

새로운 *Enterobacter asburiae* SNU-1의 혐기발효에 의한  
생물학적 수소생산

Dark fermentation for hydrogen production with a new bacterium  
*Enterobacter asburiae* SNU-1

신중환, 김미선\*, 심상준\*\*, 박태현

서울대학교 화학생물공학부,

\*한국에너지기술연구원 바이오매스연구센터, \*\*성균관대학교 화학공학과

Abstract

미래의 친환경 에너지인 수소에너지 생산을 위해서 생물학적인 수소생산방법에 관한 관심이 증폭되고 있다. 생물학적인 수소생산 방법에는 여러 가지가 있으나 그 중 유기물을 혐기발효하여 수소를 생산하는 방법에 관한 연구가 수행되었다. 본 연구에서 혐기성 미생물인 *Enterobacter asburiae* SNU-1이 쓰레기 매립지 토양에서 분리되어 수소생산 조건의 최적화 실험을 수행하였다. 본 실험에 이용된 미생물의 경우는 기존에 연구된 적이 없는 새로운 종으로써 다른 미생물과는 다른 특징을 나타내며 수소생산 능력도 뛰어난 것을 알 수 있었다. 미생물을 이용한 수소생산에 영향을 미치는 인자로는 pH, initial glucose concentration 등이 있으며 각각의 조건에서 수소생산량을 비교하였다. 실험 결과 strain SNU-1의 최적 pH는 7이었으며 최적 initial glucose concentration은 25 g/l이다. 이와 같은 최적 조건에서 strain SNU-1은 6.87 mmol/l/hr의 productivity를 나타내었다. 또한 다른 미생물과 달리 미생물이 더 이상 자라지 않는 정지기에서 더 많은 수소생산량을 나타내는 특이한 거동을 보이는 것이 관찰되었다.

Key words: *Enterobacter asburiae* SNU-1, 혐기발효, 수소생산

## 1. Introduction

현대의 에너지 위기 속에서 그 대안이 될 수 있는 에너지원이 바로 수소에너지이다. 이러한 수소에너지는 단위질량당 에너지 함유량이 매우 높고 연소부산물로서 물을 발생시킴으로써 어떤 다른 에너지원 보다 더욱 환경친화적인 에너지원이라고 할 수 있다. 또한, 수소에너지는 연료전지의 개발에 힘입어 더욱 그 필요성이 증대되고 있으며 군사/우주개발용 뿐만 아니라 민간/상업용으로 주목 받고 있다[1].

생물학적인 수소 생산 방법에는 혐기성 미생물에 의한 혐기발효, 수성 가스의 개질 반응을 통한 CO로부터의 수소생산, 광합성 미생물에 의한 수소생산으로 나눌 수 있다. 이들 반응 중 혐기발효에 의한 수소 생산방법은 높은 수소 생산량을 나타내며 waste stream을 사용 할 수 있다는 장점과 낮은 yield와 다양한 by product를 생산한다는 단점을 가지고 있다. 그러나 이러한 단점에도 불구하고 높은 수소생산량으로 인해 실제 응용 가능성이 제일 높기 때문에 최근에 많은 관심이 쏠리고 있다. 이러한 혐기발효에 사용되는 미생물은 절대혐기성 미생물과 통성 혐기성 미생물로 나눌 수 있다. 절대 혐기성 미생물의 수소생산 yield는 이론적으로 4 mol H<sub>2</sub>/mol로서 통성 혐기성 미생물(2 mol H<sub>2</sub>/mol) 보다 높으나 산소에 매우 민감하여 산소에 조금만 노출되어도 활성이 급격히 감소하여 수소생산이 저해되는 단점 때문에 실험공정이 매우 까다롭다. 이에 비해 통성 혐기성 미생물은 산소에 덜 민감하여 노출되더라도 그 산소가 모두 소모되면 다시 수소를 생산 할 수 있어서 공정이 절대 혐기성 미생물 보다 단순하여 scale-up시 손쉬운 장점이 있다. 따라서 통성 혐기성 미생물을 이용한 수소 생산방법이 널리 이용되고 있으며 산업적으로도 더 적합한 균주라고 할 수 있다.

따라서 본 연구에서는 새롭게 쓰레기 매립지 토양에서 분리된 새로운 종의 통성 혐기성 미생물인 *Enterobacter asburiae* SNU-1을 통해 이 미생물의 성장조건 최적화와 수소 생산조건 최적화를 통해 보다 많은 양의 수소 생산을 목적으로 실험을 수행하였다.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Isolation of bacterial strain SNU-1

가정 쓰레기 매립지로부터 soil samples을 수집하여 LB 배지에서 수 시간 동안 배양하였다. 이렇게 배양된 배양액 0.5 ml을 다시 50 mM L-HPA, 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.2), 100 mM glycerol, 1 g/l MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1 mg/l ZnCl<sub>2</sub>, 0.1 mg/l MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.02 mg/l H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.1 mg/l CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.05 mg/l CoCl<sub>2</sub>, 0.1 mg/l NiSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O, 2.0 mg/l NaMoO<sub>4</sub>, 그리고 4.0 mg/l FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O로 구성된 minimal medium에 접종하여 37°C에서 2일 동안 배양하였다. 이러한 과정을 3회 반복하여 enriched culture를 수행하였다. Enriched culture 후에 같은 배지 조성을 가진 agar plate위에서 배양하여 plate 위에 형성된 각 colony를 LB 배지에서 배양하였다. 이렇게 얻어진 순수한 미생물을 25% glycerol이 포함된 배지에서 -70°C로 보관하였다.

## 2.2. Biochemical test

*Strain* SNU-1의 생화학적 특징을 알아보기 위해 API kit를 사용하였다. biochemical test는 saline 용액에 *strain* SNU-1을 현탁하여 장내세균과 gram negative 균의 동정에 사용되는 API20E kit를 사용하여 건조된 기질이 들어있는 kit의 cupules에 접종하여 배양 후 발색시약을 첨가하여 기질의 대사유무를 색의 변화로 판정하였다.

## 2.3. 16S rDNA sequencing and phylogenetic analysis

균주의 동정을 위해 16S rDNA를 PCR로 증폭 후 cloning하였다. Cloning된 16S rDNA는 DNA sequencer로 full sequencing하였으며 이 결과를 Ribosomal Database Project (RDP)와 비교하여 이차구조를 참고하여 sequence를 alignment한 후 다른 균주와 similarity를 조사하였다. 이러한 결과를 바탕으로 Neighbor-joining method로 phylogenetic tree를 작성하였다[2-7].

## 2.4. Identification using DNA hybridization

정확한 동정을 위해 16S rDNA 염기서열의 계통분석 결과에서 *strain* SNU-1과 가장 가까운 유연관계에 있는 균주인, *Enterobacter asburiae* (JCM 6051T), *Pantoea agglomerans* (JCM 1236T), *Enterobacter cancerogenus* (LMG 2693T) 등을 대상으로 DNA-DNA hybridization 실험을 수행하였다.

## 2.5. Hydrogen production in batch fermentor and analysis

빛의 공급 없이 발효기(Fermentor) 내에서 질소 purging을 통해 혐기적 조건을 만들어 glucose발효를 통해 수소를 생산하였다. 배지는 glucose가 포함된 PYG 배지를 사용하였으며 실험 목적에 따라 다른 농도의 glucose와 yeast extract를 사용하여 배양하였다. Seed culture시 혐기적 조건은 배지가 들어있는 120 ml serum bottle에 약 3분간의 N<sub>2</sub> 기체를 흘려준 후 butyl rubber septum과 aluminum cap으로 봉하였다. 이렇게 처리한 배지에 cell을 주입한 후 12시간에서 15시간 동안 37°C에서 220 rpm으로 배양하였다. 위와 같은 방법으로 혐기적 조건에서 seed culture한 미생물을 fermentor로 옮긴 후 N<sub>2</sub> 기체를 흘려주어 혐기적 조건을 만들어 준 후 main culture를 시작하였다.

미생물 농도는 UV-visible spectrophotometer(Spectronic genesys 5, spectronic instruments)를 사용하여 680 nm파장에서 측정 한 후 이를 건조중량(dry cell weight)과의 상관관계를 구하여 사용하였다. 수소기체의 분석은 carbon molecular sieves column (Carboxen-1000 column, Supelco Inc.)과 TCD detector가 장착된 gas chromatography (Hewlett packard 5890 SERIES)를 이용하여 분석하였다. 수소가스의 GC 분석조건은 oven 온도 30°C, injector 온도 120°C, detector 온도 120°C로 유지하였으며, carrier gas는 Ar gas를 57~58 ml/min의 유속으로 흘려주었고, gas sample은 gas-tight microsyringe로 0.1 ml을 뽑아서 주입하였다. Glucose 농

도는 enzymatic method(sigma glucose kit)를 이용하여 분석하였다.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Phenotypic characterization of *Enterobacter asburiae* SNU-1

높은 수소 생산능력을 가진 strain SNU-1을 가정쓰레기 매립지 토양으로부터 분리하였다. 이 균주의 동정을 위해 biochemical test와 16S rDNA full sequencing 그리고 DNA-DNA hybridization 실험을 수행하였다. API 20E kit를 통해 수행된 biochemical 실험결과 여러가지 기질에 대한 대사반응이 나타났으며 그 결과는 table 1과 같다. 이 결과는 *Enterobacter cloacae*와 90.9%의 유사도를 나타냄을 알 수 있었다. 16S rDNA full sequencing을 통해 약 1400개의 염기가 결정되었으며 이를 바탕으로 유사도를 측정 한 결과 *Enterobacter asburiae* JCM 6051T, *Pantoea agglomerans* JCM 1236T, *Enterobacter cancerogenus* LMG 2693T와 99% 이상의 유사도를 나타내었으며 2차 구조를 참고하여 만든 phylogenetic tree를 통한 계통수 분석에서도 같은 결과를 나타내었다. 이러한 결과로 보아 본 연구에 사용되는 대상 균주가 어느 종인지 판별 할 수가 없었다. 따라서 보다 정확한 균주 동정을 위해 DNA-DNA hybridization 실험을 수행하였다. 그 결과 strain SNU-1은 *Enterobacter asburiae*와 76.7%의 유사도를 나타내었으며 이는 70% 이상의 유사도를 보이면 같은 종으로 판별하는 동정 기준에 따라 *Enterobacter asburiae* SNU-1로 명명하였다. 이 균주는 현재 수소생산에 관한 연구가 진행되지 않은 균주로서 그 독창성을 가지며 현재 연구가 진행 중인 다른 균주와 비교하여도 전혀 뒤지지 않는다.

#### 3.2. Fermentation profiles of glucose as a substrate

*Enterobacter*와 같은 fermentative bacteria는 발효과정 중 여러 가지의 유기산을 생성하기 때문에 배양액의 pH가 급격하게 떨어진다[1,8,9]. 따라서 본 연구에 사용 중인 균주인 *Enterobacter asburiae* SNU-1이 glucose fermentation 중에 어떠한 양상을 보이는지 관찰해 보았다. 배지의 조성은 glucose 10 g/l, yeast extract 3 g/l, peptone 20 g/l, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g/l을 사용하였으며 배양온도는 37°C로 유지하였다. 위와 같은 조건에서 pH control없이 1 l의 fermentor에서 발효 중 pH 변화 양상을 관찰한 결과 pH가 급격히 떨어져서 glucose가 배양액 중에 잔존함에도 불구하고 미생물이 stationary phase에 도달 한 것을 볼 수 있었다(Fig. 1). 따라서 보다 높은 미생물의 성장과 수소생산을 위해서는 pH control이 필요하다.

#### 3.3. Effect of pH

미생물을 이용한 수소생산에서 중요한 인자는 pH, initial glucose concentration, initial yeast extract concentration 등이 있다. 본 연구에서는 이러한 중요한 인자들에 대해 *Enterobacter asburiae* SNU-1이 어떠한 거동을 나타내는지 조사하였다.

앞서 살펴 본 바와 같이 발효과정에 생산된 유기산은 배지의 pH를 급격히 떨어뜨리기 때문에 pH control이 필요하다. 따라서 각각의 pH에서 수소생산량과 미생물 growth를 관찰하였다. 배지조성과 온도는 앞의 실험과 동일하며 각각의 실험에 따라 다른 pH를 적용하였다. 실험결과 *Enterobacter asburiae* SNU-1은 pH 7에서 가장 많은 수소 생산을 나타내었으며, 그 때의 maximum hydrogen production rate는 194 ml/l/hr였다(Fig. 2). 또한, *Enterobacter asburiae* SNU-1은 넓은 영역의 pH(4~7.5)에서 수소생산을 나타내고 있는 것으로 보아 폐수처리 공정과 같은 산업적 응용에 있어서 더욱 유용 할 것이다.

### 3.4. Effect of initial glucose concentration

수소 생산량과 미생물 생장은 초기의 glucose농도가 증가함에 따라 증가하기도 하고 어느 이상의 양을 넣어주었을 경우는 오히려 저해를 받는다[1,9]. 이러한 initial glucose concentration의 효과를 알아보기 위해 다양한 glucose 농도(2~50 g/l)에서 수소 생산량을 관찰해 보았다. 그 결과 initial glucose concentration가 25 g/l까지 증가 할 경우는 수소생산량이 증가하였으나 그 이상의 initial glucose concentration에서는 더 이상 수소생산량 증가를 보이지 않았고 glucose 25 g/l에서 6.87 mmol/l/hr의 productivity를 나타내었다(Fig. 3). 또한, 여기서 우리가 주목 할 점은 exponential phase에서의 수소 생산량보다 stationary phase에서 더 많은 양의 수소를 생산한다는 것이다. 이는 stationary phase에서 어떤 원인에 의해 metabolic shift가 일어났음을 예측 할 수 있었다. stationary phase에서의 outlet gas의 hydrogen content 또한 exponential phase에서 보다 높게 유지되는 것으로 보아 이 시기에 cell이나 다른 metabolite로 가는 metabolic flux가 hydrogen으로 shift되었음을 말해주고 있다고 할 수 있다. 이러한 이유는 metabolite 분석과 metabolic flux 분석을 통해 좀 더 정확히 알 수 있을 것이다.

### 3.5. Batch fermentation of *Enterobacter asburiae* SNU-1 on different carbon sources

Fermentative bacteria의 장점 중 하나는 waste stream을 이용 할 수 있다는 것이다. 이는 다양한 carbon sources를 이용 할 수 있어야만 한다는 것을 의미한다. 따라서 이러한 산업적 이용 가능성을 위해 *Enterobacter asburiae* SNU-1이 다양한 carbon sources를 이용 할 수 있는지 알아보았다. 그 결과 단당류, 이당류, alcohol 등을 이용하여 수소를 생산 할 수 있는 미생물임을 알 수 있었다(Fig. 4). 이는 이 미생물을 폐수처리 공정에도 이용 할 수 있는 가능성을 보여주는 것이다.

## 4. Conclusion

가정쓰레기 매립지 토양에서 분리된 *Enterobacter asburiae* SNU-1은 수소 생산을 위해 연구되지 않은 종(species)으로써 이전에 연구된 균주들과 비교하여도 전혀 손색없는 균주임이 밝혀졌다. 이 균주는 매우 넓은 영역의 pH(4~7.5)에서도 수

소를 생산하며 그 중 pH 7에서 가장 높은 수소생산량을 나타냄을 알 수 있었다. 또한, fermentative bacteria는 initial glucose 농도에 따라 수소생산량과 미생물 생장이 영향을 받는다. *Enterobacter asburiae* SNU-1의 경우 initial glucose 농도가 증가함에 따라 수소생산량이 증가하다가 25 g/l이상의 glucose 농도에서는 더 이상 증가하지 않는 경향을 나타냈다. 또한, *Enterobacter asburiae* SNU-1은 stationary phase에서 높은 수소생산을 나타낸다. 이는 수소생산을 위한 대표적인 3가지 pathway 중에서exponential phase에서 사용되는 pathway 외에 또 다른 pathway가 stationary phase에서 사용 될 가능성과 발효를 통해 생성된 intermediate product 나 end product를 사용하여 수소를 생산 할 가능성이 있다. 이는 metabolite 분석과 metabolic flux 분석을 통해 알 수 있을 것이다. 이 밖에 *Enterobacter asburiae* SNU-1은 다양한 종류의 carbon sources를 이용 할 수 있으며 넓은 영역의 pH에서도 수소 생산을 할 수 있는 점으로 보아 폐수처리 공정과 같은 환경분야로의 응용에도 유용한 균주일 것이라 생각된다.

이 밖에 mutation을 이용한 metabolic pathway control 그리고 genetic engineering을 이용하여 더 높은 수소 생산량과 yield를 얻을 수 있을 것이다. 이와 별도로 공정 개발을 통해 수소생산량의 향상을 기대 할 수 있다.

### Acknowledgements

본 연구는 과학기술부의 지원으로 수행하는 21세기 프론티어 연구개발사업의 일환으로 수행되었습니다.

### References

- [1] Oh Y-K, Seol E-H, Lee EY, Park S. Fermentative hydrogen production by a new chemoheterotrophic bacterium *Rhodospseudomonas palustris* P4. *Int J Hydrogen Energy* 2002;27:1373-9.
- [2] Saitou N, Nei M, The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Bio Evo* 1987;4:406-25.
- [3] Elbeltagy A, Nishioka K, Sato T, Suzuki H, Ye B, Hamada T, Isawa T, Mitsui H, Minamisawa K. Endophytic Colonization and In Planta Nitrogen Fixation by a *Herbaspirillum* sp. Isolated from Wild Rice Species. *Appl Envir Microbiol* 2001;67:5285-93.
- [4] Asis CA, Adachi. K, Isolation of endophytic diazotroph *Pantoea agglomerans* and nondiazotroph *Enterobacter asburiae* from sweetpotato stem in Japan. *Lett Appl Microbiol* 2004;38(1):19-23.
- [5] Brenner DJ, McWhorter AC, Kai A, Steigerwalt AG, Farmer JJ 3rd. *Enterobacter asburiae* sp. nov., a new species found in clinical specimens, and reassignment of *Erwinia dissolvens* and *Erwinia nimipressuralis* to the

- genus *Enterobacter* as *Enterobacter dissolvens* comb. nov. and *Enterobacter nimipressuralis* comb. nov. *J Clin Microbiol* 1986;23:1114-20.
- [6] Dauga C. Evolution of the *gyrB* gene and the molecular phylogeny of *Enterobacteriaceae*: a model molecule for molecular systematic studies. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002;52: 531-47.
- [7] Gavini F, Mergaert J, Beji A, Mielcarek C, Izard D, Kersters K, De Ley J. Transfer of *Enterobacter agglomerans*(Beijerinck 1888) Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen. nov. as *Pantoea agglomerans*comb. nov. and description of *Pantoea dispersa* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1989;39:337-45.
- [8] Kumar N, Das D. Enhancement of Hydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08. *Process Biochem* 2000; 35:58993(Erratum,35:9:1074).
- [9] Oh Y-K, Seol E-H, Kim JR, Park S. Fermentative biohydrogen production by a new chemoheterotrophic bacterium *Citrobacter* sp. Y19. *Int J Hydrogen Energy* 2003;28:1353-9.
- [10] Van Niel EWJ, Buddeb MAW, De Haas G.G., Van der Wal FJ, Claassen PAM, Stams AJM. Distinctive properties of high hydrogen producing extreme thermophiles, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and *Thermotoga elfi*. *Int J Hydrogen Energy* 2002;27:139198

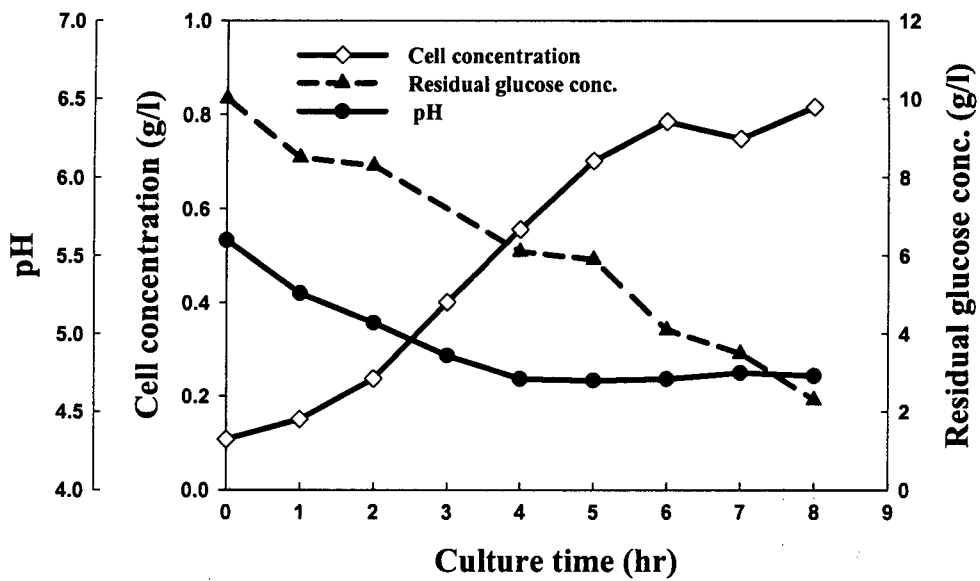


Fig.1. Glucose Consumption and pH Change During the Culture



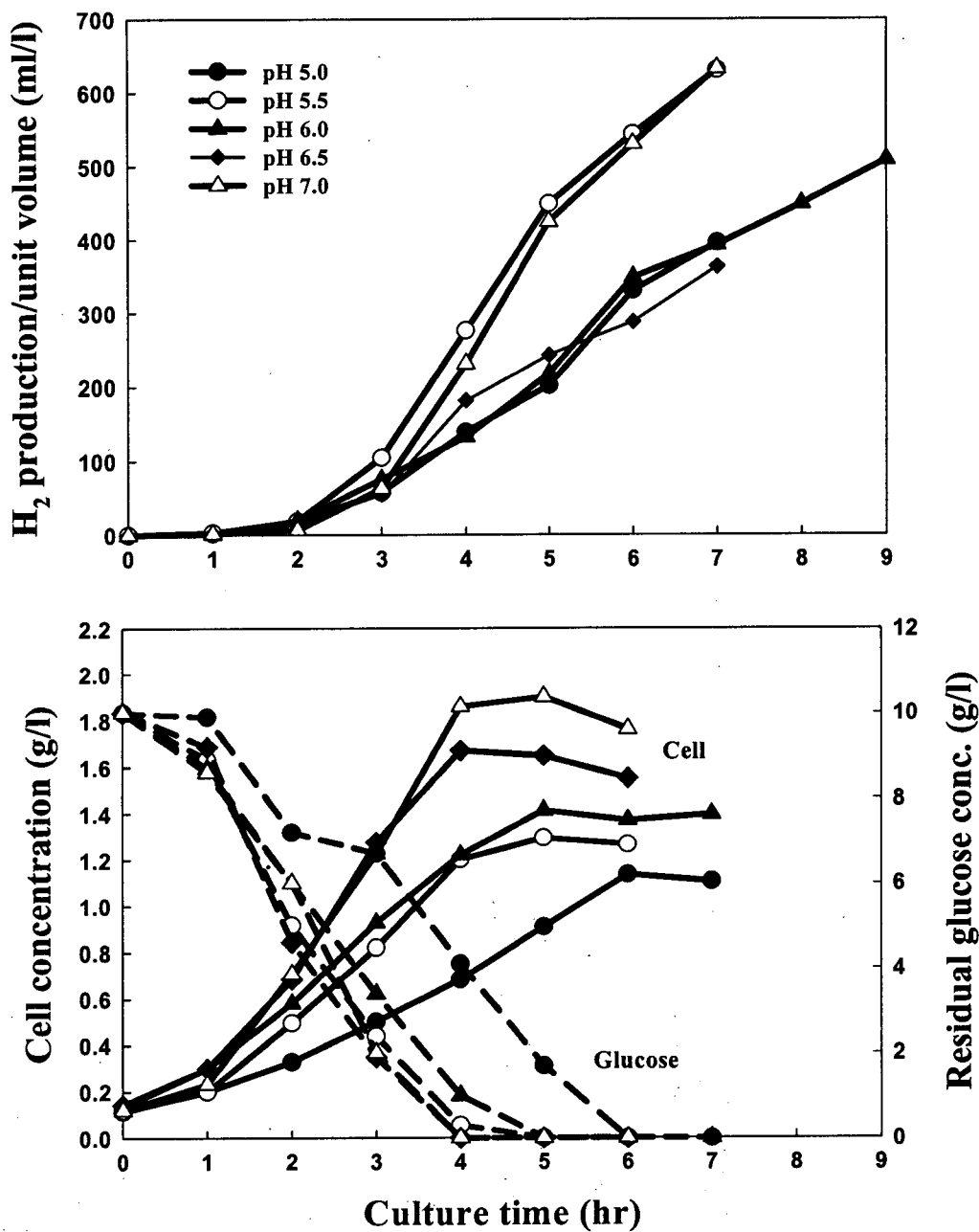


Fig.2. Batch Fermentation of *Enterobacter asburiae* SNU-1 for H<sub>2</sub> Production

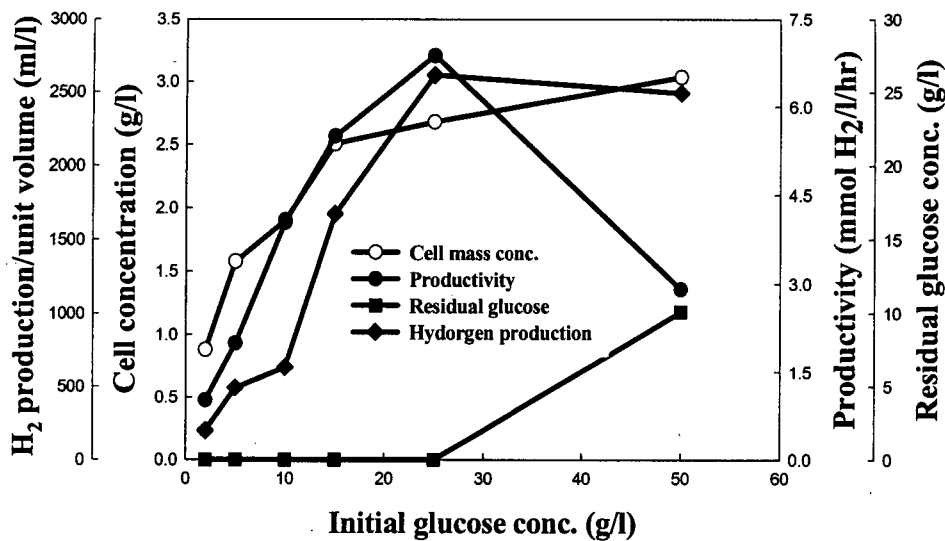


Fig.3. Effect of initial glucose concentration

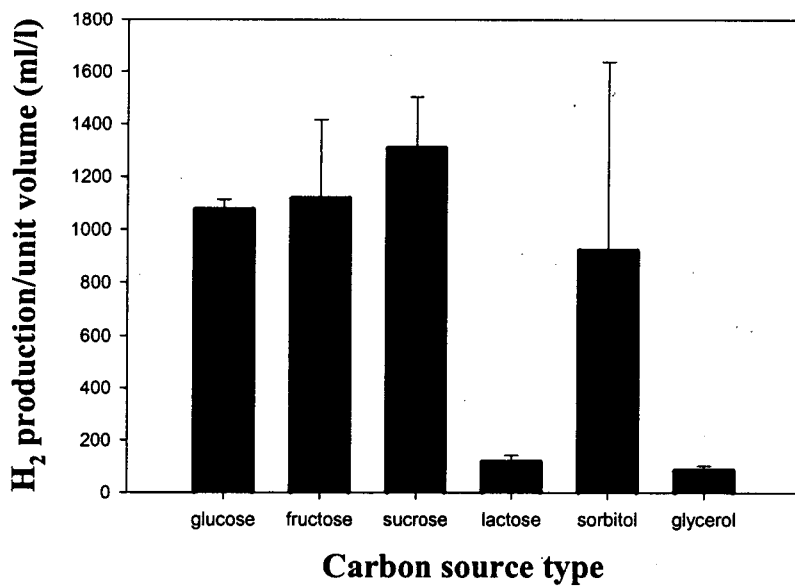


Fig.4. Batch fermentation of *Enterobacter asburiae* SNU-1 on different carbon sources