

*Enterobacter aerogenes*의 혐기발효에 의한 바이오 수소 생산 배지의 최적화

김규호 · 최영진 · †김의용

서울시립대학교 화학공학과

(접수 : 2007. 11. 6., 게재승인 : 2008. 1. 15.)

The Optimization of Biohydrogen Production Medium by Dark Fermentation with *Enterobacter aerogenes*

Kyu Ho Kim, Young Jin Choi, and Eui Yong Kim†

Department of Chemical Engineering, University of Seoul, Seoul 130-743, Korea

(Received : 2007. 11. 6., Accepted : 2008. 1. 15.)

Hydrogen is considered as an energy source for the future due to its environmentally friendly use in fuel cells. A promising way is the biological production of hydrogen by fermentation. In this study, the optimization of medium conditions which maximize hydrogen production from *Enterobacter aerogenes* KCCM 40146 were determined. As a result, the maximum attainable cumulative volume of hydrogen was 431 ml under the conditions of 0.5 M potassium phosphate buffer, pH 6.5 medium containing 30 g/L glucose. The best nitrogen sources were peptone and tryptone for the cell growth as well as hydrogen production. The control of cell growth rate was found to be an important experimental parameter for effective hydrogen production

Key Words : Biohydrogen production, anaerobe microorganism, dark fermentation, *Enterobacter aerogenes* KCCM 40146

서 론

우리나라는 높은 인구 밀도와 이에 따른 에너지의 과소비로 인하여 에너지 수급에 어려움을 겪고 있다. 2006년도 자료에 따르면 국내의 에너지 자립율은 3.4%로 매우 낮은 수치일 뿐 아니라(1), 화석 연료의 과다 사용에 따른 환경오염의 심각성이 대두되었다. 따라서 에너지 자립율을 높이면서 동시에 친환경적인 대체 에너지의 연구, 개발이 시급한 상황에 있다. 현재 미국과 유럽연합 (EU), 중국 등 에너지 과소비국들도 에너지 자원을 확보하기 위한 대체 에너지의 개발에 박차를 가하고 있다(2). 이처럼 대체 에너지에 관심을 보이는 이유는 점점 악화되어 가는 환경문제에 대한 범지구적인 위기의식에서 출발하는 것이다. 2007년 2월, 유엔 IPCC에서 발표한 '제4차 기후변화보고서'에서는 지금과 같이 석유, 석탄 등 화석연료에 의존한 인류의 생활이 계속되면 21세기말 지구의 평균기온이 최대 6.4℃ 상승하고 해수면

은 59cm까지 상승할 것이라고 경고하였다. 또한 지난 100년 동안 지구의 평균 기온이 0.74℃까지 올랐다고 밝히면서 2001년 발표한 내용보다 한층 더 지구온난화의 심각성을 경고하였다(3). 우리나라도 평균기온이 상승하면서 이상기온에 따른 환경피해 사례가 증가하고 있다. 2004년도에는 평년대비 1.3℃ 상승하였으며 2008년도에는 평년대비 3.0℃ 온도가 상승할 것으로 예측하고 있다(4). 이러한 이유들은 대체 에너지의 필요성을 더욱 부각시키고 있다. 유럽연합에서도 대기 오염물질 및 온실가스 감축 등 환경문제에 적극적으로 대처하고 있으며 기후변화를 방지하기 위한 다양한 온실가스 감축 정책을 실시하고 있다. 이를 위해서는 신재생 에너지의 보급 확대, 열병합발전 및 지역난방 확대, 에너지 효율 향상과 같은 저탄소 에너지 공급 확대와 에너지 사용 효율향상 등의 정책이 필요하다(5).

본 논문에서는 대체 에너지의 개발을 위해 수소생산 미생물 중 *Enterobacter aerogenes*의 혐기발효에 의한 수소 생산에 대해 최적화 연구를 수행하였다(6). 미생물 배양에서 이론적으로 1 mol의 glucose로부터 2~4 mol의 수소가 발생하지만 발효 중에 발생하는 유기산의 생산율과 pH의 변화 등은 수소생산 효율을 크게 좌우하며, 그 외에 배지 내의 pH 설정, 증균속, 탄소원 종류, 질소원 종류 등이 수소생산

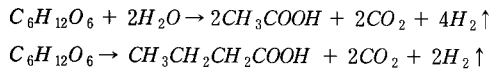
† Corresponding Author : Department of Chemical Engineering, University of Seoul, Seoul 130-743, Korea

Tel : +82-2-2210-2530, Fax : +82-2-2216-0570

E-mail : eykim@uos.ac.kr

에 영향을 준다(7-11).

결과 및 고찰



배지의 초기 pH, 탄소원, 질소원 등을 비교, 분석하여 수소 생산을 위한 최적의 조건을 조사하였다.

재료 및 방법

대상균주

본 실험에서 사용된 균주는 탄소원을 기질로 하여 통성 혐기성 조건에서 수소와 부산물인 유기산, CO₂ 등을 생산하는 *Enterobacter aerogenes* KCCM 40146이다. 한국미생물보존센터에서 균주를 분양받았으며, 균주는 활성배양체 상태로 4℃에서 냉장보관하였다.

배지조제 및 배양조건

중균 배양을 위한 배지의 조성은 다음과 같다(beef extract 3 g, peptone 5 g, D.W 1 ℓ, pH 7.0). 미생물 배양을 위한 배지의 조성은 다음과 같다(glucose 30 g, peptone 5 g, K₂HPO₄ 14 g, KH₂PO₄ 6 g, Na₃C₆H₅O₇·S·2H₂O 1 g, (NH₄)₂SO₄ 2 g, trace element solution (NaCl 0.1 g, MgCl₂·6H₂O 0.1 g, MnSO₄·6H₂O 0.015 g, FeSO₄·7H₂O 0.025 g, CuSO₄·5H₂O 0.005 g, CoCl₂·5H₂O 1.25 × 10⁻⁴ g), D.W 1 ℓ, pH 6.7 (12-17). 배지 내 용존산소를 최소화하기 위해 L-cysteine을 환원제로 사용하였다(17, 18). 조제된 배지는 Ar gas로 20 min 동안 purging하였다. 160 ml serum bottle에 배지 100 ml씩 옮겨 넣고 aluminium cap, butyl stopper로 밀봉, 밀폐한 후 121℃, 15 min 멸균하였다. 배지의 초기 pH를 설정하기 위하여 potassium phosphate buffer를 사용하였다(11, 12). 종균액을 1% (v/v) 접종한 후 37℃, 160 rpm에서 배양하였다(13).

시료채취 및 분석방법

접종 후 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36, 48, 72, 96, 120, 144, 168 시간 경과된 시점에서 syringe를 이용하여 head space 중의 gas 1 ml과 배양액 1 ml을 시료 채취하였다.

Head space에 생성된 gas의 부피는 syringe를 이용하여 측정하였다. Gas 중의 수소의 조성은 GC (Gas Chromatography, Young-Lin M600D, SUPELCO Carboxen 1000 column, TCD detector)를 이용하여 분석하였다. 수소분석을 위해 표준물질로 5%, 10%, 20%, 44%의 수소를 사용하였다. Cell mass는 UV (Ultraviolet Spectroscopy, Varian Cary 50 UV-vis, 10 mm Quartz cell)로 원 시료의 10배 희석하여 660 nm에서 측정하였으며 건조 중량법을 이용하여 균주의 농도를 산출하였다. Glucose는 DNS법에 의하여, sucrose는 페놀-황산법에 의하여 분석하였다(13). 배양 중 생성되는 유기산은 HPLC (Varian prostar UV-325, BIO-RAD Aminex[®] HPX-87H column)를 이용하여 mobile phase H₂SO₄ 5 mmol, flow rate 0.6 ml/min, 35℃, 210 nm에서 UV detector로 분석하였다(9).

초기 pH의 영향

Fig. 1은 배지의 초기 pH를 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0으로 설정(14, 15)하여 *Enterobacter aerogenes*의 배양 과정에서 얻은 결과 그래프로 0.5 M potassium phosphate buffer를 이용하였다. Buffer를 사용하지 않은 배지를 대조군으로 선정하였다. 누적 수소 생산량에서는 초기 pH가 6.5일 때 431 ml로 가장 많았으며 다음은 pH 6.0의 순이었다. 초기 pH가 5.0, 5.5에서는 균주의 성장이 매우 저조하였으며, 이와 더불어 수소의 생산량도 저조하였다. 한편 buffer를 사용하지 않은 경우 배양초기 20시간 내에 0.75 g/L로 세포의 농도가 가장 높았지만 급격한 pH 강하로 인해 수소의 누적생산량 (268 ml)은 buffer를 사용한 초기 pH 6.5와 6.0일 때보다 낮은 값을 보였다.

미생물의 성장에 따른 pH의 감소는 배양액의 HPLC 분석 결과 배양 중에 acetate, butyrate, lactate의 생성 때문인 것으로 확인되었다. pH가 5.5인 경우 butyrate의 생성이 활발한 반면 수소의 생산량이 최대값을 보이는 pH가 6.5인 경우 acetate와 lactate의 농도가 높게 나타났다.

이상의 결과로부터 초기 buffer의 사용이 수소의 생산에 중요한 인자가 됨을 알 수 있었다. 또한 세포의 성장패턴과 수소의 생산패턴이 일치하는 1차 대사산물의 특성이 있어서 배양 48시간 이내에 수소의 생산과 세포의 성장이 종결됨을 알 수 있었다.

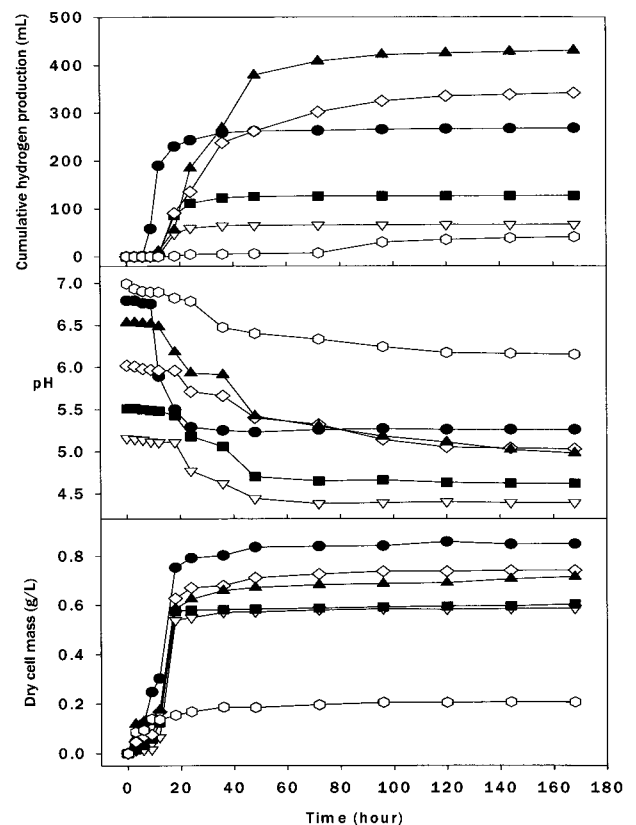


Figure 1. Cultivation of *Enterobacter aerogenes* with the initial pH (symbol: pH 6.8 (unadjusted, ●), pH 5.0 (▽), pH 5.5 (■), pH 6.0 (◇), pH 6.5 (▲), pH 7.0 (○)).

Potassium phosphate buffer 농도의 영향

Fig. 2는 효율적인 buffer의 농도를 알아보기 위해 0.3 M, 0.5 M, 1.0 M의 buffer를 사용하여 초기 pH 6.5로 설정한 배지에서 실험한 결과이다. Buffer를 사용하지 않은 배지를 대조군으로 선정하였다.

Buffer를 사용하지 않았을 때가 세포의 농도가 가장 높았으나 수소의 생산량은 0.3 M, 0.5 M 농도의 buffer를 사용하였을 때에 더 높은 값으로 나타났다. 1.0 M buffer를 사용한 경우는 고농도의 potassium phosphate buffer 성분으로 인해 균주 성장 적정 pH 범위에 이르지 못하고 세포의 성장이 저해 받았음을 알 수 있었다. Buffer 농도 0.3 M, 0.5 M에서 비슷한 결과를 나타냈으며 따라서 최적의 buffer 농도를 0.5 M로 선정하였다.

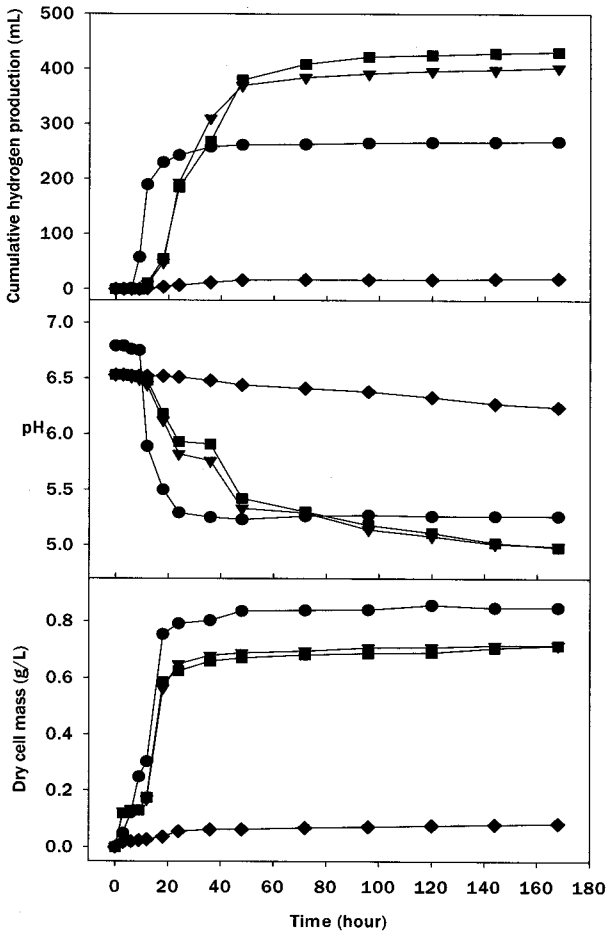


Figure 2. Cultivation of *Enterobacter aerogenes* with the buffer concentration (Symbol: unadjusted pH (●), 0.3 M buffer (▼), 0.5 M buffer (■), 1.0 M buffer (◆)).

탄소원의 영향

탄소원으로 glucose와 sucrose를 선정하여 실험하여 그 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 세포의 성장과 수소의 생산에 있어 두 탄소원 모두 세포성장의 지연기를 제외한 나머지는 유사한 양상을 보여 각 30 g/L의 농도에서 glucose의 경우 431 ml, sucrose의 경우 427 ml의 총 누적 수소를 생산하였다.

Fig. 4는 탄소원으로 glucose와 sucrose를 각 30 g/L 사용하였을 경우 수소 비생산 속도를 나타낸 그래프이다. Glucose

의 경우 배양초반 수소의 생산속도가 급격히 증가하여 배양 후 20시간에 215.3 ml/l/h의 최대값을 나타낸 후 감소하였다. 반면에 sucrose의 경우 배양 후 36시간에 수소의 생산속도가 98.3 ml/l/h의 최대값을 나타낸 후 완만히 감소하는 양상을 보였다. 총 누적 수소량에서는 비슷한 결과를 나타냈지만, 수소의 비생산속도가 높은 glucose를 최적의 탄소원으로 선정하였다.

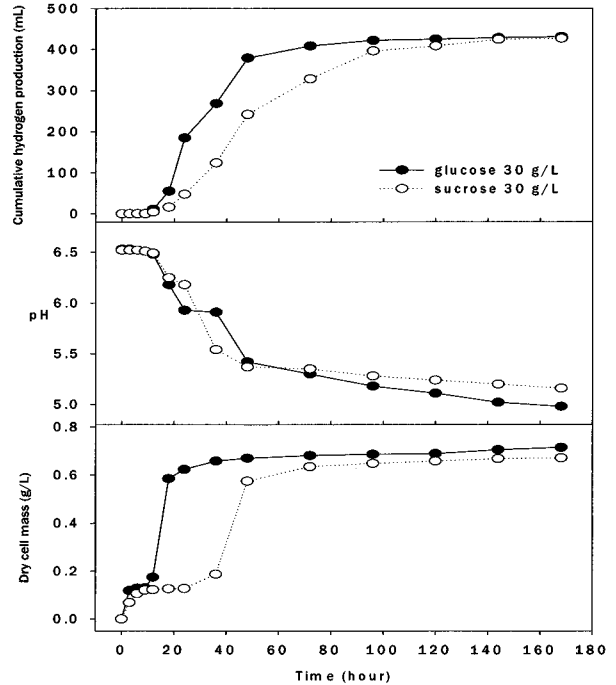


Figure 3. Cultivation of *Enterobacter aerogenes* in glucose and sucrose mediums.

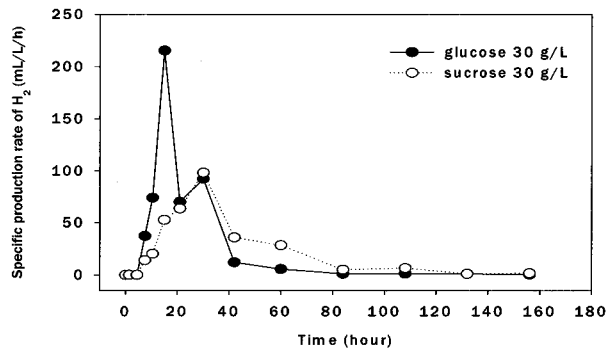


Figure 4. Hydrogen production rate in glucose and sucrose mediums.

질소원의 영향

Fig. 5은 질소원으로 urea, malt extract, yeast extract, peptone, tryptone을 각 5 g/L씩 첨가하였을 때의 실험결과를 나타낸 그래프이다. 질소원을 넣지 않은 배지를 대조군으로 선정하였다.

대조군의 경우 균주의 성장이 이루어지지 않은 것으로 보아 균주의 성장에 있어서 질소원의 존재가 중요하다는 것을 알 수 있었다. Peptone과 tryptone을 넣은 배지가 수소의 생산, 균주의 성장 모두 가장 효율적이었다. Urea의 경우 세포성장 지연기가 길었으며 결국 낮은 수소 생산 효율을

나타내었다. Malt extract, yeast extract의 경우 균주의 성장이 대체적으로 양호하였으나 높은 수소 생산에는 미치지 못하였다.

미생물의 비성장 속도와 수소의 비생산속도

Fig. 6은 *Enterobacter aerogenes*의 비성장속도와 단위세포당 수소의 생산속도의 관계를 나타낸 그래프이다. 실험 결과 비성장속도인 μ 의 값은 3.85~4.65으로 초기 pH 7.0을 제외하고 비슷한 값을 나타내었다. 하지만 단위 시간 당 수소 비생산 속도인 q_p 의 값은 4.68~17.20으로 초기 pH 6.5에서의 수소 생산 효율이 가장 높았다.

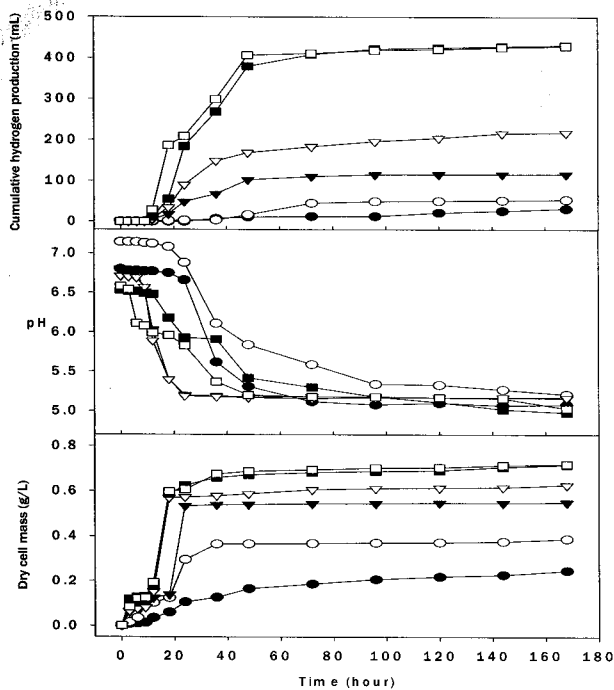


Figure 5. Cultivation of *Enterobacter aerogenes* in various nitrogen source mediums (Symbol: no add (●), urea (○), malt extract (▼), yeast extract (▽), peptone (■), tryptone (□)).

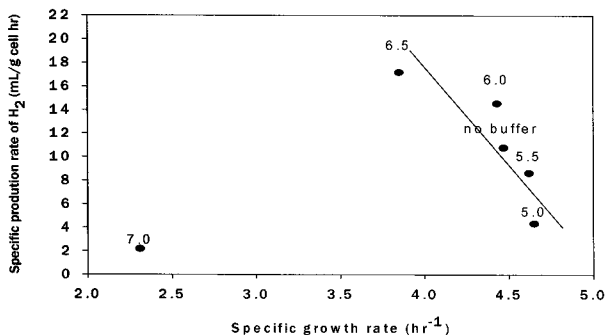


Figure 6. Correlation graph in cell growth per unit time & hydrogen production per unit time.

초기 pH 7.0에서는 미생물의 성장이 저조하였음을 Fig. 1로부터 알 수 있었다. 그러나 미생물의 성장이 활발히 일어난 pH 5.0~6.5의 범위에서는 미생물의 비성장속도가 클수록 수소의 비생산속도가 작아지는 결과를 Fig. 6에서 관찰할 수 있었다. 따라서 미생물의 성장속도 조절이 수소의 효율적

생산을 위해 중요한 실험변수임을 알 수 있었다.

최적인 조건 하에서 수소의 생산

이상의 실험 결과로부터 수소 생산을 위한 최적의 조건이 Table 1과 같이 확인되었다. 따라서 최적의 조건 하에서 배양 시간에 따른 수소의 생합성 결과를 Fig. 7에 나타내었다.

수소 생산에서 1.6~2.1 H₂ mol / mol glucose의 높은 수율을 보인 실험에서는 수소 생산 과정에서 butyrate의 생산율이 상대적으로 낮은 수치를 나타냈으며, 0.6~1.2 H₂ mol / mol glucose의 낮은 수율을 보인 실험에서는 acetate의 생산율이 낮게 나왔다. 또한 buffer를 사용하여 적정 초기 pH를 설정한 배지에서는 pH가 높게 유지되면서 butyrate보다 acetate의 생산율이 높아지면서 높은 수소 생산 수율을 보였다. 이는 수소 생산 과정에서 생산되는 유기산 중 acetate, butyrate의 생산율과 수소 생산 수율에 관계가 있는 것을 알 수 있다(9, 16, 19, 20).

따라서, 단위 glucose 당 수소 생산 mol 수는 buffer를 사용하여 배지의 초기 pH를 설정하고 다량의 영양분을 첨가하거나 용기의 크기를 크게 하여 압력에 대한 저항을 적게 하면 그 값이 높아질 수 있다.

Table 1. Optimum conditions of *Enterobacter aerogenes* KCCM 40146

bacteria	initial pH	phosphate buffer concentration	carbon source	nitrogen source	H ₂ mol/mol glucose
<i>Enterobacter aerogenes</i> KCCM 40146	6.5	0.5M	30 g/L	peptone	1.06

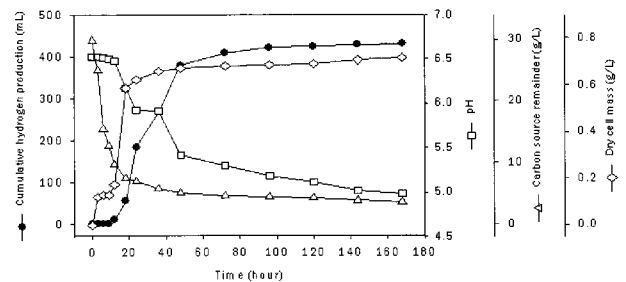


Figure 7. Cultivation of *Enterobacter aerogenes* in optimum condition medium.

요 약

수소는 연료전지와 같은 친환경적인 용도로 인해 미래의 에너지로서 주목받고 있는데, 생물학적인 발효법은 수소의 생산을 위한 유망한 방법이다. 본 연구에서는 *Enterobacter aerogenes* KCCM 40146을 대상으로 수소 생산을 최대 하기 위한 배지의 조건을 최적화하였다. 그 결과, 0.5 M potassium phosphate buffer pH 6.5에서 glucose 30 g/L일 때 수소의 누적 농도가 431 mL로 최대값을 얻을 수 있었다. 질소원으로 peptone과 tryptone을 넣은 배지가 수소의 생산 뿐 아니라 균주의 성장에 가장 효율적이었다 한편, 미생물의 성장속도 조절이 수소의 효율적 생산을 위해 중요한 실험변수임을 알 수 있었다.

REFERENCES

1. 에너지관리공단 (2006), 에너지 지표.
2. 국제에너지기구 (2006), 연례 보고서.
3. 한국에너지기술연구원 (2007), 수소정책동향보고서(국제에너지현황 및 수소에너지 연구개발 동향).
4. 한국기상청 (2006), 온도상승추이 보고서.
5. 에너지경제연구원 (2006), 에너지 포커스.
6. Shin Jong Hwan and Tai Hyun Park (2006), Biological Hydrogen Production Processes, *Korean Chem. Eng. Res.* **44**(1), 16-22.
7. Mark D. Redwood and Lynne E. Macaskie (2006), A two-stage, two-organism process for biohydrogen from glucose, *Int. J. Hydrogen Energy* **31**, 1514-1521.
8. Xi Chen, Yaqin Sun, and ZhiLong Xiu (2006), Stoichiometric analysis of biological hydrogen production by fermentative bacteria, *Int. J. Hydrogen Energy* **31**, 539-549.
9. M. Morimoto and M. Atsuko (2004), Biological production of hydrogen from glucose by natural anaerobic microflora, *Int. J. Hydrogen Energy* **29**, 709-713.
10. H. Yokoi and T. Ohkawara (1995), Characteristics of hydrogen production by aciduric *Enterobacter aerogenes* strain HO-39, *J. Ferment. Bioeng.* **80**(6), 571-574.
11. H. Yokoi and R. Maki (2002), Microbial production of hydrogen from starch-manufacturing wastes, *Biomass and Bioenergy* **22**, 389-395.
12. Ching-Hsiung Wang, Ping-Jei Lin (2006), Fermentative conversion of sucrose and pineapple waste into hydrogen gas in phosphate-buffered culture seeded with municipal sewage sludge, *Process. Biochem.* **41**, 1353-1358.
13. Yoon Woo Hyun, Hyun Kab Kim, and Tae Jin Lee (2006), Study of Biological Hydrogen Gas Production under Anaerobic Fermentation, *J. of KOREA*, **14**(1).
14. Hiroyasu Ogino and Takashi Miura (2005), Hydrogen production from glucose by anaerobes, *Biotechnol. Prog.* **21**, 1786-1788.
15. Herbert H. P. Fang and Hong Liu (2002), Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture, *Bioresource Technology* **82**, 87-93.
16. Jeong Ok Kim and Yong Hwan Kim (2005), Immobilization methods for continuous hydrogen gas production biofilm formation versus granulation, *Process Biochemistry* **40**, 1331-1337.
17. M. A. Rachman and Y. Furutani (1997), Enhanced hydrogen production in altered mixed acid fermentation of glucose by *Enterobacter aerogenes*, *J. Ferment. Bioeng.* **83**(4), 358-363.
18. H. Yokoi and T. Tokushige (1998), H₂ production from starch by a mixed culture of *Clostridium butyricum* and *Enterobacter aerogenes*, *Biotechnol. Letter* **20**(2), 143-147.
19. Ko In Beom, Hang Sik Shin, and Yong Doo Lee (2006), Influence of Substrate Concentration and Hydraulic Retention Time on the Hydrogen Production Using Anaerobic Microflora, *J. of KSBB*, 911-916.
20. Kim Mi Sun, Y. S. Yoon, S. J. Sim, T. H. Park, and J. K. Lee (2002), Hydrogen and Organic Acids Production by Fermentation Using Various Anaerobic Bacteria, *Trans. of the Korea Hydrogen and New Energy Society* **13**(4), 330-338.