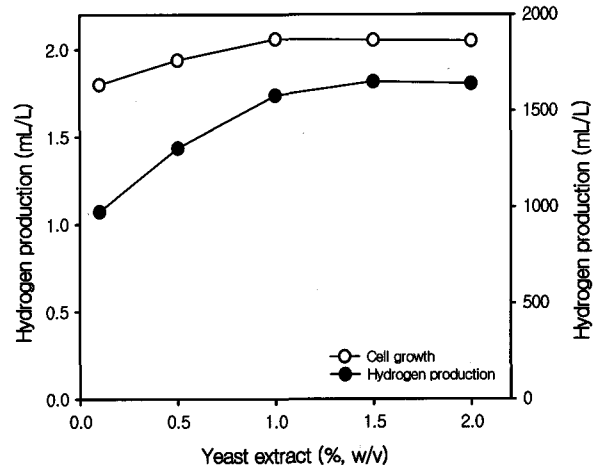


Figure 5. Effect of various yeast extract concentration on hydrogen production.

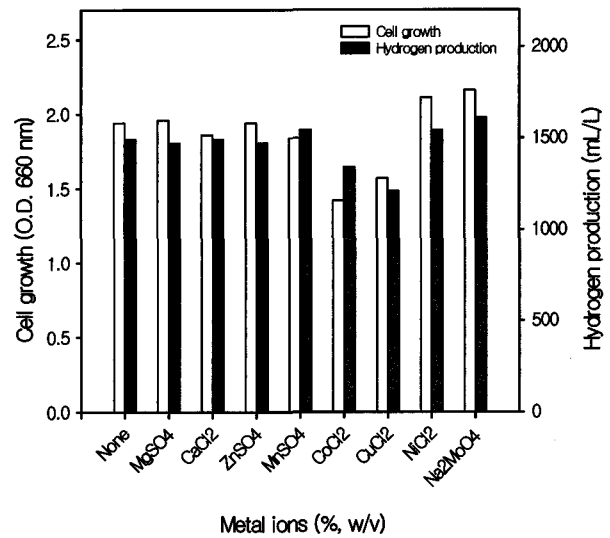


Figure 6. Effect of metal ions on hydrogen production.

금속이온이 수소생산에 미치는 영향

금속이온의 미량성분은 미생물 성장과 수소생산의 임계요소로 알려져 있어 이들의 수소생산에 미치는 영향을 조사하였다. 앞의 최적 배양조건하에 각종 금속이온 농도를 각각 0.01% (w/v) 농도로 하였을 때 생산된 수소를 Fig. 6에 나타내었다. 이 중 Na₂MoO₄를 첨가시 수소생산량이 1611.4 mL/L로 가장 높았으며, 다음은 MnSO₄, NiCl₂, CaCl₂, MgSO₄ 등 순으로 나타났다. 따라서 Na₂MoO₄를 0 - 0.2% (w/v)의 농도범위로 하였을 때 생산된 수소를 Fig. 7에 나타내었다. 0.04% (w/v) 농도였을 때 수소생산성에 상당한 증가를 주지 않았지만 가장 높은 생산량을 보여 1753.3 mL/L이었다. 그 이상의 농도에서는 세포성장 및 수소생산성에 저해가 있음을 알 수 있었다. 이 결과는 Yokoi 등(14)이 Na₂MoO₄ 첨가가 혐기성 세균의 nitrogenase에 관여하여

수소생산을 향상시켰다는 보고와 일치하였다.

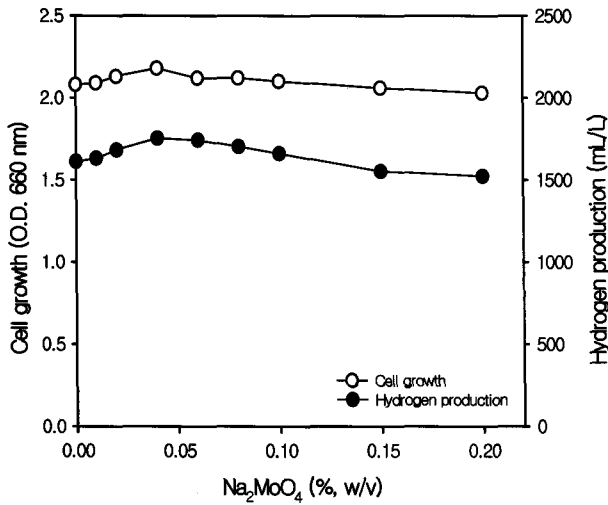


Figure 7. Effect of various Na₂MoO₄ concentration on hydrogen production.

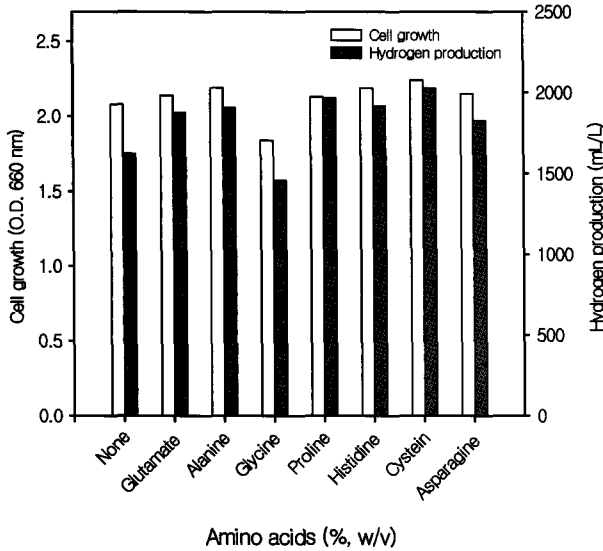


Figure 8. Effect of amino acids on hydrogen production.

아미노산이 수소생산에 미치는 영향

아미노산의 역할은 생산균주 및 생산물에 따라 다양하지만 이차대사산물의 전구물질 및 이차대사관여효소의 유도물질로서 이차대사산물의 생산을 위한 중요한 인자로 알려져 있다(15). Fig. 8에 나타난 바와 같이 앞의 실험에서 얻어진 최적 배양조건하에 각종 아미노산 농도를 0.01% (w/v)로 하였을 때 cysteine에서 가장 높은 생산량을 나타내었다. 이는 무첨가구에 비해 1.25배 증가된 결과이다. 그 외에 proline, histidine, alanine에서 각각 1.21, 1.18, 1.17배의 증가를 보였다. 이 결과로 glycine을 제외한 아미노산의 첨가는 수소생산량에 증가를 가져와 배양시 필요한 성분임을 알 수 있다.

반연속배양에 의한 수소생산

반연속배양은 지속적으로 배양액을 교체함으로 기질소

모 및 catabolite repression을 극복하는데 사용되어진다. 즉 수소생산율이 저하되었을 때 새로운 배지로 기존의 배양액 일부를 교체하여 단위시간당 수소생산량을 증가시키고 세포생성량도 계속 유지할 수 있는 공정이다. 여기서 기존 배양액 대신 새로운 배지를 교체하여 회복이 이루어지는데, 회복은 세포증식에 필요한 영양분의 공급이 이루어지며, 배양액의 유기산에 의한 pH를 완충시키는데 역할을 한다. 즉 정지기에 접어들었던 세포의 성장이 다시 지수성장기의 형태를 띠게 된다. 그러므로 반연속배양은 지속적으로 세포 성장속도를 유지한 상태로 수소를 생산할 수 있다.

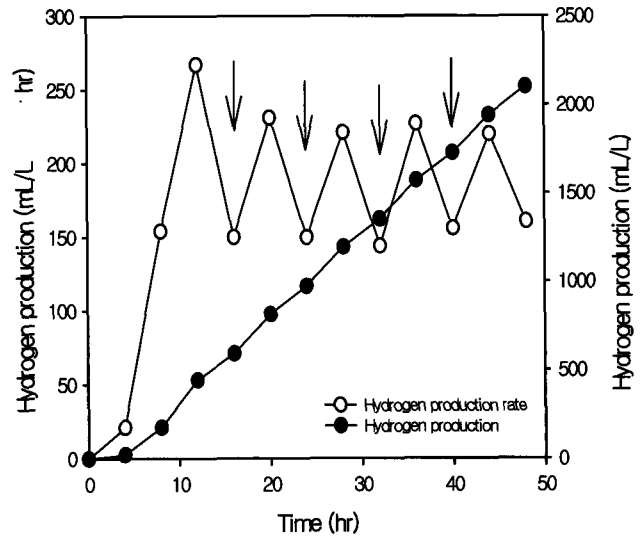


Figure 9. Hydrogen production by semi-continuous culture ((↓): 50% of fresh medium).

회분식 배양에서 얻은 최적 배양조건하에 반연속배양을 통하여 총 48시간동안 실험을 수행하였다. 수소생산율이 감소하였을 때 50%의 새로운 배지로 4회 교체하였으며 glucose 농도를 2% (w/v)로 하였다. Fig. 9에 나타난 바와 같이 수소생산율은 12시간까지 증가하였고, 16시간에서는 감소하는 경향을 보였다. 이때 새로운 배지를 교체함으로써 수소생산율이 향상됨을 알 수 있었다. 총 48시간 동안 생산된 수소는 2101.7 mL/L이었다.

Table 1. Determination of glucose concentration on hydrogen production in semi-continuous culture

| Glucose concentration (% w/v) | Average hydrogen production rate (mL/L · hr) | Hydrogen production (mL/L) |
|-------------------------------|--|----------------------------|
| 1 | 42.1 | 2020.8 |
| 2 | 43.8 | 2101.7 |
| 3 | 46.2 | 2215.4 |
| 4 | 40.2 | 1929 |

Table 1은 반연속배양을 통해 수소생산을 최대화하기 위하여 glucose 농도범위를 1 - 4% (w/v)로 변화시켜 수소생산을 조사하였다. 수소생산율을 보았을 때 1% (w/v) 농도보다 더 높은 3% (w/v) 농도에서 최대를 보였으며, 그

수소생산량은 2215.4 mL/L이었다. 4% (w/v) 농도에서 수소 생산의 향상을 얻을 수 없었는데, 이는 배지에 존재하는 기질과 유기산이 공존하는 반응시스템에서 관계가 있는 것으로 세포활성이 낮아졌다고 생각된다.

회분식 배양은 배지의 영양분이 다시 제공되지 않으므로 증식은 단지 수세대 동안만 지수증식을 유지하게 되며, 생성된 대사산물로 인하여 심하게 저해 받게 된다. 반연속 배양에 의한 배지의 교체를 통하여 효율적인 탄소원의 이용 및 catabolite repression 현상이 극복될 수 있어 수소를 연속적으로 생산할 수 있음을 제시해 준다.

요 약

수소생산을 최적화하기 위하여 *Enterobacter cloacae* YJ-1 을 이용해 생산성에 미치는 탄소원 농도, 질소원 농도, 금속 이온 농도, 아미노산 효과로서 회분식 배양을 통하여 실험을 수행하였다. 각종 탄소원의 종류에 따라 수소생산을 검토한 결과 glucose 첨가시에 가장 양호하였다. 따라서 glucose 농도를 변화시켜 수소생산량을 조사한 결과 2% (w/v) 농도에서 최대를 보여 975.4 mL/L를 생산하였다. 각종 질소원 중에서 가장 효과적인 질소원은 yeast extract이었으며, 최대 수소생산량은 1.5% (w/v) 농도에서 1651.5 mL/L이었다. 금속이온으로는 Na_2MoO_4 가 가장 효과적으로 나타나 0.04% (w/v) 농도에서 1753.3 mL/L를 생산하였다. 아미노산은 cystein에서 가장 생산량이 많았으며, 다음은 proline, histidine, alanine 등 순이었다. 회분식 배양의 최적 조건하에 수소를 연속적으로 생산하기 위하여 반연속배양을 행한 결과 3% (w/v) 농도에서 2215.4 mL/L로 가장 높았다. 생산균주의 대사에 관한 물질을 보다 세밀히 조사하고 연속적인 수소생산을 살펴 산업적인 공정개발도 가능하리라 생각된다.

REFERENCES

1. Sawada, H. and P. L. Rogers (1977), Photosynthetic bacteria in waste treatment: Pure culture studies, *J. Ferment. Technol.* **55**, 297-310.
2. Zajic, J. E., A. Margaritis, and J. D. Brosseau (1979), Microbial hydrogen production for replenishable resources, *Int. J. Hydrogen Energy* **4**, 385-402.
3. Archer, D. B. and L. A. Thompson (1987), Energy production through the treatment of wastes by microorganism, *J. Appl. Bacteriol. Symp. Supp.* 595-705.
4. Thangaraj, A. and G. Kulandaivelu (1994), Biological hydrogen production using dairy and sugarcane wastes, *Bioresource Tech.* **48**, 9-12.
5. Klemme, J. H. (1968), Photosynthetic growth of new isolated non-sulfur purple bacteria at the expense of molecular hydrogen, *Arch. Microbiol.* **64**, 29-34.
6. Kim, J. S., K. Ito, K. Izaki, and H. Takahasi (1987), production of molecular hydrogen by a continuous culture under laboratory condition, *Agri. Biol. Chem.* **51**, 2591-3593.
7. Benemann, J. R. and N. M. Weare (1974), Hydrogen evolution by nitrogen-fixing *Anabana cylindrica* cultures, *Science* **184**, 174-175.
8. Tanisho, S. and Y. Ishiwata (1980), Continuous hydrogen production from molasses by the bacterium *Enterobacter aerogenes*, *Int. J. Hydrogen Energy* **19**, 807-812.
9. Tanisho, S., Y. Suzuki, and N. Wakao (1987), Fermentative hydrogen evolution from various substrates by *Enterobacter aerogenes*, *Hakkokogaku* **67**, 29-34.
10. Van Andel, J. G., G. R. Zoutberg, P. M. Crabbendam, and A. M. Breure (1985), Glucose fermentation by *Clostridium butyricum* grown under a self generated gas atmosphere in chemostat culture, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 21-26.
11. Gray, C. T. and H. Gest (1965), Biological formation of molecular hydrogen, *Science* **148**, 186-192.
12. Lee, K. S., C. M. Kang, and S. Y. Chung (2003), Isolation and characterization of hydrogen production bacterium, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **18**(2), 149-154.
13. 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.
14. Yokoi, H., R. Maki, J. Hirose, and S. Hayashi (2002), Microbial production of hydrogen from strach-manufacturing wastes, *Biomass and Bioenergy* **22**, 389-395.
15. Cimburkova, E., J. Zima, J. Novak, and Z. Vanek (1988), Nitrogen regulation of avermectins biosynthesis in *Streptomyces avermitilis* in a chemically defined medium, *J. Basic Microbiol.* **28**, 491-499.