

*Enterobacter aerogenes*에 의한 수소 생산 초기 단계인 포메이트 탈카복시 반응 연구

최진영 · 조영충 · 안익성[†]

연세대학교 화공생명공학과
(2009년 6월 24일 접수, 2009년 7월 13일 채택)

Formate Decarboxylation: Initial Step for Hydrogen Production by *Enterobacter aerogenes*

Jinyoung Choi, Young Choong Jho, and Ik-Sung Ahn[†]

Department of Chemical and Biomolecular Engineering, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea
(Received June 24, 2009; accepted July 13, 2009)

철, 셀레늄, 그리고 몰리브데늄이 결여되어 있는 최소배지는 *Escherichia coli* MC4100의 혐기성 배양에서의 수소생산을 억제하였다. 철, 셀레늄, 그리고 몰리브데늄은 대장균과 *Enterobacter* 모두의 formate dehydrogenase (FDH_{II}) 효소의 보조인자로 알려져 있다. 그러므로 이러한 미량성분들이 최소배지에 결여되어 있을 때는 FDH_{II}를 통한 수소생산이 대장균 뿐만 아니라 *E. aerogenes*에서도 저해될 것이다. 이러한 성분들이 부족할 때 *E. aerogenes* 413에 의한 수소 생산은 지연되었다. 그러므로, *E. aerogenes*에 의한 수소 생산은 NADH의 재산화가 아닌 포메이트 탈카복시 반응에 의해서 시작된다고 사료된다.

The absence of Fe, Se, and Mo in a minimal medium prevented the production of hydrogen from the anaerobic culture of *Escherichia coli* MC4100. Fe, Se, and Mo are known to be cofactors of formate dehydrogenase (FDH_{II}) of both *E. coli* and *Enterobacter aerogenes*. Hence when these trace elements are absent in the minimal medium, hydrogen production through formate dehydrogenation would be inhibited not only in *E. coli* but also in *E. aerogenes*. Hydrogen production by *E. aerogenes* 413 was delayed when lacking these trace elements. Therefore, it is believed that hydrogen production of *E. aerogenes* is initiated not by the reoxidation of nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) but by formate decarboxylation.

Keywords: hydrogen production, formate dehydrogenase, NADH, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*

1. 서 론

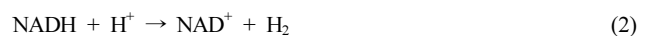
지난 10년 동안, 수소생산은 전 세계적으로 연구되어 왔다. 이는 수소가 환경 문제를 일으키지 않는 청정 에너지로 여겨지기 때문이다. 그러나 현재 상용화된 수소생산 기술은 에너지원으로서 화석 연료를 필요로 하므로 친환경적이라 할 수 없다. 그러나 물의 생물학적 광분해, 농업작물이나 폐기물의 광분해·암발효 등을 통해 생성되는 생물학적 수소 생산은 진정한 의미에서 친환경적이다[1-4]. 암발효에서는, 혐기성 혹은 통성혐기성 미생물이 포도당과 같은 기질을, 빛과 산소가 부족한 상황에서 분해함으로써 수소를 생산한다[5-7]. 물의 광분해와 비교해보면, 암발효는 빛 에너지 공급이 필요치 않고, 높은 수소 발생속도를 보여준다. 그러나 생물학적 광분해에 비해 낮은 수소 생산 수율을 보인다[8]. 최근에는 광분해와 암발효를 함께 사용하는 하이브리드 시스템이 연구되고 있다[5].

대장균과 *Enterobacter aerogenes*는 암발효를 수행 할 수 있다고 가장 잘 알려진 균주이다. 예를 들어 이들의 성장에 필요한 탄소와 에너지를 제공하는 포도당의 경우, 대부분은 Embden Meyerhof Parnas pathway를 통해 피루브산으로 산화되고[9,10], 일부는 pentose phos-

phate pathway를 통해 산화된다[11]. 후자의 경로는 NADPH와 pentose phosphates의 source가 된다고 알려져 있다. 혐기성 상태에서는 피루브산이 다양한 유기산(초산, 젖산, 개미산)이나 에탄올로 전환된다. 대장균과 *E. aerogenes* 모두 포메이트의 decarboxylation을 통해서 수소의 생산이 가능하다. 이 반응은 다음과 같이 formate hydrogenlyase (FHL_{II}) 효소 반응을 통해 이루어진다[12-15]:



FHL_{II}는 formate dehydrogenase (FDH_{II})와 hydrogenase로 이루어진 다중효소시스템이다[16]. 철, 셀레늄, 그리고 몰리브데늄은 FDH_{II}의 보조인자로 알려져 있다[15]. 또한 *E. aerogenes*는 다음과 같이 NADH의 산화를 통해 수소를 생산한다[17,18]:



이론적으로 포메이트 탈카복시반응을 통해서도 포도당 1몰 당 2몰의 수소만이 생산될 수 있는 반면 NADH의 산화에 의해서는 12몰의 수소를 생산 할 수 있다. 따라서 *E. aerogenes*를 통한 수소 생산에 있어서 이 두 가지 경로의 발생 순서와 비율에 대해 지식이 매우 중요하

[†] 교신저자 (e-mail: iahn@yonsei.ac.kr)

다. 철, 셀레늄, 그리고 몰리브데늄이 FDH_{II} 의 보조인자이므로 이러한 미량성분들을 배지, 특히 최소배지에 첨가함으로써 전자의 경로(포메이트의 탈카복시반응)를 조절할 수 있을 것이다.

이번 연구의 목적은 *E. aerogenes*를 사용한 수소 생산에서 위의 두 가지 pathway의 순서를 결정하는 것이다. 이러한 목적을 달성하기 위해서, 우리는 우선 대장균을 통한 수소생산을 철, 셀레늄, 그리고 몰리브데늄의 결핍을 통해서 억제시킬 수 있는지 조사하였다. 실험 결과가 이러한 미량성분들의 결핍이 대장균에서의 수소 생산을 억제함을 보여 주었으므로, 우리는 철, 셀레늄, 그리고 몰리브데늄의 존재 유무에 따른 *E. aerogenes*의 수소생산의 time profile을 조사하였다.

2. 실험

2.1. 미생물 균주 및 배양 배지

수소생산 균주로서, 본 연구에서는 *E. coli* MC4100 (ATCC 35695)와 *E. aerogenes* 413 (ATCC 35028)를 사용하였다. 세포 배양은 M9 최소 배지[19]에 배지 1 L당 0.25 g의 $MgSO_4 \cdot H_2O$ 와 0.01 g의 $CaCl_2$ 를 보충한 배지에서 수행하였다. 포도당은 탄소원으로서 10 g/L의 농도로 가입하였다. 필요한 경우에 $FeSO_4 \cdot H_2O$, Na_2SeO_4 그리고 $Na_2MoO_4 \cdot H_2O$ 를 각각 50 μM , 5 μM 그리고 5 μM 로 가입하였다[20]. 혐기성 배양을 위한 접종원은 호기 배양에서 준비하였다. 수확한 세포들은 M9 최소배지에 3번 세척 후, O.D.₆₀₀ 값이 1.0이 되도록 조정하였다. 본 연구에서 사용된 모든 화학물질들은 분석 등급을 사용하였다.

2.2. 수소 생산을 위한 발효

250 mL의 배양 플라스크에 100 mL의 배지를 넣었다. 1.0 mL의 접종물을 더한 후, 플라스크는 teflon stopper로 봉하였다. 1 N NaOH 150 mL 용액이 담겨있는 다른 250 mL 플라스크를 배양플라스크에 연결하여 CO_2 를 흡수하였다[21,22]. 순수 질소 가스에 의해 산소를 제거한 후, 플라스크들은 37 °C에서 100 rpm으로 흔들며 배양되었다. 일정 시간 간격으로 배양 플라스크와 이산화탄소 흡수 플라스크는 생산된 수소의 부피, pH, 세포 성장, 그리고 포도당, 염화암모늄(질소원), 유기산과 에탄올 같은 부산물을 측정하기 위해 희생되었다.

2.3. 분석 방법

이산화탄소 흡수 플라스크의 head space에 있는 수소는 열전도 검출기(주입 온도 80 °C, 컬럼 온도 35 °C, 검출 온도 80 °C)를 사용하여 가스 크로마토그래피(Younglin M600D, Korea)에 의해 분석하였다. 분리는 stainless 60/80 molecular sieve 5 A column (Supelco, Inc., [6ft, 1/8 in.])에 의해 수행하였다. 유속 20 mL/min의 아르곤을 운송 가스로 사용하였다.

세포 성장은 Shimadzu UV160U Spectrophotometer를 사용하여 600 nm에서 흡광도 측정으로 모니터 되었다. 포도당 분석은 RI detector를 사용하여 high-performance liquid chromatography (Hewlett Packard 1100)로 측정하였다. carbohydrate cartridge column (Waters, [4.6 × 250 mm])과 유속 1.0 mL/min의 80% 아세톤니트릴 수용액을 각각 분리 칼럼과 mobile phase로 사용하였다. 암모늄 이온의 농도는 ammonium electrode (Orion model 95-12)로 측정하였다. 유기산과 에탄올은 UV detector (210 nm)를 사용하여 HPLC로 분석하였다. 분리는 Aminex HPX-87H column (Bio-Rad, [7.8 × 300 mm])에서 수행하였다. 시료들은 60 °C에서 유속 0.6 mL/min의 0.01 N H_2SO_4 용액으로 등용매 조건에서 용리되었다.

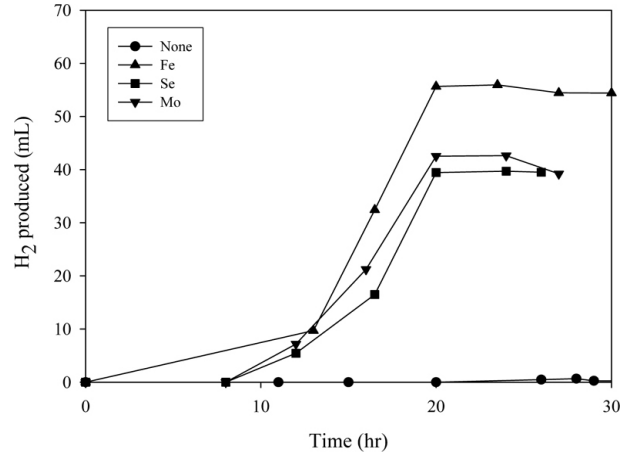


Figure 1. Effect of Fe, Se, and Mo on hydrogen production by *E. coli* MC4100.

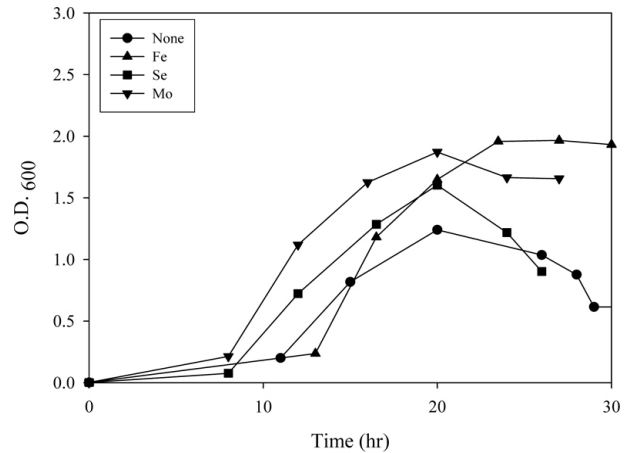


Figure 2. Effect of Fe, Se, and Mo on cell concentrations of *E. coli* MC4100 denoted by optical densities at 600 nm.

3. 결과 및 고찰

3.1. 철, 셀레늄, 그리고 몰리브데늄이 *E. coli* MC4100에 의한 수소 생산에 미치는 영향

철, 셀레늄, 그리고 몰리브데늄은 대장균에 의한 수소 생산의 유일한 경로인 포메이트의 탈카복시 반응을 촉진시키는 FDH_{II} 의 조효소이다. 따라서 이 미량 원소들을 배양 배지에 가입하지 않으면 수소 생산은 억제 된다는 것을 예상 할 수 있다. 수소 생산과 세포 농도가 이 미량 원소들의 가입에 의존한다는 것은 Figure 1과 2에 각각 나타나 있다. 이러한 원소들의 첨가 없이는 수소생산은 거의 무시할 정도로 작았고 미생물의 성장도 지연되었다. 미생물 배양 동안 pH의 감소는 미량 원소들에 의해 영향을 받지 않는 것처럼 보였다(Figure 3). 포도당 농도 측정으로부터, 수소 생산 수율 계수를 계산하여 Table 1에 최대 수소 생산량과 함께 나타내었다. 그러므로, FDH_{II} 에 의해 촉진되는 포메이트의 탈카복시 반응을 통한 수소 생산은 철, 셀레늄, 그리고 몰리브데늄 없이는 거의 불가능하다.

3.2. *E. aerogenes* 413에 의한 수소 생산

같은 FDH_{II} 가 대장균과 *E. aerogenes* 모두의 포메이트 탈카복시 반응에 관여하기 때문에, *E. aerogenes*에 의한 수소 생산이 철, 셀레

Table 1. Yield Coefficient for H₂ Depending on the Addition of Trace Elements to the Culture of *E. coli* MC4100

Element	Max. H ₂ (mL) ^a	Y _{P/S} (mol H ₂ /mol glucose)
none	0.65	0.023
Fe	55.9	0.58
Se	39.7	0.43
Mo	42.6	0.50

^amaximum volume (mL) of H₂ produced per 100 mL culture volume

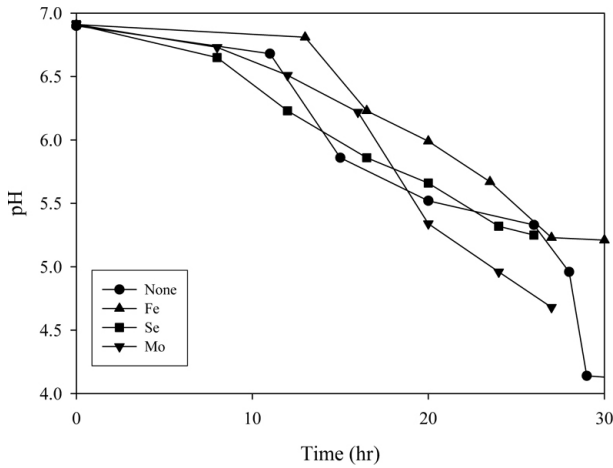


Figure 3. pH profile during the culture of *E. coli* MC4100 for H₂ production.

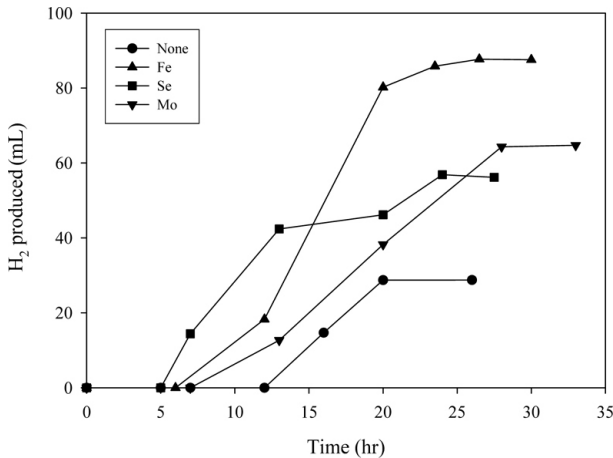


Figure 4. Effect of Fe, Se, and Mo on hydrogen production by *E. aerogenes* 413.

늄, 그리고 몰리브데늄이 없는 경우에 일어난다면, NADH 재산화 과정을 통한 것일 것이다. Figure 4에 이러한 원소들이 *E. aerogenes*에 의한 수소 생산에 미치는 영향을 나타내었다. 이러한 원소들 중 어느 것이라도 첨가된 경우에 비해, 이러한 원소들이 배제된 경우 수소 생산은 적어도 5 h 이상 지연되었다. 그러므로, 포메이트 탈카복시화를 통한 수소 생산이 NADH 재산화 과정을 통한 수소 생산보다 앞서 발생한다고 할 수 있다. 미생물 성장기 중 지연기와 초기 지수 성장기에서, NADH는 세포 성장을 위해 상당량 필요한 것으로 보인다. 그러므로, *E. aerogenes*에 의한 수소 생산에서 대안 경로인 NADH의 재산화는 이 기간 동안 거의 일어나지 않을 것으로 보인다. 배양 중 세포

Table 2. Yield Coefficient for H₂ Depending on the Addition of Trace Elements to the Culture of *E. aerogenes* 413

Element	Max. H ₂ (mL) ^a	Y _{P/S} (mol H ₂ /mol glucose)
none	28.76	0.2311
Fe	87.67	0.7045
Se	56.87	0.4570
Mo	64.69	0.5198

^amaximum volume (mL) of H₂ produced per 100 mL culture volume

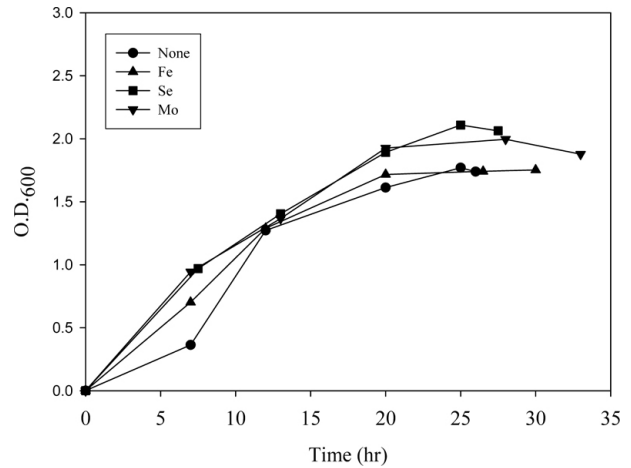


Figure 5. Effect of Fe, Se, and Mo on cell concentrations of *E. aerogenes* 413 denoted by optical densities at 600 nm.

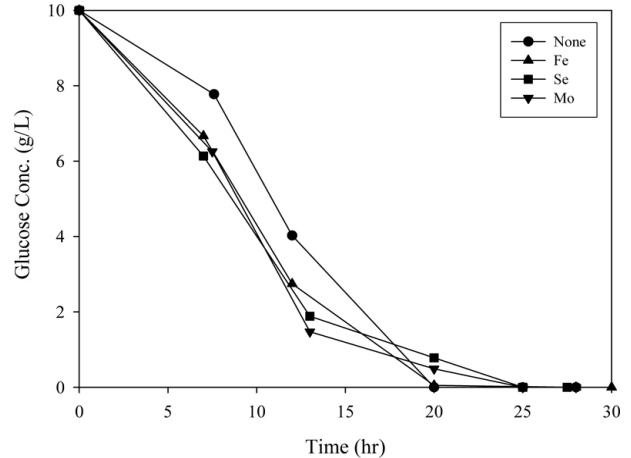


Figure 6. Profile of the glucose concentrations during the culture of *E. aerogenes* 413 for H₂ production.

농도와 포도당 농도의 변화는 각각 Figure 5와 6에 나타내었다. 초기 7 h 동안에만, 미량원소들이 없는 경우의 세포 농도와 포도당 농도가 미량원소들이 있는 경우 보다 낮았다. 따라서, 미량원소들을 가입하지 않은 경우, 첫 12 h 동안 수소생산이 발생하지 않는 현상을, 세포 성장 속도와 포도당 소비속도는 설명할 수 없다.

Figure 4와 6에 나타나 있는 실험 데이터로부터, 수소 수율 계수를 계산하여 Table 2에 최대 수소 생산량과 함께 나타내었다. 수소 생산 계수와 최대 수소 생산량은 철, 셀레늄, 그리고 몰리브데늄이 배양액에 존재할 때가 없을 때보다 훨씬 높았다. 특히, 철이 첨가 되었을 때가 그렇지 않을 때보다 무려 3배의 수율을 보였다. 이는 *E. aerogenes*

413에서의 수소 생산이 대부분 NADH 재산화보다는 포메이트 탈카르복시 반응을 통해 일어난다는 것을 의미한다. 또한, 이 결과는 Kurokawa 등의 실험결과[23]와도 일치한다.

4. 결 론

혐기성 미생물인 *E. coli* MC4100는 formate dehydrogenase (FDH_H)의 보조인자인 철, 셀레늄, 그리고 몰리브데넘이 없는 배지에서 수소를 거의 생산하지 못했다. 같은 배지에서 *E. aerogenes* 413에 의한 수소 생산은 5 h 이상 지연되었다. 대장균과 *E. aerogenes*는 같은 FDH_H를 갖고 있으므로, *E. aerogenes*는 이러한 미량 원소들 없이도 포메이트 탈수소화 반응을 일으키지 못하는 것으로 보인다. 그러므로 *E. aerogenes*에 의한 초기 수소 생산은 포메이트 탈수소화 반응을 통해 이루어지는 것으로 보인다. 또한, 이러한 미량 원소들이 있을 때의 수소 생산량은 미량 원소들이 존재하지 않을 때에 비하여 약 2배 가량 높게 측정되었다. 이는 대부분의 수소 생산이 포메이트 탈수소화 반응을 통해 일어난다는 것을 의미한다.

감사의 글

본 연구는 Korea Research Foundation Grant (KRF-2005-005-J01402)의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. P. C. Hallenbeck and J. R. Benemann, *Int. J. Hydrogen Energy*, **27**, 1185 (2002).
2. R. Nandi and S. Sengupta, *Crit. Rev. Microbiol.*, **24**, 61 (1998).
3. Y. Suzuki, *Int. J. Hydrogen Energy*, **7**, 227 (1982).
4. J. O'M Bockris, *Int. J. Hydrogen Energy*, **6**, 223 (1981).
5. D. Das and T. N. Veziroglu, *Int. J. Hydrogen Energy*, **26**, 13 (2001).
6. Y. K. Oh, M. S. Park, E. H. Seol, S. J. Lee, and S. H. Park, *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **8**, 54 (2003).
7. Y. K. Oh, Y. J. Kim, J. Y. Park, T. H. Lee, M. S. Kim, and S. H. Park, *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **10**, 270 (2005).
8. K. Hassmann and H.-M. Kuhne, *Int. J. Hydrogen Energy*, **18**, 635 (1993).
9. M. A. Rachman, Y. Furutani, Y. Nakashimada, T. Kakizono, and N. Nishio, *J. Ferment. Bioeng.*, **83**, 358 (1997).
10. F. C. Neidhardt, *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, 2nd ed., 262, ASM Press, Washington DC (1996).
11. G. Gottschalk, *Bacterial metabolism*, 2nd ed., 152, Springer-Verlag, New York (1986).
12. S. Tanisho and Y. Ishiwata, *Int. J. Hydrogen Energy*, **20**, 541 (1995).
13. G. Sawers, *Antonie van Leeuwenhoek*, **66**, 57 (1994).
14. D. P. Clark, *FEMS Microbiol. Rev.*, **63**, 223 (1989).
15. J. Pinsent, *Biochem. J.*, **57**, 10 (1954).
16. H. Gest and H. D. Peck, Jr., *J. Bacteriol.*, **70**, 326 (1955).
17. S. Tanisho, N. Kamiya, and N. Wakao, *Biochim. Biophys. Acta.*, **973**, 1 (1989).
18. S. Tanisho and Y. Ishiwata, *Int. J. Hydrogen Energy*, **19**, 807 (1994).
19. J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis, *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed., 1, Cold Spring Harbor laboratory press, New York (1989).
20. F. Mat-Jan, Y. A. Kiswar, and D. P. Clark, *J. Bacteriol.*, **171**, 342 (1989).
21. D. W. Penfold, C. F. Forster, and L. E. Macaskie, *Enzyme Microb. Technol.*, **33**, 185 (2003).
22. A. M. Klibanov, B. N. Alberti, and S. E. Zale, *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 25 (1982).
23. T. Kurokawa and S. Tanisho, *Mar. Biotechnol.*, **7**, 112 (2005).