

수소생산균 *Enterobacter* sp. ES392의 분리 및 배양조건

전승종^{1,2,3*} · 이언석¹

¹동의대학교 바이오물질제어학과, ²동의대학교 생명공학과, ³동의대학교 블루바이오 RIC

Isolation and Culture Conditions of Hydrogen Producing Bacterium *Enterobacter* sp. ES392. Jeon, Sung-Jong^{1,2,3*} and Eon-Seok Lee¹. ¹Department of Biomaterial Control (Brain Korea 21 program), Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea, ²Department of Biotechnology & Bioengineering, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea, ³Blue-Bio Industry RIC, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea – A hydrogen-producing bacterium (strain ES392) was isolated from pond water located in the Dong-Eui University, Busan, Korea. The cell was long-rod type (1.4 μ m) of about 0.6 μ m in diameter, and not formed flagellum and spore. Phylogenetic analysis based on the 16S rRNA sequence and biochemical studies indicated that ES392 belonged to the genus *Enterobacter* sp. The optimum pH and temperature for hydrogen production was 7.5 and 35°C, respectively. The optimization of medium compositions which maximize hydrogen production from *Enterobacter* sp. ES392 was determined. As a result, the maximum hydrogen production was obtained under the conditions of 4% (w/v) sucrose, 0.5% (w/v) yeast extract and 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5). Under batch culture conditions, the maximal hydrogen production and yield were obtained as 3481 mL/L and 1.33 mol/mol sucrose, respectively.

Key words: Hydrogen production, *Enterobacter*, medium composition

서 론

현재 인류의 에너지원인 석유, 석탄, 가스 등과 같은 화석 연료는 그 매장량이 한정되어 있고 연소 시에 CO₂, SO_x, NO_x, 미세먼지 등의 오염물질을 배출하여 지구온난화를 비롯한 심각한 환경문제를 야기하고 있다. 이와 같은 문제점을 해결하기 위한 바이오매스 자원은 화석원료와는 달리 무공해 에너지이고 재생성이 무한한 산업원료이다[2, 9, 14]. 바이오매스 자원으로부터 생물학적으로 생산되는 수소는 높은 에너지 효율(122 kJ/g)을 가지고 오염물질을 배출하지 않는 미래 청정에너지원으로 주목 받고 있다. 기존의 수소 생산 방법은 물의 전기분해나 탄화수소의 열분해 등 공정상에 많은 에너지가 소비되는 단점을 가지고 있어, 현재는 미생물을 이용한 수소 생산연구가 활발히 진행되고 있다. 현재 수소 생산을 위한 생물학적인 방법으로는 조류의 광합성을 이용하는 방법과 혐기성 세균의 유기물 발효를 이용하는 방법이 있다[6, 16]. 이 중 혐기성 세균에 의한 방법은 태양광 유무에 관련 없이 지속적이며, 소규모로 수소생산이 가능하다는 장점을 가지고 있다[1, 10]. 또한 발효산물로 생산되는 다양한 유기산은 수소생산의 기질로 재활용하여 혐기성 발효와 광합성 배양을 연속적으로 진행하거나, 해당 미생물을 동

시 배양할 때 유기물로부터 수소생산을 최대화 할 수 있다 [11, 12]. 혐기성 세균에 의한 수소생산은 환경조건에 따른 대사경로의 변화에 민감하게 반응하는데, 특히 탄소원의 종류나 pH 등의 환경요인에 크게 지배 받는 것으로 알려져 있다[3, 13]. 현재, 가장 잘 알려진 혐기성 발효 수소생성 세균으로는 *Clostridium butyricum*, *Clostridium pasteurianum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Clostridium kluyveri* 및 *Enterobacter aerogenes* 등이 있고, 이들을 이용한 수소생산 연구가 활발히 진행되고 있다.

본 연구에서는 혐기성 발효에 의한 수소생산의 일환으로 우수한 수소생산균주를 자연계로부터 확보하기 위하여 새로운 혐기성 미생물을 분리하였으며, 분리된 균주를 동정하고, 균주의 특성 및 수소생산에 미치는 배양조건에 대하여 검토하였다.

재료 및 방법

균주 선별

자연계에서 수소생산 균주를 분리하기 위해 부산 소재 동의대학교 연못에서 담수시료를 채취하여 균 분리원으로 사용하였다. 균주 분리 및 수소생산에 사용된 배지는 다음과 같다. 배지조성은 1 liter당 yeast extract 5 g, ethanol 0.5 mL, disodium succinate 1 g, (0.1%) ferric citrate solution 5 mL, K₂HPO₄ 0.5 g, MgSO₄ 0.4 g, NaCl 0.4 g, trace element solution 0.1 mL(ZnSO₄ 7H₂O 0.1 g, MnCl₂ 4H₂O 0.03

*Corresponding author

Tel: 82-51-890-2278, Fax: 82-51-890-2632

E-mail: jeon.sj@deu.ac.kr

g, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.02 g, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.02 g, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g/L, pH 7.5이다. 여기에 0.1% resazurin(1 mL/L)를 첨가하였다. 질소가스를 채운 혐기성 chamber에서 균주 분리용 시료를 상기 배지 50 mL이 든 125 mL serum 병에 5%(v/v)가 되게 접종하고 혐기적 조건으로 35°C에서 수 일간 진탕 배양했으며 이 현탁액 1%(v/v)를 다시 새로운 배지에 주입하여 배양하였다. 이와 같은 방법으로 2회 계대배양한 후, 평판배지에 도말하여 생성된 colony를 순수분리 하였다. 순수분리 된 미생물은 다시 2%의 glucose가 첨가된 액체배지에 접종하고 혐기적 조건에서 배양하였으며, 균체 성장과 발생된 수소가스를 분석하여 최종적으로 수소생산능이 있는 단일 균주를 선별하였다.

균주 배양

균주의 접종은 배지 내 용존산소량을 최소화하기 위해 질소가스를 채운 혐기성 chamber에서 실시하였다. 전배양은 50 mL의 배지가 든 125 mL serum 병에 분리된 ES392 균주를 접종하고 35°C, 120 rpm에서 2일간 혐기적으로 배양시켰다. 본배양은 Fig. 1에서 나타낸 것처럼 1 L serum 병에 배지를 800 mL 첨가한 후 전배양액 1%(v/v)를 접종하여 전배양과 같은 조건에서 배양하였으며, 배양 중 pH는 조절하지 않았다.

균주 동정

분리균주 ES392의 형태는 투과전자현미경(JEM 1200 EX-II electron microscope, JEOL)을 이용하여 음성염색으로 관찰하였다. 균주의 생화학적 특징은 API 20E Kit를 사용하여 조사하였고, 16S rRNA sequence 분석은 Kim 등[4]의 방법에 따라 실시하였다. 16S rRNA 유전자 분석은 BLAST 프로그램을 사용하여 수행하였으며, Clustal W(1.6.6 Version) 프로그램을 사용하여 계통도를 작성하였다.

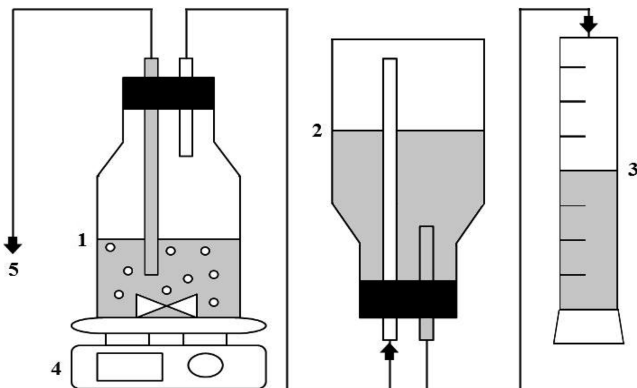


Fig. 1. Schematic diagram of the experimental apparatus for the hydrogen production. 1, 1 L reactor; 2, gas collector; 3, gas volume meter; 4, magnetic stirrer; 5, liquid sampling.

가스분석

배양 중 발생하는 전체가스는 acetic acid buffer(pH 3.0)를 담은 gas collector에 포집하였고, 수소함량은 head space 가스를 gas tight syringe로 100 μL 취하여 gas chromatography(Shimadzu, Japan)로 분석하였다. 사용된 column은 (6ft \times 1/2in) glass로 molecular sieve 5A(80/100 marh; Alltech, Deerfield, USA)를 충전 물질로 사용하였으며, thermal conductivity detector(TCD)로 분석하였다. 수소분석의 조건은 column 온도 80°C, injector 온도 90°C, detector 온도 120°C이었으며, carrier gas는 argon을 이용하고 flow rate는 35 mL/min으로 유지하였다.

기타 분석

균체농도는 일정 시간 간격으로 채취한 배양액을 UV-visible spectrophotometer(OPTIZEN 2120UVPlus, Korea)를 사용하여 파장 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 배양액의 pH는 pH meter(Mettler Toledo, USA)를 사용하여 실온에서 측정하였다.

결과 및 고찰

균주의 분리 및 동정

자연계에서 수소생산 균주를 분리하기 위하여 채취한 담수시료를 수소생산용 배지에서 혐기적으로 배양하고 생성된 colony를 순수분리 한 결과, 한 종류의 수소생산 균주(ES392)를 얻을 수 있었다. 분리균주의 고체배지 상에서 colony의 형태는 원형에 가까우며, 색깔은 연한 노란색이고, 표면은 볼록하고 매끄러운 상태였다. 이 균주는 Fig. 2의 전자현미경 사진에서 제시된 것과 같이 길이 1.4 μm (직경 0.6 μm)의 간균이고, 편모가 없으며, 포자를 형성하지 않았다.

분리균주 ES392의 생화학적 특성은 Table 1과 같이



Fig. 2. Transmission electron micrographs of cells of *Enterobacter* sp. ES392. Bar, 0.2 μm .

Table 1. Biochemical characteristics of the strain ES392.

Optimum temperature	35°C	Acetoin production	-
Optimum pH	7.5	Gelatinase	-
Beta-galactosidase	+	Glucose	+
Arginine dihydrolase	-	Mannitol	+
Lysine decarboxylase	+	Inositol	+
Ornithine decarboxylase	+	Sorbitol	+
Citrate utilization	-	Rhamnose	+
H ₂ S production	-	Sucrose	+
Urease	-	Melibiose	+
Tryptophane deaminase	-	Amygdalin	+
Indole production	-	Arabinose	+

+: positive reaction, -: negative reaction

glucose, mannitol, inositol, sorbitol, rhamnose, sucrose, melibiose, amygdalin, arabinose 등을 이용하였으며, H₂S, indole, acetoin 등은 생성하지 않았다. 균주 ES392를 동정하기 위하여 16S rRNA 염기서열을 분석하고 BLAST program을 이용하여 상동성을 분석한 결과 98%의 신뢰도로 *Enterobacter* sp.로 동정되었고, 생화학적 성질이 *Enterobacter* sp.의 유연군으로 분류되어, 최종적으로 *Enterobacter* sp. ES392로 명명하였다. 16S rRNA 염기서열에 근거하여 Clustal W 프로그램으로 계통도(phylogenetic tree)를 작성하고 그 결과를 Fig. 3에 나타내었다.

온도의 영향

균주 ES392의 수소생산에 있어서 배양온도의 영향을 알아보기 위하여 배양배지의 온도를 25°C~45°C까지 변화시켜 균체성장 및 수소생산량을 측정하였다(Fig. 4). 본 균주는 45°C 이상의 온도에서는 균체성장이 매우 낮았고, 35°C

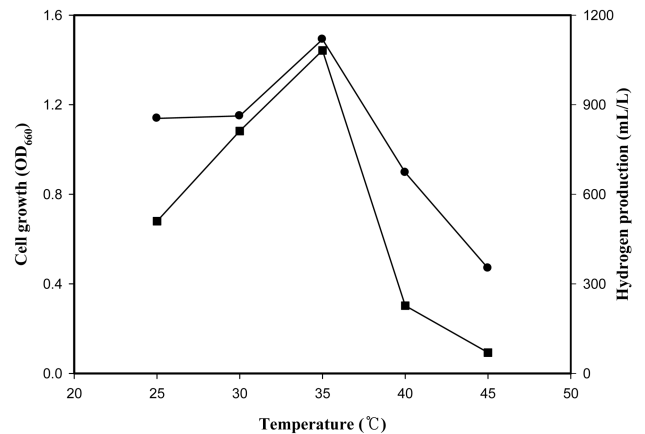


Fig. 4. Effect of temperature on the cell growth and hydrogen production. Symbol: ●, cell growth; ■, hydrogen production.

에서 가장 높은 균체성장을 나타내어 중온성미생물 (mesophile)인 것으로 판단되었다. 수소생산에 있어서 45°C에서는 거의 수소가 생산되지 않았고, 35°C에서 최대수소 생산량인 1082 mL/L을 얻을 수 있었다. 따라서 균체성장 과 수소생산율이 가장 높은 35°C를 최적 배양온도로 선정 하였다.

pH의 영향

배양배지의 초기 pH가 균체성장 및 수소생산에 미치는 영향을 조사하기 위해 pH 6부터 9까지의 조건에서 배양하고 균체성장과 수소생산량을 조사하였다(Fig. 5). Fig. 5에서와 같이 pH 6에서 9까지의 균체성장은 비슷한 결과를 나타냈지만 pH 9에서는 수소생산량이 감소하였다. 한편 pH 7.5에서 수소생산량과 균체성장이 가장 높았기 때문에, 본

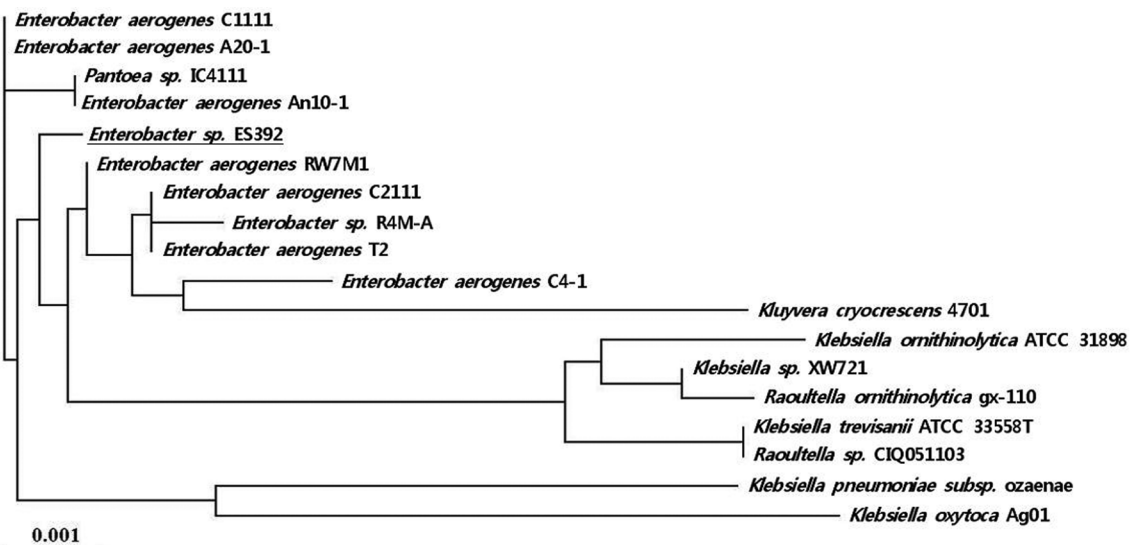


Fig. 3. Phylogenetic position of strain ES392 in the genus *Enterobacter* based on the 16S rRNA partial sequences. The tree was constructed using the neighbour joining method. The bar represents 0.001% sequence divergence.

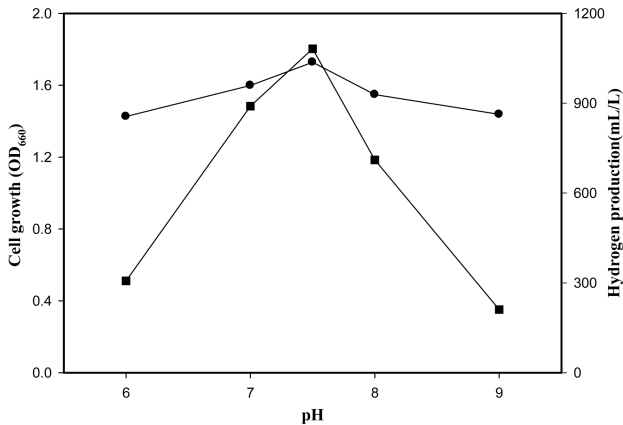


Fig. 5. Effect of pH on the cell growth and hydrogen production. Symbol: ●, cell growth; ■, hydrogen production.

이 ES392 균주의 수소생산을 위한 최적 pH는 기존 보고된 *E. aerogenes*[5]의 최적 pH 6.5 보다는 조금 높았고, *E. cloacae* YJ-1[7]의 최적 pH 7.5와는 동일한 것으로 나타났다.

탄소원 및 질소원의 영향

혐기성 수소생산균은 탄소원 및 질소원의 종류 및 농도에 따라 수소생산량이 다르게 나타난다[8, 15]. ES392 균주의 수소생산에 대한 탄소원의 영향을 조사하기 위하여 각각 다른 농도의 glucose, sucrose, fructose를 첨가하여 균체 성장과 수소의 생산량을 검토하였다. 그 결과로서 모두 4%(w/v) 농도의 sucrose, fructose, glucose에서 각각 1337, 1272, 1082 mL/L의 최대 수소생산량을 얻을 수 있었고, 균체 성장도 sucrose, fructose, glucose 순으로 높았다(Fig. 6). 또한 sucrose의 농도는 4%(w/v)까지는 수소생산량이 증가하였으나 그 이상의 농도에서는 거의 변화가 없었다(data not shown).

질소원이 수소생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 yeast extract, tryptone, peptone을 각각 0.5%(w/v)씩 첨가하여 수소생산에 미치는 영향을 조사하였다. 이때 탄소원은 4%(w/v) sucrose를 사용하였고 기본배지에 포함되는 NH₄Cl은 제외시켰다. Yeast extract, tryptone, peptone을 첨가하였을 때 각각 1337, 910 및 442 mL/L의 수소생산량을 얻을 수 있었다(Fig. 6). 따라서 yeast extract를 첨가한 배지가 수소 생산에 가장 효율적이었다. 또한 yeast extract의 농도를 0.1% (w/v)에서 2%(w/v)까지 달리하여 수소생산량을 측정한 결과 0.5%까지는 수소생산량이 증가하였으나 그 이상의 농도에서는 거의 변화가 없었다(data not shown).

Phosphate의 영향

혐기성세균은 배양말기에 유기산이 축적됨에 따라 pH가 낮아지고 그에 따라 균체성장이 저해되어 수소생산능이 감

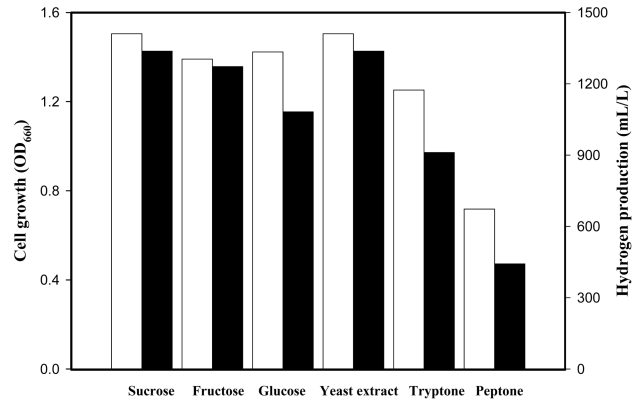


Fig. 6. Effect of various carbon and nitrogen sources on the cell growth and hydrogen production. Symbol: □, cell growth; ■, hydrogen production.

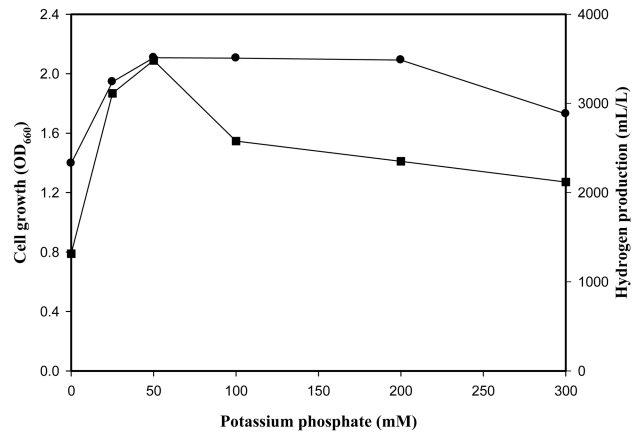


Fig. 7. Effects of phosphate concentration on the cell growth and hydrogen production. Symbol: ●, cell growth; ■, hydrogen production.

소하는 것으로 알려져 있다[5, 7]. 따라서 본 균주의 수소생산능을 향상시키기 위하여 pH 완충제인 potassium phosphate를 25 mM에서 300 mM의 농도로 첨가하고 수소생산의 최적 조건을 조사하였다. 그 결과 phosphate의 농도가 증가함에 따라 수소생산량도 증가하였고, 50 mM phosphate 농도에서 최대의 수소생산량(3481 mL/L)을 나타내어 첨가하지 않은 것에 비해 약 2.6배 정도 수소 생산량이 증가하였다. 그러나, 50 mM 이상의 농도에서는 수소생산에 저해되는 현상이 나타났다. 이와 같은 결과는 다른 수소 생산균인 *E. cloacae* YJ-1의 phosphate 첨가에 따른 결과와 동일한 것으로 나타났다[7].

최적조건 하에서의 수소생산

이상의 실험 결과로부터 ES392 균주의 수소 생산을 위한 최적 조건이 Table 2와 같이 확인되었다. ES392 균주를 최적조건 하에서 배양하여 배양시간에 따른 수소 생산의 결과를 Fig. 8에 나타내었다. 배지의 pH는 수소생산이 증가함에

Table 2. Optimum conditions of *Enterobacter* sp. ES392.

Bacteria	Optimum temperature	Initial pH	Phosphate buffer concentration	Carbon source	Nitrogen source	H ₂ mol/mol sucrose
<i>Enterobacter</i> sp. ES392	35°C	7.5	50mM	4% sucrose	0.5% Yeast extract	1.33

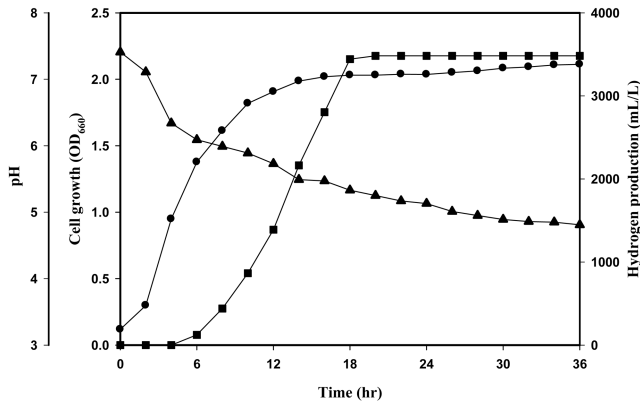


Fig. 8. Cultivation of *Enterobacter* sp. ES392 in the optimum medium composition. Symbol: ●, cell growth; ■, hydrogen production; ▲, pH.

따라 상대적으로 감소하여 36시간 후에는 pH 4.8을 나타내었다. 대수증식기인 6시간부터 수소생산량이 급격히 증가하여 정지기에 접어든 18시간째에 이르러 수소생산이 정지하였고 최대 수소생산량은 3481 mL/L을 나타내었다. 이와 같이 *Enterobacter* sp. ES392 균주의 수소생산량은 기존 보고된 *E. aerogenes*(431 mL/L)[5]와 *E. cloacae* YJ-1(1920 mL/L)[7]의 수소생산량 보다 매우 높은 것으로 나타나서, 본 연구에서 분리한 미생물은 생물학적 수소생산을 위한 균주로 매우 적합하다고 생각된다.

요 약

수소 생산 균주 ES392sms 부산 소재 동의대학교에 위치한 연못 담수에서 분리하였다. 세포는 직경 0.6 μm , 길이 1.4 μm 의 간균이고 편모와 포자를 형성하지 않았다. 분리된 균주의 16s rRNA 염기서열과 생화학적 특성을 바탕으로 계통학적으로 분류한 결과, ES392 균주는 *Enterobacter* sp.에 속하는 것으로 동정되었다. 수소생산을 위한 생육최적 pH와 온도는 각각 7.5와 35°C이었다. 분리한 *Enterobacter* sp. ES392 균주의 수소생산을 최대화 하기 위해 배지성분을 최적화하였다. 그 결과 4%(w/v) sucrose, 0.5%(w/v) yeast extract, 50 mM potassium phosphate를 첨가한 배지 조건에서 최대수소생산량을 나타내었다. 회분식 배양 조건에서 최대 수소 생산량은 3481 mL/L이었고, 수소생산수율은 1.33 mol/mol sucrose를 나타내었다.

REFERENCES

- Bae, M. 1995. Production of bio-hydrogen from waste materials. Research Report, Ministry of Trade, Industry and Energy, 941C401-364FPI.
- Bollinger, R., H. Zurrer, and R. Bachofen. 1985. Photoproduction of molecular hydrogen from wastewater of a sugar refinery by photosynthetic bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 147-151.
- 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.
- Kim, D. J., M. Morikawa, M. Takagi, and T. Imanaka. 1995. Gene cloning and characterization of thermostable peptidyl prolyl cis-trans isomerase (PPIase) from *Bacillus stearothermophilus*. *J. Ferment. Bioeng.* **79**: 87-94.
- Kim, K. H., Y. J. Choi, and E. Y. Kim. 2008. The optimization of biohydrogen production medium by darg fermentation with *Enterobacter aerogenes*. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **23**: 54-58.
- Kondratieva, E. N. and I. N. Gogotov. 1983. Production of molecular hydrogen in microorganism. *Advan. Biochem. Engineer. Biotech.* **28**: 139-191.
- Lee, K. S., C. M. Kang, and S. Y. Chung. 2003. Isolation and characterizaion of hydrogen production bacterium. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **18**: 149-154.
- Lee, K. S., C. M. Kang, and S. Y. Chung. 2005. Medium composition of *Enterobacter cloacae* YJ-1 for maximizing hydrogen production. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **20**: 350-354.
- Sawada, H. and P. L. Rogers. 1977. Photosynthetic bacteria in waste treatment: Pure culture studies. *J. Ferment. Technol.* **55**: 297-310.
- Tanisho, S. and Y. Ishiwata. 1994. Continuous hydrogen production from molasses by the bacterium *Enterobacter aerogenes*. *Int. J. Hydrogen Energy.* **19**: 807-812.
- Tanisho, S., Y. Suzuki, and N. Wakao. 1987. Fermentative hydrogen evolution from various substrates by *Enterobacter aerogenes*. *Hakkokogaku* **67**: 29-34.
- Ueno, Y., S. Otsuka, and M. Morimoto. 1996. Hydrogen production from industrial wastewater by anaerobic microflora in chemostat culture. *J. Ferm. Bioeng.* **82**: 194-197.
- 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.
14. Vignais, P. M., A. Colbeau, J. C. Wilson, and Y. Jouanneau. 1985. Hydrogenase, nitrogenase, and hydrogen metabolism in the photosynthetic bacteria. P. 155-209. *Advan. Microbial. Physiol.* vol. 26, Academic Press.
15. Yerushalmi, L. and B. Volesky. 1987. Culture conditions for growth and solvent biosynthesis by a modified *Clostridium acetobutyricum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 513-520.
16. Zajic, J. E., N. Kosaric, and J. D. Brosseau. 1978. Microbial production of hydrogen. *Advan. Biochem. Engineer.* **9**: 57-109.

(Received June 8, 2010/Accepted Oct. 1, 2010)