

수소생산균 *Enterobacter cloacae* YJ-1의 분리 및 특성

이 기 석 · ¹강 창 민 · † 정 선 용
전남대학교 공과대학 환경공학과, ¹초당대학교 공과대학 환경공학과
(접수 : 2003. 3. 5., 게재승인 : 2003. 4. 25.)

Isolation and Characterization of Hydrogen Producing Bacterium

Ki-Seok Lee, Chang-Min Kang¹, 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 : 2003. 3. 5, Accepted : 2003. 4. 25.)

The hydrogen-producing bacterium was isolated from fresh water and identified as *Enterobacter cloacae*. The isolated was named *Enterobacter cloacae* YJ-1. In batch culture, The optimum cultivation temperature and pH of strain YJ-1 was 35°C and 7.5, respectively. All of the added glucose was consumed completely during fermentation even though pH was not controlled. Amount of hydrogen produced on each condition of 2% glucose, 4% sucrose and 5% fructose was 950, 1000 and 948 mL/L, respectively and resulted in increasing hydrogen production approximately 2.5-times more than controlled condition. The maximum hydrogen production was obtained when 50 mM phosphate was added. In repeated-batch culture, hydrogen gas of 1920 mL/L was totally produced for 48. The maximum hydrogen was produced on the condition of 0.5% yeast extract, but the production amount was not changed on the condition of over 0.5%. Most of the organic acids produced during the fermentation were formic and acetic acid, and propionic acid was moiety also generated.

Key Words : Hydrogen production, *Enterobacter cloacae*, organic acids

서 론

최근 생물학적 방법에 의하여 수소, 에탄올, 메탄 등과 같은 대체 에너지 생산에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. (1). 특히 수소는 단위 중량당의 발열량이 클 뿐만 아니라 연소 후 CO₂, 및 SO_x, NO_x 등 지구 온난화 가스를 발생하지 않는 청정 에너지원으로 주목받고 있다(2-5). 자연계에서 수소를 생산할 수 있는 미생물은 크게 광합성 세균(6), 혐기성 세균(7,8), 조류(9) 등으로 구분되며, 이들의 수소 생성 기작, 사용가능 기질 및 수소 발생량에는 상당한 차이가 있다.

혐기 발효에 의한 수소생산은 빛이 없는 조건에서 이루어지므로 옥외 배양 시 태양광 유무에 관련없이 지속적으로 수소를 발생시킬 수 있으며, 광합성 미생물의 빛 흡수에 따른 수소 생산 효율에 문제점이 없기 때문에 혐기적 조건에서 배양장치의 대형화가 쉽게 이루어질 수 있다. 또한 발효산물을

기질로 이용되어 혐기발효와 광합성 배양을 계속적인 이상(two phase)으로 하거나, 해당 미생물을 동시 배양할 때 유기물질로부터 수소생산을 최대화 할 수 있다(10-12). 발효에 의한 수소생산은 암 조건에서 혐기 미생물에 의해 유기물, 특히, 수분함량이 높은 유기성 폐수를 기질로 하여 배양액 중에 각종 유기산, 유기용매를 축적하고 동시에 수소와 CO₂를 발생한다. 생성되는 발효산물의 종류와 비율은 초기 배양조건인 pH, 온도, 기질의 종류와 농도, 무기물의 농도 등에 영향을 받을 뿐만 아니라, 이미 발효과정에서 생성된 대사산물인 유기산과 유기용매에 의해서도 수소생성에 영향을 받는다(13, 14). *Clostridium butyricum*, *Clostridium pasteurianum*, *Klebsiella pneumoniae* 및 *Micrococcus lactilyicus*는 가장 잘 알려진 혐기발효 수소생성 박테리아로서, 현재 이들을 이용한 수소생산에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 최근 일본을 비롯한 선진국에서 혐기성 미생물을 이용하여 수소에너지 생산과 더불어 유기성 폐기물 처리라는 두 가지 목적에 부합하는 연구가 행해지고 있다. 이외에도 수소 생산능 개선을 위한 균체 고정화기술 이나 혼합배양, 반응기 형태, 폐수 이용 등의 연구가 진척되고 있다(15-17). 본 연구에서는 수소를 생산할 일환으로 우수한 균주를 확보하기 위하여 자연계로부터 혐기성 미생물을 분리하였으며, 분리된 균주는 동정

† Corresponding Author : Department of Environmental Engineering, College of Engineering, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea.

Tel : +82-62-530-0858, Fax : +82-62-530-0742

E-mail : sychung@chonnam.ac.kr

하고, 균주의 특성 및 수소생산에 미치는 영향 인자에 대하여 검토하였다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 배지 조성

자연계에서 수소생산균의 분리를 위해 전남지역의 담수시료를 20여점 채취하여 균 분리원으로 사용하였다. 균 분리용 및 수소생산에 사용된 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, KH_2PO_4 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4 g, NaCl 0.4 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g, NH_4Cl 0.4 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g, Trace element solution 0.1 mL이다. Trace element solution은 1 L당 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.02 g, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.02 g, $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g이다. 균 분리용 시료를 상기 배지의 40 mL이 든 100 mL serum 병에 5%(v/v)를 접종하여 질소를 채운 혐기적 조건으로 35°C에서 수 일간 진탕 배양시켜 현탁되면 이 현탁액 1%(v/v)를 다시 새로운 배지에 주입하였다. 이와같은 방법으로 3회 계대배양한 후 평판배지에서 도말하여 생성된 집락을 순수분리하여 선별하였다. 순수분리된 균들은 다시 0.5(w/v)의 glucose가 첨가된 액체배지에서 접종하여 혐기적 조건에서 배양하여 균체성장과 발생된 수소가스를 분석하여 최종적으로 우수한 단일 균주를 선별하여 본 연구에 사용하였다.

균주의 배양

전배양은 상기와 같이 100 mL의 serum 병에 배지를 40 mL 주입한 후 분리된 strain YJ-1을 접종하여 35°C, 120rpm에서 2일간 혐기적으로 배양시켰다. 본배양은 Figure 1에서 나타낸 것처럼 2 L 반응기에 배지를 1 L로 하여, 전배양과 같은 조건으로 배양액의 1%(v/v)를 접종하여 배양하였으며, 배양 중에 pH는 조절하지 않았다.

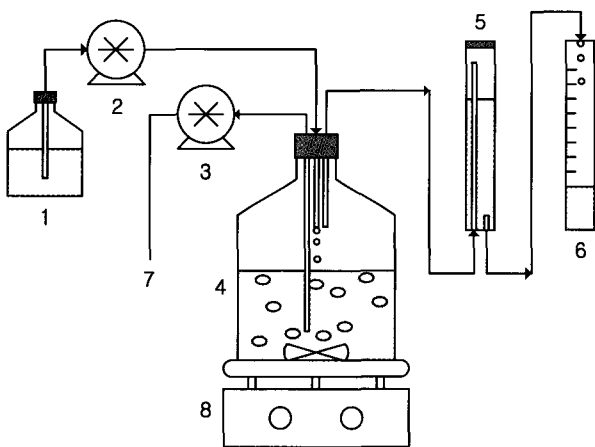


Figure 1. Schematic diagram of the experimental apparatus for hydrogen production.

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

균주의 동정

수소생산능이 우수한 균주에 관한 동정은 먼저 그림염색을 통한 현미경상에서의 형태학적 관찰과 API 20E kit를 이용한 생화학적 특성을 검사하였으며, 분리 균의 형태는 전자 현미경(SEM, DSM940A, Germany)을 이용하여 관찰하였다.

수소가스분석

배양 중 발생되는 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×200 mm(길이×지름) glass로 molecular sieve 5A(supel. Inc)를 충전 물질로 사용하였으며, thermal conductivity detector(TCD)로 분석하였다. 수소분석의 조건은 column 온도 80°C, injector 온도 100°C, detector 온도 120°C 이었으며, carrier gas는 argon을 이용하고 flow rate는 35 mL/min으로 유지하였다.

유기산 분석

유기산은 균체와 상등액을 분리한 후 상등액 20 µL를 유기산 분석용 column인 Aminex HPX-87H, 300 mm×7.8 mm (길이×지름)를 장착한 HPLC Beckman Gold System으로 실온에서 측정하였다. 각종 유기산 peak는 UV detector를 이용하여 파장 210 nm에서 측정하였으며, 0.01N H_2SO_4 를 이동상으로 하여 flow rate 0.6 mL/min로 용출하였다.

잔존 glucose량 측정

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.

기타 분석

배양액의 pH는 pH meter(Orion, model 420A)로 실온에서 측정하였다. 균체농도는 일정 시간 간격으로 채취한 발효액을 UV-visible spectrophotometer(Hew-lett Packard, 8452A Diode Array Spectrophotometer)로 파장 660 nm에서 측정하였다.

결과 및 고찰

분리균주의 동정

본 연구에서 분리균주 YJ-1을 한천 배지에서 배양한 후 전자현미경으로 관찰한 결과 세포의 형태가 Figure 2와 같이 간균이었다. Table 1은 분리균주의 생리학적 성질을 조사한 결과 Gram 음성으로서, 운동성이 없었으며, catalase 시험 및 VP 시험 양성, oxidase 시험 음성, H_2S 를 생성하지 않았다. 탄소원 이용성을 조사한 결과 Glucose, Mannitol, Sorbitol, Rhamnose, Sucrose, Melibiose, Amygdalin, Arabinose 등은 이용하였으나, Inositol은 이용하지 못하였다. 이상의 형태 및 생리학적 특성을 토대로 하여 동정한 결과, *Enterobacter cloacae* 또는 그 유연군으로 동정되어 분리균을 *Enterobacter*

cloacae YJ-1로 명명하였다.

Table 1. Morphological and physiological characteristics of isolated strain YJ-1

Characteristics	Isolated strain YJ-1
Morphology	
Gram stain	-
Shape	Rod
Mobility	Non motile
Flagella	Non found
Physiology	
Catalase	+
Oxidase	-
VP test	+
Gelatin liquefaction	-
Production of indole	-
Utilization of citrate	+
Urease	-
Arginine dehydrase	+
Ornithine decarboxylase	+
Lysine decarboxylase	-
Nitrate reduction	+
Production of H ₂ S	-
Acid form	
Glucose	+
Mannitol	+
Inositol	-
Sorbitol	+
Rhamnose	+
Sucrose	+
Melibiose	+
Amygdalin	+
Arabinose	+

+ : positive reaction, - : negative reaction

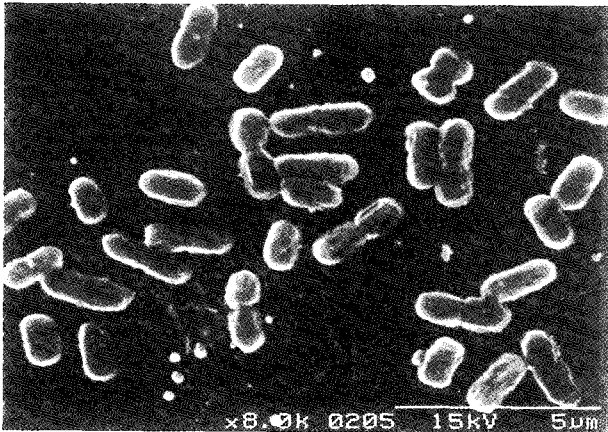


Figure 2. Scanning electron microscopy of isolated strain YJ-1.

온도의 영향

Fig.3은 초기 배양배지의 온도를 25℃에서 45℃까지 변화시켜 균체성장 및 수소생산에 미치는 영향에 대한 실험을 수행하였다. 균체성장은 30℃에서 40℃까지 비슷한 수준으로 나타났으나 45℃ 이상의 온도에서는 균체성장이 상당히 낮게 나타났다. 이 균주는 중온성 미생물(mesophile)로 45℃ 이상의 온도에서는 균체성장이 저해되기 때문에 사료된다. 수소생산을 살펴본 바 초기 25℃에

서 35℃까지 온도가 상승함에 따라 계속적으로 증가하여 35℃에서 최적이었으며 최대 수소생산은 400 mL/L를 얻을 수 있었다. 따라서 수소생산과 균체성장이 가장 높은 35℃의 온도를 최적 배양온도로 선정하였다.

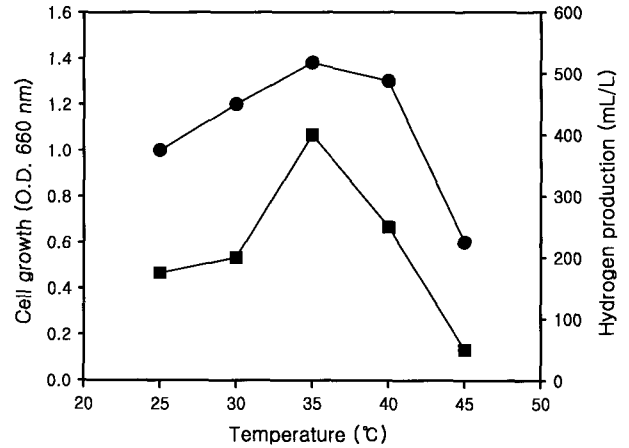


Figure 3. Effect of temperature on cell growth and hydrogen production with 0.5%(w/v) glucose at pH 6.8. ● : cell growth, ■ : hydrogen production.

pH의 영향

배양배지의 초기 pH가 균체성장 및 수소생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 pH 5.5부터 8.5까지의 조건에서 실험을 수행한 결과, Fig. 4에서와 같이 pH 5.5에서는 균체의 성장과 수소생산이 낮았으며, pH 7.5에서 수소생산과 균체성장이 높았다. 따라서 수소생산과 균체성장이 가장 높은 pH 7.5를 최적의 pH 조건으로 선정하였다.

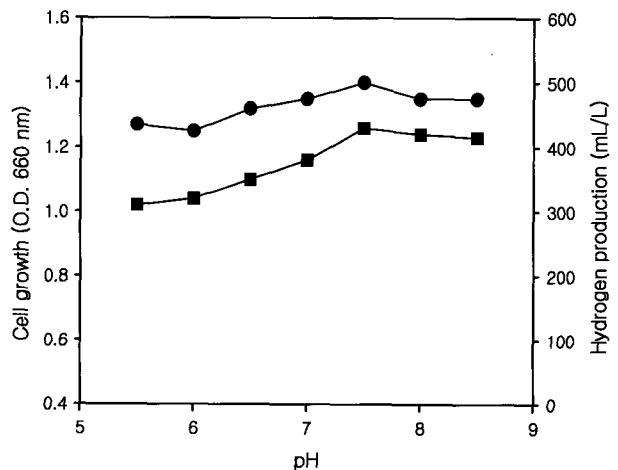


Figure 4. Effect of pH on cell growth and hydrogen production with 0.5%(w/v) glucose at 35°C. ● : cell growth, ■ : hydrogen production.

배양시간에 따른 수소생산성 변화

Figure 5는 앞에서 얻어진 최적조건인 35°C에서 pH 7.5로 하여 배양시간에 따른 수소생산의 변화를 조사하였다. 그 결과, 8시간부터 glucose 분해에 따른 수소생산이 급격하게 증가하여 36시간에 전부 소모되었으며, 균체성장 또한 높게 나타내었다. 따라서 수소생산은 36시간에서 최대의 결과를 나타내었다. 이와 같이, 최적조건인 35°C와 pH 7.5로 하여 회분식 배양으로 다음 실험에 사용되었다.

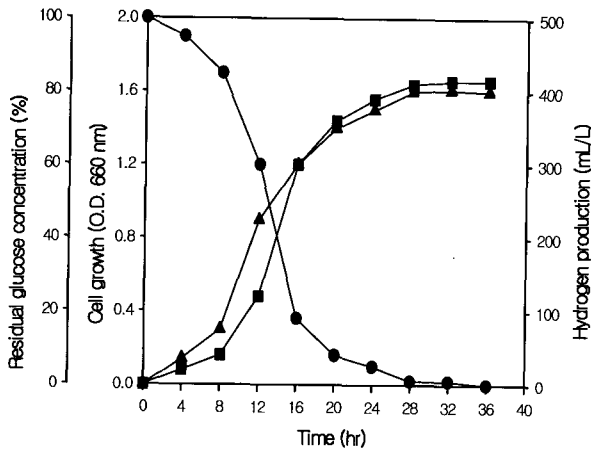


Figure 5. Change of residual glucose concentration, cell growth and hydrogen production with time in 0.5%(w/v) glucose at 35°C and pH 7.5. ● : residual glucose concentration, ▲ : cell growth, ■ : hydrogen production.

탄소원의 영향

Figure 6는 세 종류의 탄소원에 대한 탄소원의 농도와 수소생산의 관계를 나타내고 있다. 수소생산은 0.5%(w/v)에서 5%(w/v)까지 탄소원의 종류 및 탄소원의 농도에 따라 다르게 나타났(18,19). glucose, sucrose와 fructose를 사용하였을 때 수소생산은 계속 증가하여 각각 다른 농도에서 최대를 보였다. 따라서 초기 각 탄소원 농도를 증가시킴으로써 2.5 배 이상의 수소생산을 얻을 수 있다. 이 분석 결과로서, 최대의 수소생산은 2%(w/v) glucose, 4% sucrose, 5% fructose에서 각각 950, 1000, 948 ml/L를 얻을 수 있었다.

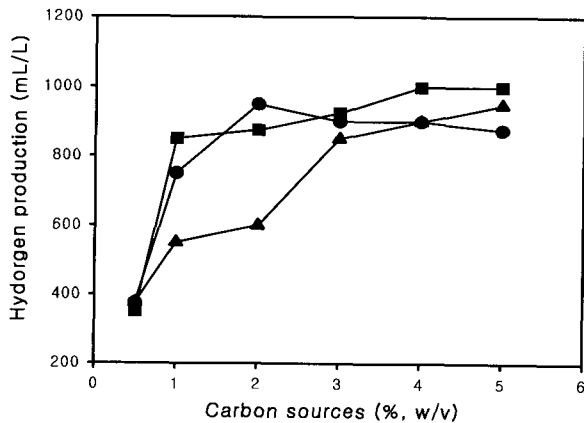


Figure 6. Effect of various carbon source concentration on hydrogen production. ● : glucose, ■ : sucrose, ▲ : fructose.

Phosphate의 영향

Figure 7은 phosphate의 첨가가 반응에 미치는 영향을 나타내고 있다. 배양말기에 축적된 유기산이 균체성장을 저해시켜 수소생산능을 저해시킬 수 있다. 따라서 수소생산을 향상하기 위해서 pH 완충제인 phosphate를 5 mM에서 300 mM 농도로 증가시켜 수소생산의 최적조건을 살펴보았다. phosphate의 농도가 증가됨에 따라 수소생산도 증가하였으며, 50 mM phosphate 농도에서 최대의 수소생산을 나타내었고 그 이상에서는 수소생산에 저해 현상이 나타났다.

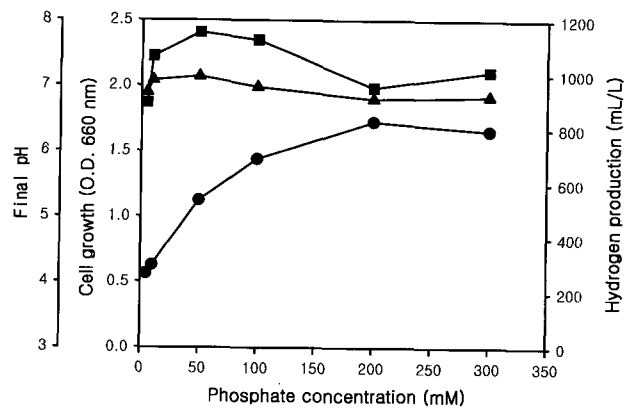


Figure 7. Effects of phosphate concentration on final pH, cell growth and hydrogen production with 2%(w/v) glucose at 35°C and initial pH 7.5. ● : pH, ▲ : cell growth, ■ : hydrogen production.

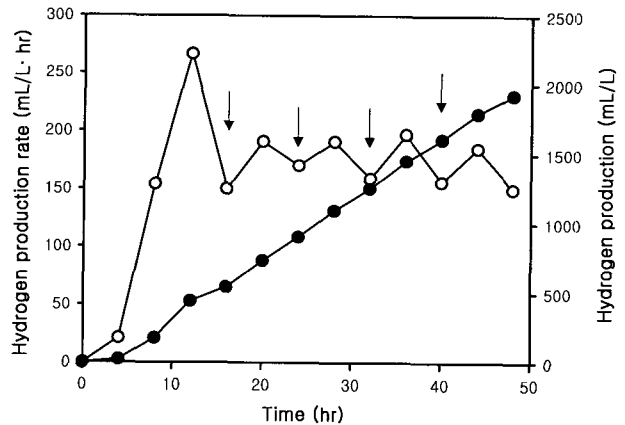


Figure 8. Hydrogen production in repeated-batch culture. Culture was incubated with 2%(w/v) glucose at 35°C and pH 7.5. ○ : hydrogen production rate, ● : hydrogen production, (↓) : 50% of fresh medium.

반회분식 배양에 의한 수소생산

배지 1 L가 든 2 L용량의 혐기적 반응기에 반회분식 배양 하면서 수소생성율이 감소할 때마다 배양액의 50%에 해당하는 양의 새로운 배지로 치환하였다. Fig. 8에서 보여주는 것과 같이 총 5번의 회분식 배양을 반복하였다. 첫 번째 회분

에서는 16시간 만에 약 540 mL/L의 수소가 생산되었고, 회분수가 증가함에 따라 총 수소생산량이 증가하여 최종 48시간에서 1920 mL/L의 수소를 얻을 수 있었다. 이와 같이 측정된 수소생산량의 증가는 세포의 증식을 감소시키는 유기산을 반복 회분식 배양 시에 계속적으로 반응기내에서 제거되므로 수소생산 능력이 향상된 것으로 사료된다(14).

Yeast extract의 영향

Yeast extract의 농도가 수소생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 0.1%(w/v)에서 2%(w/v)까지 yeast extract의 농도를 달리하여 수소생산을 조사하였다. 그 결과 Fig. 9에서와 같이 0.5%(w/v)까지는 수소생산이 증가했으나 그 이상의 농도에서는 효과가 없었다.

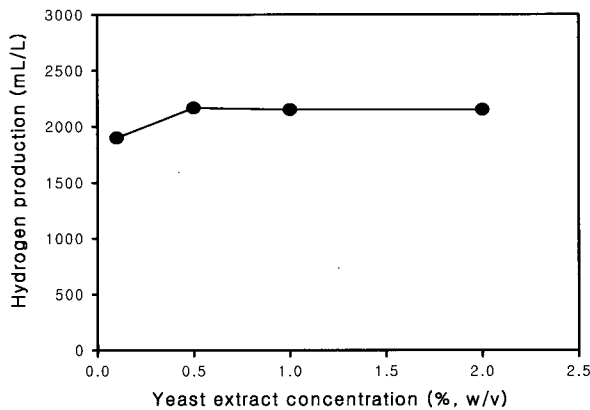


Figure 9. Effect of yeast extract concentration on hydrogen production in repeated-batch cultures.

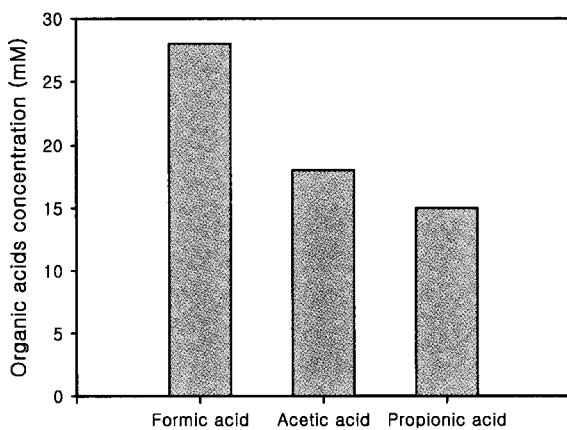


Figure 10. Production of organic acids from 2%(w/v) glucose under optimum condition in repeated-batch cultures.

유기산의 생성

Fig. 10는 수소생산에 따른 유기산의 생성을 살펴보았다. 이 균주는 탄소원으로 2%(w/v) glucose를 이용될 때의 유기

산은 대부분 formic acid와 acetic acid를 생성하였고 소량의 propionic acid가 생성되었다.

요 약

수소를 생산하기 위하여 자연계로부터 분리된 균주는 *Enterobacter cloacae*로 동정되었으며 이 균주를 YJ-1으로 명명하였다. 수소발생량을 기준하여 이 균주의 최적 성장조건을 살펴본 바, 회분식 배양에서 35°C, pH 7.5로 나타났다. 따라서 탄소원의 농도를 변화시킨 결과, 최대의 수소생산은 2% glucose, 4% sucrose, 5% fructose에서 각각 950 mL/L, 1000 mL/L, 948 mL/L을 얻어졌으며, 초기에 비해 2.5배 높은 생산량을 얻을 수 있었다. 유기산 측정에 따른 pH 저하를 막기 위해 완충제인 phosphate를 첨가한 결과, 50 mM에서 가장 높은 수소를 생산할 수 있었다. 반복회분식 배양으로 50%의 새로운 배지를 8 hr 간격으로 치환하여 48시간동안 수행한 결과 1920 mL/L의 수소를 생산할 수 있었다. Yeast extract는 균체성장에 중요한 성분으로서 0.5%에서 최대의 수소를 생산할 수 있었다. 발효 중 생성된 유기산은 대부분 formic acid, acetic acid이고 적은 양의 propionic acid가 생성되었다.

REFERENCES

1. D. pimental (1983), *Solar Energy* 30(1), 1.
2. Bollinger, R., Zurrer, and R. Bachofen (1915), Photoproduction of molecular hydrogen from wastewater of a sugar refinery by photosynthetic bacteria, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23, 147-151.
3. Sawada, H. and P. L. Rogers (1977), Photosynthetic bacteria in waste treatment: Pure culture studies. *J. Ferment. Technol.* 55, 297-310.
4. Vignais, P. M., A. Colbeau, J. C. Wilson, and Y. Jouanneau. (1985), Hydrogenase, nitrogenase and hydrogen metabolism in the photosynthetic bacteria, *In Advances in Microbial Physiology.* p. 155, Vol. 26, Academic Press.
5. Zajic, J. E., A. Margaritis, and J. D. Brosseau (1976), Microbial hydrogen production for replenishable resources, *Int. J. Hydrogen Energy.* 4, 385-402.
6. Klemme, J. H. (1996), Photosynthetic growth of new isolated non-sulfur purple bacteria at the expense of molecular hydrogen, *Arch. Microbiol.* 64, 29-34.
7. Heyndrickx, M., A. Vansteenbeek, and J. DeLeg (1986), Hydrogen gas in a minimal medium with *Clostridium butyricum*, *System. Appl. Microbiol.* 8, 239-244.
8. Kim, J. S., K. Ito, K. Izaki, and H. Takahashi (1987), Production of molecular hydrogen by a continuous culture under laboratory condition, *Agri. Biol. Chem.* 51(9), 2591-3593.
9. Benemann, J. R. and N. M. Weare (1974), Hydrogen evolution by nitrogen-fixing *Anabaena cylindrica* cultures, *Science* 184, 174-175.
10. Bae, M. (1995), Production of bio-hydrogen from waste materials. Research Report, Ministry of Trade, Industry, and Energy, 941C401-364FP1.
11. Tanisho, S. and Y. Ishiwata (1994), Continuous hydrogen production from molasses by the bacterium *Enterobacter aerogenes*, *Int. J. Hydrogen Energy* 19(10), 807-812.
12. Tanisho, S., Y. Suzuki, and N. Wakao (1987), Fermentative hydrogen evolution from various substrates by *Enterobacter aerogenes*, *Hakkokogaku* 67, 29-34.

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. Van Andel, J. G., G. R. Zouterg, 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.
15. Suzuki, S., I. Karube, T. Matsunaga, S. Kuriyama, N. Suzuki, N. Shirogami, and T. Takamura (1980). Biochemical energy conversion using immobilized whole cells of *Clostridium butyricum*. *Biochimie* **62**, 26-31.
16. Lieno, Y., T. Kawai, S. Sato, S. Otsuka, and M. Morimoto (1995). Biological production of hydrogen from cellulose by natural anaerobic microflora. *J. Ferm. Bioeng.* **79**(4), 395-397.
17. 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.
18. Jones, D. T. and D. R. Woods (1986). Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiol. Rev.* **50**, 484-524.
19. Yerushalmi, L. and B. Volesky (1987). Culture conditions for growth and solvent biosynthesis by a modified *Clostridium acetobutyricum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 513-520.