한국신·재생에너지학회 2006년도 춘계학술대회논문집 pp.470~473

# 연료전지로의 직접 공급을 위한 생물학적 수소생산

신종환[2], 윤종현[3], 박태현[1]

# In situ production of biohydrogen for fuel cell

Jong-Hwan Shin, Jong Hyun Yoon, Tai Hyun Park

**Key words** : *Enterobacter asburiae* SNU-1, foramte, formate hydrogen lyase (FHL)

**Abstract** : 생물학적 수소생산을 위해 토양으로부터 새로운 균주인 *Enterobacter asburiae* SNU-1이 분리되었다. 이 균주의 경우 다른 균주와는 달리 미생물 생장과 수소생산 phase가 분리되는 특징을 가지고 있다. 이러한 정지기에서의 수소생산은 미생물 내에 존재하는 formate hydrogen lyase를 사용하여 formate 분해에 의해 일어난다. 따라서 본 연구에서는 미생물 생장 phase에서 formate hydrogen lyase가 발현된 미생물을 얻고 이를 formate만 있는 배지에서 수소생산 가능성에 대한 연구를 수행하였다. 앞으로 formate 분해를 위한 조건을 최적화한다면 높은 수소생산성을 나타낼 것이라 기대된다. 또한, 이는 formate로부터 미생물촉매를 이용하여 수소를 생산하고 이를 연료전지로 공급하는 생물학적 reformer로써의 이용 가능성을 보여준다.

## 1. 서 론

미생물에 의한 수소생산은 지구상에 풍부한 물이나 biomass로부터 얻을 수 있으며, 상온 상압에서 공정을 수행 할 수 있고, 화학반응에 의한 수소생산과 달리 반응과정에서 CO가 생성되지 않는다. 이러한 특성은 연료전지로의 적용 시 CO로 인한 전극의 성능저하를 막을 수 있다는 큰 장점을 갖는다.

생물학적 수소생산 방법은 크게 광합성에 의한 수소생산과 유기탄소원의 혐기발효에 의한 수소생산 방법으로 나눌 수 있다[1-3]. 이들 방법 중 수소생산 속도가 높은 fermentative bacteria에 의한 수소생산 방법이 실용화에 가깝다[4-12]. 이러한 혐기박테리아에 의한 수소생산을 상업화하기 위해 *Clostridium, Enterobacter* 등을 이용하여 공정개발, 대사공학, 유전자조작 등의 방법을 이용하여 수소생산 향상에 관한 연구가 진행되고 있다. 그러나 상용화의 가장 큰 걸림돌은 낮은 yield와 낮은 수소 생산성이다. 이 문제를 해결하기 위해 최근에는 유전자 조작에 의해 수소생산 능력이 향상된 균주가 개발되고 있다.

혐기박테리아에 의한 수소생산 방법은 다음과 같다. 하나는 *Clostridium*과 같은 절대 혐기성 균주에서 주로 나타나는 hydrogenase에 의한 NADH reoxidation이고 다른 하나는 *Enterobacter*와 같은 통성 혐기성 균주에서 주로 나타나는 것으로 formate hydrogen lyase(FHL)에 의한 formate 분해를 통한 수소와 이산화탄소의 생산이다. Formate는 biomass와 같은 비교적 값싼 재료로부터 얻을 수 있으며 생물학적 분해 시 양론적으로 1 mol의 formate로부터 1 mol의 수소를 얻을 수 있다. 또한, formate는 메탄올이나 에탄올에 비해 독성을 띠지 않는 안전한 물질이어서 연료전지에 사용되는 저장연료로 많이 쓰이는 물질이다. 따라서 이와 같은 장점을 연료전지(PEMFC)에 결합시킨다면 현재 문제가 되는 수소의 저장문제와 반응시 CO의 발생 문제를 해결 할 수 있을 것이다.

본 연구에서는 새로운 *Enterobacter* 종인 *Enterobacter asburiae*를 토양으로부터 분리하였으며 본 균주의 정지기에서 수소를 생산하는 특성을 이용하여 formate로부터 수소를 생산하여 연료전지에 공급하기 위한 연구를 수행하였다.

1) 서울대학교 화학생물공학부
E-mail: thpark@plaza.snu.ac.kr
Tel : (02)880-8020 Fax : (02)875-9348
2) 서울대학교 화학생물공학부
E-mail: merdian78@hanmail.net
Tel : (02)880-1874 Fax : (02)883-1874
3) 서울대학교 화학생물공학부
E-mail:
Tel : (02)880-1874 Fax : (02)883-1874

## 2. 실험 및 방법

## 2. 미생물 배양 및 분석방법

### 2.1 미생물 배양 및 수소생산 조건

빛의 공급 없이 발효기(Fermentor) 내에서 질소 purging을 통해 혐기적 조건을 만들어 glucose 또는 formate 발효를 통해 수소를 생산하였다. 배지는 실험목적에 따라 glucose가 포함된 PYG 배지 또는 formate가 포함된 foramte 배지를 사용하였다. Seed culture와 cell harvest 과정에서 혐기적 조건을 만들어 주기 위해 anaerbobic chamber를 사용하였다. cell harvest를 위하여 GYP 배지가 들어있는 vial에서 6시간 동안 37℃에서 220 rpm으로 배양한 후 8000 rpm으로 원심분리하여 cell을 harvest하였다. 이렇게 harvest 된 미생물을 formate 배지가 들어있는 fermentor로 옮긴 후 수소생산을 위해 배양하였다.

### 2.2 분석조건

미생물 농도 분석을 위해 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℃, injector 온도 120℃, detector 온도 120℃로 유지하였으며, carrier gas는 Ar gas를 57~58 ml/min의 유속으로 흘려주었고, gas sample은 gas-tight microsyringe로 0.1 ml을 뽑아서 주입하였다. Glucose 및 formate의 분석을 위해 Aminex HPX-87H packed 컬럼이 장착된 HPLC를 사용하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1 *Enterobacter asburiae* SNU-1의 분리 및 동정

높은 수소 생산능력을 가진 *strain* SNU-1을 가정쓰레기 매립지 토양으로부터 분리하였다. 이 균주의 동정을 위해 16S rDNA full sequencing 그리고 DNA-DNA hybridization 실험을 수행하였다. 16S rDNA full sequencing을 통해 약 1400개의 염기가 결정되었으며 이를 바탕으로 유사도를 측정한 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 균주이며 기존의 다른 균주와 다른 특성을 나타내기 때문에 본 연구에 사용하였다.

### 3.2 Stationary phase에서의 수소생산

주로 혐기 발효를 통한 수소생산은 미생물 생장과 함께 일어난다. 하지만 본 균주의 경우 미생물 성장 시기와 수소생산 시기가 확연히 구분되는 독특한 특징을 갖는다(Fig.1). Fig.1은 미생물 정지기에서 수소생산 양상을 나타낸다. exponential phase인 배양 시작 후 6시간 까지는 미생물이 성장하면서 glucose를 거의 소비한다. 이와 함께 glucose가 분해되어 대사과정을 거쳐 formate가 급격히 증가하는 것을 볼 수 있다. 하지만 이때 수소생산은 극히 미미한 것을 알 수 있다. 그러나 미생물이 더 이상 자라지 않는 stationary phase인 배양시작 6시간 이후에는 glucose가 더 이상 없음에도 불구하고 수소생산이 급격히 늘어나는 것을 볼 수 있다. 여기서 주목할 점은 수소 생산과 함께 formate가 급격히 줄어든다는 것이다. 이는 본 균주의 경우 혐기발효 미생물의 대표적인 수소생산 방법인 NADH reoxidation에 의한 수소생산과 formate 분해에 의한 수소생산 방법 중 후자에 의한 수소생산 방법이 주로 사용된다는 것을 의미한다. 즉, 이때 미생물은 formate를 분해하는 생촉매 역할을 한다고 할 수 있다. 따라서, 이와 같은 특징을 이용하여 미생물 성장과정과 수소생산과정을 분리하기 위한 실험을 진행하였다.

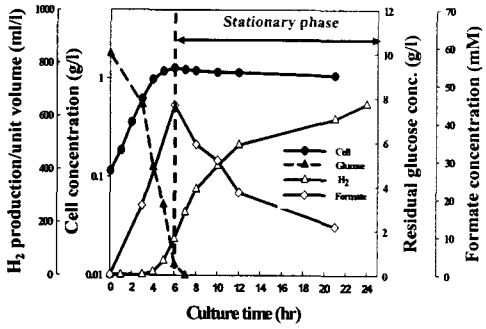


Fig. 1 Batch fermentation profiles of the isolated strain on PYG medium

## 3.3 formate 첨가의 효과

앞서 연구된 수소생산 거동을 바탕으로 정지기에 formate만 넣어주면 수소생산이 가능한지의 여부를 알아보기 위해 formate 첨가 후 수소생산 거동을 살펴보았다. Fig. 2는 기존 PYG 배지에서 수소생산 후 수소생산이 더 이상 일어나지 않는 시점(21 시간)에 formate 첨가 시 수소생산이 지속되는지를 보여주는 그림이다. 그 결과 Formate 첨가와 함께 바로 수소생산이 일어나는 것을 볼 수 있었다. 이는 미생물과 formate만 있다면 수소생산이 일어 날 수 있다는 것을 좀 더 확실히 보여주는 것이다. 하지만 이러한 수소생산이 배양액 중의 다른 성분에 의한 영향일 가능성이 있으므로 다음 절에서는 formate만 있는 배지에서의 수소생산 거동을 살펴보았다.

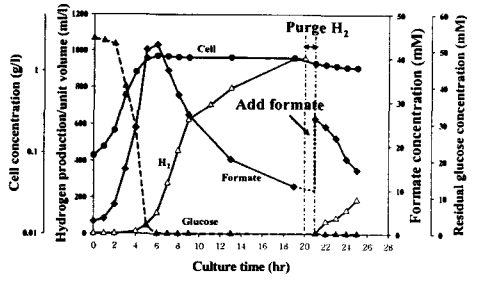


Fig. 2 Effect of formate addition after glucose fermentation

## 3.4 formate 배지에서의 수소생산

앞선 결과를 통하여 미생물 성장과 수소생산 과정을 분리 할 수 있다는 것을 알았다. 또한, 미생물과 formate만 있으면 foramte 분해에 의해 수소생산이 가능한 것을 알 수 있었다. Fig. 3은 미생물을 harvest 후 formate가 들어있는 배지에 접종하였을 경우 수소생산을 할 수 있는지를 보여주는 그림이다. 그 결과 접종을 하자마자 수소생산이 시작되며 그와 반비례하여 formate가 분해되는 것을 볼 수 있다. 이는 formate가 미생물에 의해 분해되어 수소를 생산하는 것을 명확히 보여주는 것이다.

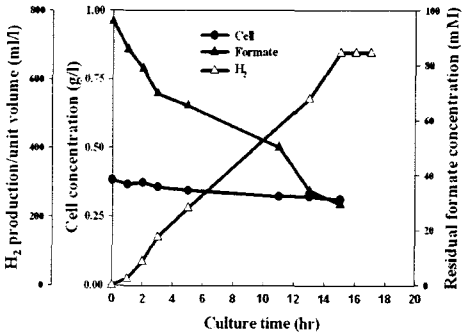


Fig. 3 Hydrogen production and formate consumption profiles in formate medium

그러나 배양이 진행 될수록 formate 분해로 인해 배지 배양액의 pH가 7.7로 올라가기 때문에 formate 분해 효소인 formate hydrogen lyase (FHL)의 activity가 떨어져서 formate가 남아 있음에도 불구하고 수소생산이 매우 느려지거나 더 이상 수소생산이 일어나지 않는 것이라 짐작된다.

## 4. 결 론

미생물에 의한 수소생산은 주로 미생물 성장과 함께 일어난다. 그러나 본 연구에서 분리된 새로운 종의 Enterobacter asburiae SNU-1의 경우 수소생산 단계가 미생물 성장과 분리되어 일어나는 것을 발견하였다. 이는 기존의 다른 혐기미생물과는 다른 특징을 나타내는 것이다. 본 균주는 exponential phase 동안 glucose 분해에 의해 formate를 생산한다. 그러나 이러한 formate는

다시 formate hydrogen lyase (FHL)에 의해 수소와 이산화탄소로 분해된다. 본 연구에서 우리는 formate 분해반응은 주로 stationary phase에서 일어나는 것을 관찰하였다. 그러므로 수소생산은 stationary phase에서 관찰되는 것이다. 이러한 특징은 formate와 미생물만 있으면 수소생산을 가능하게 한다. 즉, 수소생산을 미생물 생산과 분리 할 수 있는 것이다. 이는 현재 연구되고 있는 연료전지에 공급하기 위한 수소를 formate로부터 미생물 촉매를 이용하여 생산 할 수 있는 가능성을 보여주는 것이다. 따라서 앞으로 상용화를 위해 formate 분해 반응 조건의 최적화와 수소생산성을 향상시키는 연구를 통해 연료전지로의 적용이 가능 할 것이라 생각된다.

## References


[1] Das D, Veziroglu TN, 2001. "Hydrogen production by biological processes: a survey of literature.", Int J Hydrogen Energy, 26:13-28.

[2] Yoon, JH, Sim SJ, Kim MS, Park TH, 2002. "High cell density culture of *Anabaena variabilis* using repeated injections of carbon dioxide for the production of hydrogen.", Int J Hydrogen Energy, 27: 1265-70.

[3] Yoon, JH, Shin JH, Kim MS, Sim SJ, Park TH, 2006. "Evaluation of conversion efficiency of light to hydrogen energy by *Anavaena variabilis*" Int J Hydrogen Energy, 31:721-7.

[4] Kumar N, Das D, 2001. "Continuous hydrogen production by immobilized *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 using lignocellulosic materials as solid matrices.", Enzyme Microb Technol, 29:280-7.

[5] Rachman MA, Furutani Y, Nakashimada Y, Kakizono T, Nishio N, 1997. "Enhanced hydrogen production in altered mixed acid fermentation of glucose by *Enterobacter aerogenes*." J Fermen Bioeng, 83:358-63.

[6] Palazzi E, Fabiano B, Perego P, 2000. "Process development of continuous hydrogen production by *Enterobacter aerogenes* in a packed column reactor.", Bioprocess Eng, 22:205-13.

[7] Yokoi H, Ohkawara T, Hirose J, Hayashi S, Takasaki Y, 1995. "Characteristics of hydrogen production by aciduric *Enterobacter aerogenes* strain HO-39.", J Fermen Bioeng, 80:571-4.

[8] Nakashimada Y, Rachman MA, Kakizono T, Nishio N, 2002. "Hydrogen production of *Enterobacter aerogenes* altered by extracellular and intracellular redox states.", Int J Hydrogen Energy, 27:1399-405.

[9] Kalia VC, Jain SR, Kumar A, Joshi AP, 1994. "Fermentation of bio-waste to $H_2$ by *Bacillus licheniformis*.", World J Microbiol Biotechnol, 10:224-7.

[10] Oh Y-K, Kim Y-J, Park J-Y, Lee TH, Kim M-S, Park SH, 2005. "Biohydrogen production from carbon monoxide and water by *Rhodopseudomonas palustris* P4.", Biotechnol Bioprocess Eng, 10:270-4.

[11] Chen W-M, Tseng Z-J, Lee K-S, Chang J-S, 2004. "Fermentative hydrogen production with *Clostridium butylicum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge.", Int J Hydrogen Energy, in press, available online at www.sciencediret.com

[12] Kumar N, Das D, 2001. "Continuous Hydrogen production by immobilized *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 using lignocellulosic material as solid matrices.", Enzyme Microbiol Technol, 29:280-87.