

## 새로운 수소 생산 균주인 *Enterobacter* sp. SNU-1453의 pH에 따른 Metabolic Flux 변화

신 종 환 · 윤 종 현 · 안 은 경 · <sup>1</sup>심 상 준 · <sup>2</sup>김 미 선 · † 박 태 현  
서울대학교 화학생물공학부, <sup>1</sup>성균관대학교 화학공학과, <sup>2</sup>한국에너지기술연구원 바이오매스연구센터  
(접수 : 2005. 11. 12., 게재승인 : 2005. 11. 30.)

### pH-dependent Metabolic Flux Shift in Novel Hydrogen-Producing Bacterium *Enterobacter* sp. SNU-1453

Jong-Hwan Shin, Jong Hyun Yoon, Eun Kyoung Ahn, Sang Jun Sim<sup>1</sup>, Mi-Sun Kim<sup>2</sup>, and Tai Hyun Park†  
School of Chemical and Biological Engineering, Seoul National University, Seoul 151-019, Korea  
<sup>1</sup>Department of Chemical Engineering, Sungkyunkwan University, Suwon 440-330, Korea  
<sup>2</sup>Korea Institute of Energy Research, Daejeon, Korea.  
(Received : 2005. 11. 12., Accepted : 2005. 11. 30.)

For the biological production of hydrogen, a new fermentative hydrogen-producing bacterium, *Enterobacter* sp. SNU-1453, was isolated from a domestic landfill. During the culture of this bacterium, pH significantly decreased with the accumulation of various organic acids, and consequently this inhibited the production of hydrogen. It was found that the metabolic flux in this bacterium depended on the pH and affected the hydrogen production. A butanediol pathway was dominant during the fermentation when pH was not controlled. By controlling the pH at 7 this pathway can be shifted to a mixed acid pathway, which is favorable to the production of hydrogen.

**Key Words** : *Enterobacter* sp. SNU-1453, pH, metabolic flux shift

#### 서 론

미래의 청정 재생 에너지로서 주목받고 있는 수소에너지는 단위 질량당 에너지 함유량이 매우 높고 연소부산물로서 물만을 발생시킴으로써 어떤 다른 에너지원보다 환경친화적인 에너지원이라고 할 수 있다. 또한, 수소에너지는 연료전지의 발전에 힘입어 실용화에 한걸음 더 다가와 있으며 현재 시제품이 제작되고 있는 실정이다. 현재 수소는 주로 화석연료에 의해 생산되고 있으나 궁극적으로는 환경 친화적인 수소 생산 방법으로 대체되어야 할 것이다.

생물학적인 수소 생산 방법은 크게 빛을 이용하지 않는 혐기성 미생물에 의한 혐기 발효, 빛을 이용하는 광합성 미생물에 의한 수소생산으로 나눌 수 있다(1). 이들 방법 중 혐기 발효에 의한 수소 생산방법은 높은 수소 생산량을 나타내며 waste stream을 사용할 수 있다는 장점을 가지고 있기 때문에

가장 단시일 내에 상용화될 수 있을 것으로 기대되어지고 있다. 이러한 혐기발효에 사용되는 미생물은 절대혐기성 미생물과 통성 혐기성 미생물로 나뉘어 지는데, 통성 혐기성 미생물은 산소에 대한 민감도가 낮고 배양공정이 단순하고 scale-up이 쉽다는 장점을 가지고 있다.

통성 혐기성 수소생산 미생물 중 *Enterobacter* sp.들을 이용한 연구가 가장 활발히 진행되고 있다. 다양한 *Enterobacter* 종 (species)을 이용하여 수소생산을 위한 최적화 연구가 수행 중이다. *Enterobacter*가 속하는 Enteric bacteria는 일반적으로 두 가지 fermentation pathway를 따른다(Fig. 1). 하나는 mixed acid fermentation pathway로서, 이때의 products는 주로 lactic acid, acetic acid, formic acid, succinic acid 등의 유기산과 ethanol, H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> 등이 생산된다. 이 pathway에서는 일반적으로 알코올보다 유기산의 비율이 더 높으며 (acid : alcohol = 4 : 1) 발생하는 기체의 경우 CO<sub>2</sub> : H<sub>2</sub> = 1 : 1의 비율을 나타낸다. 이에 반해 butanediol fermentation pathway는 유기산의 양은 급격히 줄고 ethanol과 butanediol 등의 알코올의 양이 늘어나서 acid : alcohol = 1 : 6의 비율을 나타내며 발생하는 기체의 경우 CO<sub>2</sub> : H<sub>2</sub> = 5 : 1의 비율을 나타낸다. 이러한 metabolic pathway는 배양 조건에 따라 shift되기 때문에 수소생산량을 높이기

† Corresponding Author : School of Chemical and Biological Engineering, Seoul National University, Seoul 151-019, Korea  
Tel : +82-2-880-8020, Fax : +82-2-875-9348  
E-mail : thpark@plaza.snu.ac.kr

위해 수소생산에 유리한 방향으로 metabolic flux를 조절 할 필요가 있다. 본 연구에서는 새로운 종의 통성 혐기성 미생물인 *Enterobacter* sp. SNU-1453을 쓰레기 매립지 토양에서 분리 하였으며, 수소생산에 영향을 미치는 metabolic flux에 pH가 어떤 영향을 미치는가를 관찰하였다.

**재료 및 방법**

**SNU-1453 균주의 분리**

가정 쓰레기 매립지로부터 soil samples을 수집하여 LB 배지에서 수 시간 동안 배양하였다. 이렇게 배양된 배양액 0.5 ml을 다시 50 mM L-HPA (L-Homophenylalanine), 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(2). 이렇게 얻어진 순수한 미생물을 25% glycerol이 포함된 배지에서 -70°C에 보관하였다.

**SNU-1453 균주의 생화학적 특성 분석**

Strain SNU-1453의 생화학적 특징을 알아보기 위하여 장내세균과 gram negative 간균의 동정에 사용되는 API20E kit (BioMerieux, St. Louis, Missouri, USA)을 사용하였다. 이 키트를 이용한 생화학적 분석은 saline 용액에 strain SNU-1453을 현탁한 후, 건조된 기질이 들어있는 kit의 cupules에 접종하여 배양 후 발색시약을 첨가하여 기질의 대

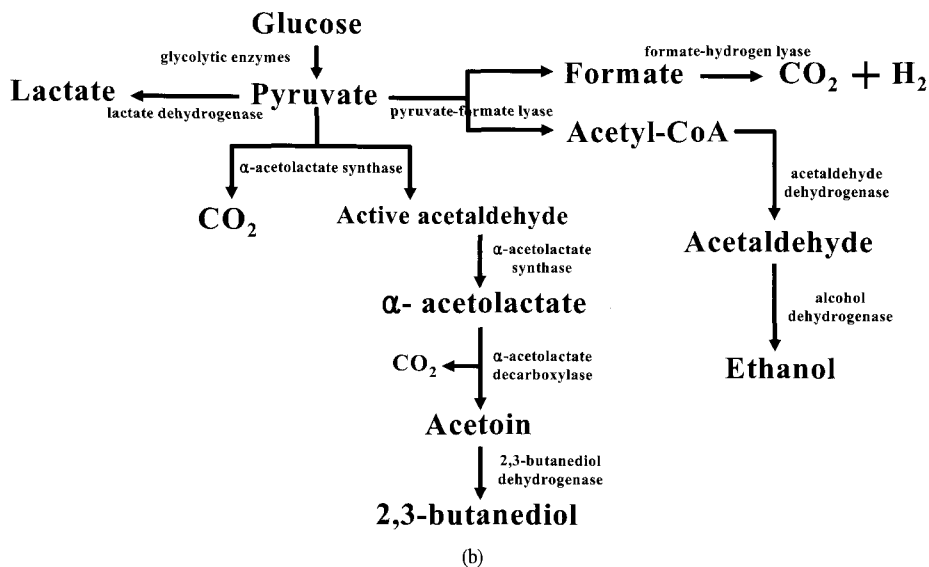
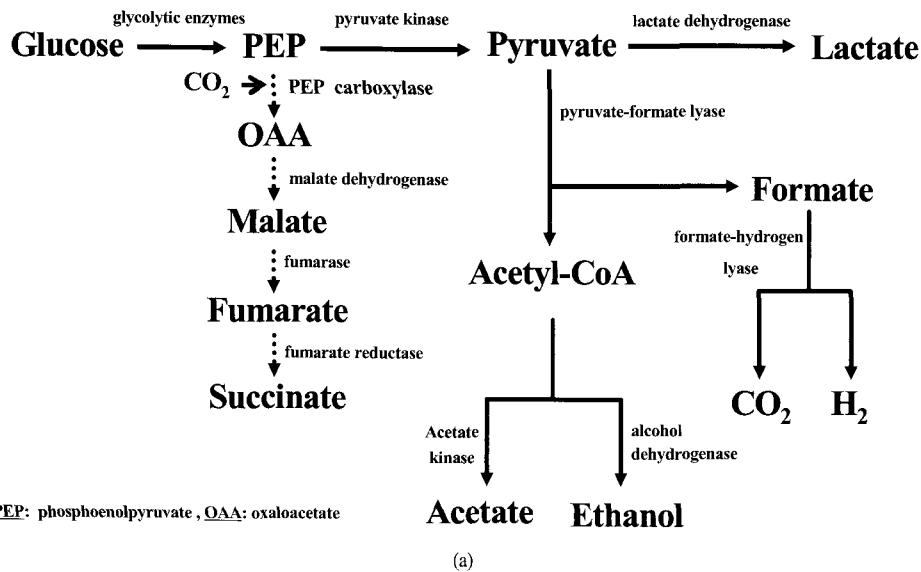


Figure 1. Two fermentation pathways of Enteric bacteria ((a) mixed acid fermentation, (b) butanediol fermentation).

사유무를 색의 변화로 판정하는 방법이다. 이 결과는 미생물 동정을 위해 기존의 데이터베이스와 비교하였다.

### SNU-1453 균주의 동정

균주의 동정을 위해 16S rDNA를 PCR로 증폭한 후 클로닝하였다. 클로닝된 16S rDNA는 DNA sequencer로 전체 염기서열을 결정하였으며 이 결과를 이차구조를 참고하여 Ribosomal Database Project (RDP)와 염기서열을 비교 배열한 후 다른 표준균주와 유사도를 조사하였다(3-8).

### 균주 배양 및 분석 조건

균주는 빛의 공급 없이 발효조 (1 L)에서 37°C, 220 rpm의 혐기적 조건에서 배양되었다. 발효기 내의 혐기적 조건은 20분 동안의 질소가스 purging을 통해 조성하였다. Seed culture는 배지가 들어있는 120 mL serum bottle에 약 10분간의 N<sub>2</sub> 기체를 흘려주어 혐기적 조건을 만들어 준 후 butyl rubber septum (12 mm-thick)과 aluminum cap으로 봉하여 혐기적 조건을 유지하였다. 이렇게 처리한 배지에 cell을 주입한 후 동일한 방법으로 혐기적 조건을 만들어 준 후 12시간에서 15시간 동안 37°C에서 220 rpm으로 배양하였다. 위와 같은 방법으로 혐기적 조건에서 seed culture한 미생물을 발효조로 옮긴 후 본 배양을 시작하였다. 실험에 사용된 배지는 10 g/L glucose, 20 g/L peptone, 3 g/L yeast extract, 0.5 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 및 2 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>으로 구성된 PYG 배지를 사용하였다. 발효기 내의 pH는 2 N HCl과 2 N NaOH를 사용하여 제어하였다.

미생물 농도는 UV-visible spectrophotometer (Genesys 5, Spectronic Instruments, USA)를 사용하여 680 nm 파장에서 측정된 후 이를 건조중량 (dry cell weight)과의 상관관계로부터 환산하여 측정하였다. Glucose 농도는 효소적 방법 (Glucose HK assay kit, Sigma Chemical Co., Louis, USA)을 이용하여 분석하였다. 또한, 수소기체의 분석은 carbon molecular sieves column (Carboxen-1000 column, Supelco Inc., USA)과 TCD detector가 장착된 가스 크로마토그래피 (HP 5890 Series II, Hewlett-Packard, USA)를 이용하여 분석하였다. GC 분석조건은 오븐 온도 30°C, 인젝터 온도 120°C, 디텍터 온도 120°C로 유지하였으며, 캐리어 가스는 Ar 가스를 57-58 ml/min의 유속으로 흘려주었고, 가스 샘플은 gas-tight microsyringe로 0.1 mL을 뽑아서 주입하였다. 미생물 배양액 중의 대사산물 분석은 Aminex HPX-87H packed column (300 x 7.8 mm; Bio-Rad, USA)이 장착된 HPLC (HP1100, Agilent Technologies, USA)를 통해 분석하였다. 분석조건은 0.01 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>을 이동상으로 하여 0.6 ml/min의 유속으로 흘려주었으며 컬럼은 40°C로 유지하여 refractive index detector (RID)로 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 분리균주의 동정결과

높은 수소 생산능력을 가진 SNU-1453 균주를 가정쓰레기 매립지 토양으로부터 분리하였다. 이 균주의 동정을 위해 생

화학적 테스트 및 16S rDNA 전체 염기서열을 이용한 방법이 사용되었다. API 20E kit를 통해 수행된 생화학적 테스트 실험결과, 여러 가지 기질에 대한 대사반응이 나타났으며 그 결과는 Table 1과 같다. 이 결과는 *Enterobacter cloacae*와 90.9%의 유사도를 나타냄을 알 수 있었다. 좀 더 정확한 동정을 위하여 16S rDNA full sequencing을 통해 약 1400개의 염기가 결정되었으며 이를 바탕으로 유사도를 측정 한 결과 *E. asburiae* JCM 6051T (99.56%), *Pantoea agglomerans* JCM 1236T (99.42%), *E. cancerogenus* LMG 2693T (99.27%)와 99% 이상의 유사도를 나타내었으며 2차 구조를 참고하여 만든 phylogenetic tree를 통한 계통수 분석에서도 같은 결과를 나타내었다(data not shown). 이러한 결과는 같은 종 (species)으로 판별하는 기준인 95% 이상의 유사도를 보이는 종 (species)이 여러 종 (species)이므로 본 균주가 속하는 종은 판별할 수 없었으나, 동정 기준에 의거해 *Enterobacter*에 속하는 균주이므로 *Enterobacter* sp. SNU-1453으로 명명하였다.

**Table 1.** Biochemical test of *Enterobacter* sp. SNU-1453 for identification

Biochemical Test <sup>a</sup>	Reaction of <i>Enterobacter</i> sp. SNU-1453 <sup>b</sup>
ONPG	+
ADH	+
LDC	-
ODC	+
CIT	+
H <sub>2</sub> S	-
URE	-
TDA	-
IND	-
VP	+
GEL	-
GLU	+
MAN	+
INO	+
SOR	+
RHA	-
SAC	+
MEL	+
AMY	+
ARA	+
OX	-

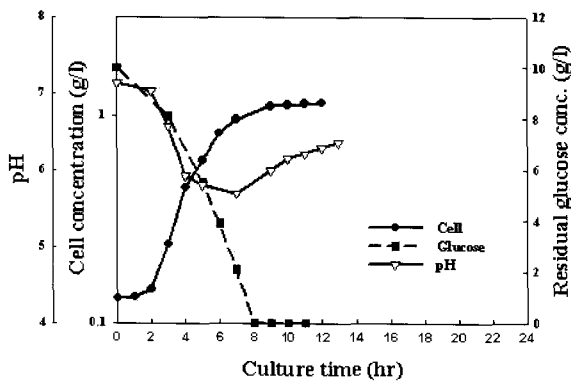
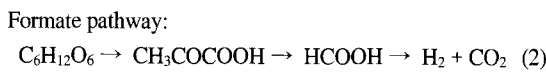
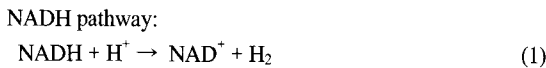
<sup>a</sup>ONPG: ortho-nitro-phenyl-β-D-galactopyranoside, ADH: arginine, LDC: lysine, ODC: ornithine, CIT: citrate de sodium, H<sub>2</sub>S: thiosulfate de sodium, URE: uree, TDA: tryptophane, IND: tryptophane, VP: pyruvate de sodium, GEL: gelatine de Kohn, GLU: glucose, MAN: mannitol, INO: inositol, SOR: sorbitol, RHA: rhamnose, SAC: saccharose, MEL: melibiose, AMY: amygdaline, ARA: arabinose, OX: on filter paper

<sup>b</sup>Positive reaction: +, negative reaction: -

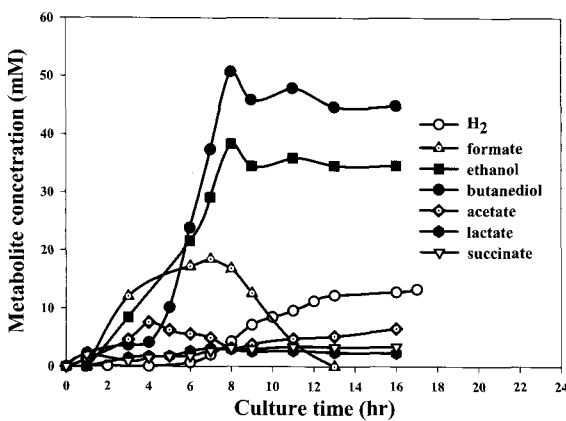
### 배양시간에 따른 분리균주의 배양거동 (without pH control)

*Enterobacter*와 같은 fermentative bacteria는 발효과정 중 여러 가지의 유기산을 생성하기 때문에 배양액의 pH가 급격하게 떨어진다(9-11). 따라서 pH 제어를 하지 않았을 경우, SNU-1453 균주가 어떤 배양 거동을 나타내는지 관찰 하였다. 또한 pH를 제어하지 않을 경우, 어떤 fermentation pathway를 따르는지 관찰하였다. Fig. 2는 혐기배양을 함에

따라 미생물 농도, glucose 농도, pH, metabolite의 변화를 나타내는 그래프이다. 배양이 진행됨에 따라 pH는 급격히 떨어지다가 7시간 후에는 오히려 pH가 증가하는 것을 볼 수 있었다(Fig. 2(a)). 이러한 pH의 변화는 배양 초반 유기산의 생산으로 배지의 pH가 급격히 떨어지며 pH가 상승하는 시점인 7시간 이후에는 formate 농도의 감소가 일어나 pH가 상승하는 것으로 설명할 수 있다. 따라서 SNU-1453 균주의 배지 내 pH는 formate의 농도에 매우 민감한 것을 알 수 있다. Fermentative bacteria는 아래와 같이 NADH pathway와 formate pathway의 두 가지 수소 생산 pathway에 의해 수소를 생산한다고 알려져 있다(1, 12).



(a)



(b)

Figure 2. Fermentation profiles of *Enterobacter* sp. SNU-1453 without pH control ((a) profiles of cell growth, glucose consumption, and pH, (b) profiles of soluble metabolites).

따라서 formate 감소는 위의 formate pathway에 의해 분해되어 H<sub>2</sub>와 CO<sub>2</sub>가 생성되는데 사용되었을 것으로 이해된다. 이는 formate의 감소 시점에 pH는 상승하고 수소생산은 급

격히 늘어나는 것으로도 확인할 수 있다(Fig. 2(a), (b)). 또한 Fig. 2(b)에서 볼 수 있는 것처럼 유기산보다는 알코올의 생산량이 많은 butanediol fermentation pathway로의 metabolic flux가 진행되는 것을 알 수 있다. 이처럼 pH가 제어되지 않았을 경우에는 수소생산으로의 metabolic pathway보다는 알코올 생산으로의 metabolic flux가 진행되기 때문에 더 높은 수소 생산을 얻기 위해 pH 제어가 필요할 것으로 생각된다. 이때의 미생물 농도는 1.151 g/l이며 수소생산은 325 ml/l를 나타냈다.

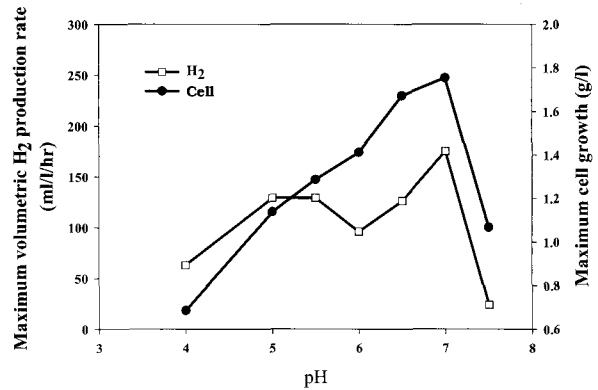


Figure 3. Effect of pH on hydrogen production.

### 수소생산에 대한 pH의 영향

보다 많은 양의 수소를 생산하기 위해서는 고농도의 미생물 농도를 유지하는 것이 필요하며, 또한 배양이 진행됨에 따라 pH가 급격히 감소하기 때문에 pH 제어가 필수적이다. 따라서 각각의 pH에서 어떤 수소생산량 및 미생물 성장을 나타내는지를 조사하였다. Fig. 3은 분리균주의 pH에 따른 수소생산속도와 미생물농도를 나타내는 그래프이다. 이 균주의 경우 넓은 영역의 pH (4-7.5)에서 수소생산을 나타냈으며 pH 7에서 가장 높은 175 ml/hr의 수소생산속도(maximum volumetric H<sub>2</sub> production rate)와 1.754 g cell/l의 maximum growth를 나타냈다. 따라서 SNU-1453 균주의 최적 pH는 7.0이라는 것을 알 수 있었다(Fig. 3).

### pH 7.0에서의 배양거동

앞서 정해진 최적 pH (7.0)에서 수소생산 및 metabolite 생산 거동을 조사하였다. Fig. 4에서 볼 수 있는 바와 같이 미생물이 자라는 exponential phase에서는 여러 가지 metabolite들이 급격히 증가하는 것을 볼 수 있다. 그러나 미생물이 더 이상 자라지 않는 stationary phase에서는 formate의 분해가 일어나며 수소생산량이 급격히 증가하는 것을 볼 수 있다. 이는 exponential phase에서 pH control을 하지 않았을 경우에 비해 metabolic flux가 butanediol의 생산에서 formate쪽으로 shift되어 formate 농도가 급격히 증가한 후 stationary phase에서 formate가 분해되는 formate pathway가 작동하여 더 많은 수소가 생성되었다는 것을 알 수 있다.

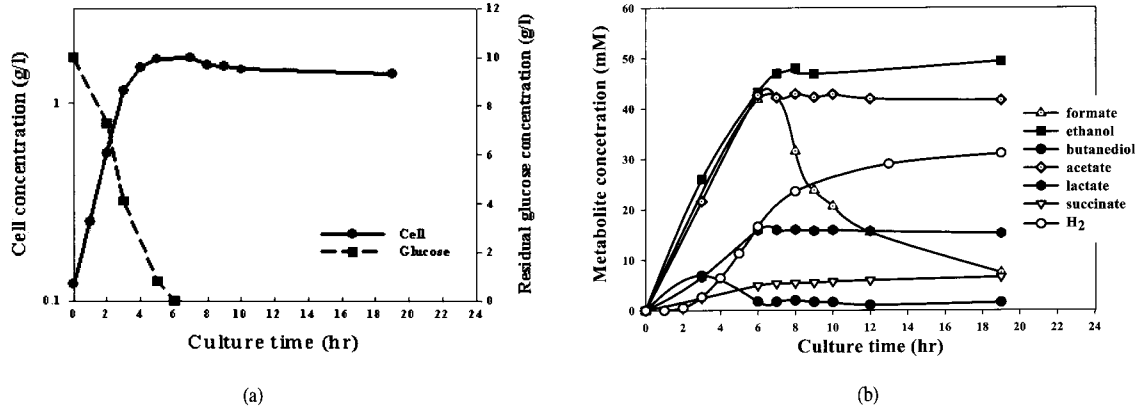
### pH control에 따른 metabolic flux shift

Table 2는 *Enterobacter* sp. SNU-1453에 의한 pH 제어에 따른 대사물질들을 나타낸 표이다. 이 균주의 대사물질로서는

**Table 2.** Metabolites produced by *Enterobacter* sp. SNU-1453 under uncontrolled and controlled pH condition

pH	TVFA (mM)	SMP (mM)	H <sub>Ac</sub> /SMP (%)	H <sub>Lac</sub> /SMP (%)	H <sub>For</sub> /SMP (%)	H <sub>Suc</sub> /SMP (%)	H <sub>EiOH</sub> /SMP (%)	H <sub>ButOH</sub> /SMP (%)	Alcohol /SMP (%)	TVFA /SMP
Not controlled	13.8	93.3	7	2	2	4	37	48	85	0.15
controlled (7.0)	71.1	122.2	34	13	6	5	41	1	42	0.58

H<sub>Ac</sub>: acetic acid; H<sub>Lac</sub>: lactic acid; H<sub>For</sub>: formic acid; H<sub>Suc</sub>: succinic acid; H<sub>EiOH</sub>: ethanol; H<sub>ButOH</sub>: butanediol; Alcohol: ethanol + butanediol; TVFA = H<sub>Ac</sub> + H<sub>Lac</sub> + H<sub>For</sub> + H<sub>Suc</sub>; SMP = TVFA + Alcohol.



**Figure 4.** Fermentation profiles of *Enterobacter* sp. SNU-1453 at pH 7.0 controlled. (a) profiles of cell growth and glucose consumption, (b) profiles of soluble metabolites.

acetic acid, lactic acid, formic acid, succinic acid, ethanol, butanediol, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> 등이 측정되었다. pH 제어를 하지 않은 경우의 주된 대사물은 알코올로써 전체의 85%를 차지하였다. 이에 반해 전체 유기산 (TVFA, total volatile fatty acid)은 15%로써 매우 적은 양을 차지하였다. 이 경우 acid : alcohol = 1 : 5.7로서 butanediol pathway의 일반적인 비율 (acid : alcohol = 1 : 6)과 매우 유사한 경향을 나타내는 것으로 보아 pH 제어를 하지 않을 경우에는 butanediol fermentation pathway를 따른다는 것을 알 수 있다.

반면에 pH가 제어된 경우에는 알코올의 비율이 42%로 줄어들고 전체 유기산 (TVFA, total volatile fatty acid)의 농도가 늘어났다. 즉, pH가 제어되지 않았을 경우에 비하여 유기산의 농도가 5배 정도 늘어났으며, 이는 butanediol의 농도가 48%에서 1%로 줄어들고 acetate의 농도가 7%에서 34%로 증가한 것에 주로 기인한다. 이 밖에 다른 유기산 및 ethanol도 소량 증가하였다. 이와 같이 pH가 제어된 경우에는 알코올 보다 유기산의 생산비율이 증가하여 acid : alcohol = 1.4 : 1의 값을 나타냈다. 따라서 이는 pH 제어에 의해 metabolic flux가 butanediol pathway에서 mixed acid pathway로 변화되었음을 보여준다. 수소 생산에 유리한 metabolic flux를 유도하기 위한 pH 최적화와 더불어, 더 높은 수소생산을 위해서는 배지 성분, 온도 등의 최적화가 수행되어야 한다. 또한 mutation을 이용한 metabolic pathway 및 공정 개발을 통해 보다 높은 수소생산량 향상을 기대할 수 있다.

**요 약**

가정쓰레기 매립지 토양에서 분리된 *Enterobacter* sp.

SNU-1453은 Enteric bacteria에 속하는 종 (species)으로서 혐기 발효 시 효과적으로 수소를 생산하였다. 이러한 fermentative bacteria는 여러 가지 외부 요인에 의해 다른 metabolism을 나타내어 수소생산량에 영향을 준다. 혐기 발효가 진행됨에 따라 배지의 pH가 급격히 감소하여 미생물 성장과 수소생산에 영향을 미치므로, pH에 따른 metabolism 변화를 관찰함으로써 수소생산을 극대화하기 위한 최적 pH 조건을 선정하여 제어할 필요가 있다. 본 연구에서는 수소생산에 대한 pH의 효과 및 pH 제어에 따른 metabolic flux를 분석하였다. 실험결과 이 분리균주는 매우 넓은 영역의 pH (4-7.5)에서도 수소를 생산하였으며, pH 7에서 가장 높은 수소생산량을 나타내었다. pH 7로의 제어는 butanediol pathway로부터 수소 생산에 더 유리한 mixed acid fermentation pathway로 metabolic flux를 변화시킴을 알 수 있었다.

**감 사**

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

**REFERENCES**

1. Das, D. and T.N. Veziroglu (2001), Hydrogen production by biological processes: a survey of literature, *Int. J. Hydrogen Energy* 26, 13-28.
2. Cho, B.-K., J.-H. Seo, T.-W. Kang, and B.-G. Kim (2003), Asymmetric synthesis of L-homophenylalanine by equilibrium-shift using recombinant aromatic L-amino acid transaminase, *Biotechnol. Bioeng.* 83, 226-34.

3. Saitou, N. and M. Nei (1987), The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees, *Mol. Bio. Evo.* **4**, 406-25.
4. Elbeltagy, A., K. Nishioka, T. Sato, H. Suzuki, B. Ye, T. Hamada, T. Isawa, H. Mitsui, and K. Minamisawa (2001), Endophytic colonization and in planta Nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species, *Appl. Envir. Microbiol.* **67**, 5285-93.
5. Asis, C.A. and K. Adachi (2004), Isolation of endophytic diazotroph *Pantoea agglomerans* and nondiazotroph *Enterobacter asburiae* from sweetpotato stem in Japan, *Lett. Appl. Microbiol.* **38**, 19-23.
6. Brenner, D. J., A. C. McWhorter, A. Kai, A. G. Steigerwalt, and J. J. 3rd Farmer (1986), *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.* **23**, 1114-20.
7. Dauga, C. (2002), Evolution of the *gyrB* gene and the molecular phylogeny of *Enterobacteriaceae*: a model molecule for molecular systematic studies, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**, 531-47.
8. Gavini, F., J. Mergaert, A. Beji, C. Mielcarek, D. Izard, K. Kersters, and J. De Ley (1989), 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.* **39**, 337-45.
9. Oh, Y.-K., E.-H. Seol, E. Y. Lee, and S. H. Park (2002), Fermentative hydrogen production by a new chemoheterotrophic bacterium *Rhodopseudomonas palustris* P4, *Int. J. Hydrogen Energy.* **27**, 1373-9.
10. Kumar, N. and D. Das (2000), Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08, *Process Biochem.* **35**, 589-93.
11. Oh, Y.-K., E.-H. Seol, J.R. Kim, and S.H. Park (2003), Fermentative biohydrogen production by a new chemoheterotrophic bacterium *Citrobacter* sp. Y19, *Int. J. Hydrogen Energy.* **28**, 1353-9.
12. Tanisho, N., M. Kuromoto, and N. Kadokura (1998), Effect of CO<sub>2</sub> removal on hydrogen production by fermentation, *Int. J. Hydrogen Energy.* **23**, 559-63.