

수소 생성 광합성 세균 *Rhodobacter sphaeroides* KS 56 분리

이 은 숙* · 권 애 란

*경산대학교 한의예과, 서울대학교 약학대학

Isolation of Hydrogen Evolution Photosynthetic Bacteria *Rhodobacter sphaeroides* K56

Eun-Sook Lee* and Ae-Ran Kwon

* Department of Preparatory Oriental Medicine, Kyungsan University.

College of Pharmacy, Seoul National University.

Abstract

A purple non-sulfur photosynthetic bacteria which evolved molecular hydrogen efficiently from glucose in the presence of low concentration of NH_4^+ under light illuminated anaerobic condition was isolated from mud samples in Korea. This bacteria was identified on *Rhodobacter sphaeroides* K56 based on the morphological, cultural and physiological characteristics.

Key words : hydrogen evolution, photosynthetic bacteria, *Rhodobacter sphaeroides*.

서 론

광합성 세균은 모두 Rhodospirillales에 속하는 세균으로 gram 음성이며 운동성이 있는 것은 극모성 편모를 갖는다. 광합성 세균은 광합성 색소의 성질에 따라 자색 세균과 녹색 세균의 두 군으로 엄격히 구분된다.

1883년 Engelmann은 처음으로 광합성 세균을 발견하였고 Van Niel은 광합성 기작에 따라 이들을 기본적으로 분류하였다.

광합성 세균은 태양의 광에너지를 이용하여 이산화탄소를 유기물로 전환시키고 유기 폐자원으로부터 수소를 생성, 고갈되어 가고 있는 석유 에너지를 대체하고 있다.

광합성 세균의 일반조성은 단백질의 함량이 yeast, chlorella보다 높으며 아미노산 조성이 우수하기 때문에, 이때 생성되는 균체는 단세포 단백질의 형태로 고영양 식품이나 사료로 이용하고 있다^{1,2,3}. 본 실험은 자연계에서 분리한 여러 광합성 세균 중 특히 glucose를 기질로 하여 수소를 생성하는 균주를 선정, 동정하였다.

재료 및 방법

1. 광합성 세균의 분리

자연계의 수계혐기층에서 논흙, 진흙, 갯벌 등을 소량 채취하였으며 균 분리용 배지로는 Ormerod 기본배지⁴⁾를 사용하였다. 채취한 시료를 멸균된 생리식염수에 희석하여 Ormerod 액체배지가 들어있는 screw cap tube(17ml)에 접종해서 100W 전구 30cm거리에서 1주일간 정치배양한 후 붉은색 및 갈색을 형성하는 시험관을 선택한 후 이것을 seed로 하여 새로운 배지에 옮겨 배양하였으며, 이러한 배양을 2~3회 반복하여 광합성 세균만을 집적배양시켰다.

집적배양액을 Ormerod 고체배지에 현탁배양하여 단일 집락을 분리하고 고체배지에 천자배양하여 보존하였다.

2. 가스 발생균주의 선발

순수분리된 균주를 액체배양시킨 후 serum vial(40ml)에 액체배양액과 Ormerod 액체배지를 각각 5

ml씩 넣은 후 고무마개로 막고 Argon gas로 3분간 bubbling시켜 혐기상태로 만든 후 100W 백열등 아래 30cm거리에서 48시간 배양시킨 다음 gas chromatography로 수소 발생량을 측정하여 수소 생성이 좋은 균주를 선정하고, 5종의 탄소원(malate, lactate, acetate, glucose, starch)을 각각의 유일한 탄소원으로 한 액체배지에서 수소 생산성을 비교한 뒤 특히 glucose를 탄소원으로 한 곳에서 수소 생성이 가장 우수한 균주번호 KS56을 선발하고 이후 실험에 사용하였다.

3. 광합성 세균의 동정

균의 형태적, 생리적, 배양적 성질은 Handbook of Microbiology⁵⁾에 따라 실험하였고 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology(9th ed.)⁶⁾에 준하여 동정하였다.

Bacteriochlorophyll은 균체를 원심분리하여 회수한 다음 10mM 인산 완충용액(pH 7.0)으로 세척한 후 60% sucrose 용액에 현탁하여 Spectrophotometer (Shimadzu UV-260)로 scanning하였다⁷⁾.

광합성 세균은 빛을 고정하기 위한 색소를 갖고 있으며 이 색소는 carotenoid로서 그 종류에 따라 광합성 세균의 분류에 중요한 기준이 된다⁸⁾. Carotenoid의 추출을 위하여 균체를 냉동건조시켰다. 건조균체 0.1g에 benzene-diethyl ether(7:3) 30ml을 넣고 30분간 진탕하고 원심분리 및 감압 농축한 후 소량의 benzene에 용해시켜 TLC 시료로 사용하였다. TLC는 Kiesel gel G(Merk)를 사용하였으며, *n*-hexane-diethyl ether-acetone(8:2:11) 혼합용제를 전개용매로 사용하였고 분리되는 band는 acetone에 용출시킨 후 Spectrophotometer로 scanning하여 표준 carotenoid와 비교하였다.

4. 배양적 성질

분리 광합성 세균에 의한 유기물질 및 전자공여체의 이용성을 조사하기 위하여 Ormerod 기본 배지를 약간 변형하여 사용하였다. 즉, yeast extract를 빼고 질소원으로 glutamate(7mM)을 사용하였으며 탄수화물 및 유허화합물은 별도로 멸균한 다음 각각 30mM씩 되게 첨가하여 배양하였다.

생육인자의 요구성을 조사하기 위하여 Ormerod 기본배지에서 배양한 균체를 원심분리하여 회수하고 멸균된 생리식염수로 5회 세척해서 균체에 잔존하는 유기물 및 yeast extract를 완전히 제거하고 다시 생리식염수에 현탁시켰다. 현탁액 일정량(0.5ml)을 yeast extract를 제외한 Ormerod 기본배지(10ml)에 접종하고

미리 준비해둔 비타민을 첨가한 뒤 5일간 광합성 조건에서 배양하여 균의 증식을 비타민을 첨가하지 않은 대조구와 비교하였다.

결과 및 고찰

1. 광합성 세균의 분리 및 선정

자연계의 수계혐기층에서 시료를 50점 채취하여 Ormerod 액체배지를 사용하여 집적배양한 후 단일 집락을 순수분리하였다. 분리된 균주를 진자배양하였을 때 가스 생성으로 인하여 기포가 생성되는 균주 214주를 1차 선정하고 이들을 다시 액체배양시켜 발생되는 가스를 chromatography로 측정하여 수소 생성이 좋은 균주 32주를 2차 분리하고 이 균주들을 다시 glucose, malate, starch, acetate, lactate등 5개의 탄소원을 전자공여체로 하였을 때 glucose로부터 수소생성이 가장 우수한 균주 KS56을 최종 선정하였다.

2. 균주의 동정

1) 형태적 생리적 특성

분리균주 KS56은 현미경 관찰결과 ovoid(1.0~1.25 × 1.25~1.50 μ m)이며 binary fission으로 증식하였고, 포자를 형성하지 않으며 단극모를 갖고 있었고, Gram 음성으로 광합성 세균의 일반적 특성을 가지고 있었다. 혐기조건일 때 명상태에서 진한 갈색 및 붉은색을 띄었고, 균의 증식이 좋았으나 암상태에서는 색조형성이 없으며 증식이 좋지 않았다. 호기조건일 때는 명·암상태에서 모두 증식하며 연한 분홍색을 나타내었다. Gelatin은 분해시키지 못하였고 starch는 분해시켰다. 질산 환원력이 있었고, cysteine에서 H₂S를 발생시키지 못했으며 운동성이 있었고 catalase 및 hydrogenase는 양성이었다. 균체를 원심분리한 후 60% sucrose용액에 현탁시켜서 spectrophotometer에서 scanning하였을 때 376.5, 594.5, 805, 860nm에서 최대 흡광도를 나타내어 bacteriochlorophyll a가 생성됨을 알 수 있었다.

이상의 결과를 정리하면 Table 1과 같다.

2) 생육인자의 요구성

Ormerod 액체배지에서 yeast extract 대신에 다른 종류의 vitamin을 첨가한 것과 첨가하지 않은 대조군 모두에서 균의 증식이 일어났으며 큰 차이를 보이지 않았다. 따라서 본 균주는 생육인자를 요구하지 않는 것으로 나타났다(Table 2).

Table 1. Major characteristics of the selected strain of photosynthetic bacteria *Rhodobacter sphaeroides* KS56

Morphology	
size	1.0~1.25×1.25~1.50 μ m
shape	ovoid
flagella	uni-polar flagella
mode of division	binary fission
Growth and color	
anaerobic, light	good growth dark brown to purple
anaerobic, dark	poor growth colorless
aerobic, light	good growth pale pink
aerobic, dark	good growth pale pink
Gram staining	negative
Motility	positive
Gelatin liquefaction	negative
Starch hydrolysis	positive
Casein utilization	negative
Nitrate reduction	positive
H ₂ S formation	negative
Catalase	positive
Hydrogenase	positive
Bacteriochlorophyll	a (376.5, 594.5, 805, 860nm)
Growth factor requirement	negative
Reduced sulfur compound utilization	negative
Hydrogen evolution	positive
Acetylene reduction	positive

Table 2. Effect of vitamins on the growth of *Rhodobacter sphaeroides* KS56

Vitamin	Concentration	Cell growth (O.D. 660)
Biotin	20 μ g /ml	0.61
<i>p</i> -Aminobenzoic acid	200 μ g /ml	0.60
Pantothenic acid	200 μ g /ml	0.68
Nicotinic acid	1 mg /ml	0.84
Thiamin	1 mg /ml	0.60
Control		0.57

3) Carotenoid 조성

본 균주의 carotenoid 조성을 알기 위해 TLC에 의하여 전개한 후 분리되는 band를 모아서 가시영역의 흡수파장을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 주된 carotenoid는 spheroidene이었으며 OH-spheroidenon과 demethylated spheroidene도 검출되었다. 따라서 본 균주의 carotenoid 생합성경로는 ketocarotenoid pathway⁸⁾를 갖는 것으로 나타났다.

4) 유기물 및 전자공여체 이용성

본 균주는 TCA cycle의 중간대사산물인 유기산들을 이용하여 증식할 수 있었으며 또한 당류들도 이용할 수 있었다. Vitamin-free casamino acid에서 증식하는 것으로 보아 vitamin을 요구하지 않음을 알 수 있었으

Table 3. Identification of carotenoids of *Rhodobacter sphaeroides* KS56

Rf value	Absorption maxima (nm)			Content	Identification
0.91	428.5	456	487	+++	Spheroidene
0.38	454	488.5	512	+	OH-Spheroidenone
0.33	433	487.5	558.5	+	Demethylated spheroidene

Table 4. Photosynthetic electron donors and carbon sources utilized by *Rhodobacter sphaeroides* KS56

Carbon and electron donors	Growth	Carbon and electron donors	Growth
Acetate	+	Sorbitol	+
Citrate	+	Mannitol	+
Fumalate	+	Starch	+
Lactate	+	Casamino acid	+
Malate	+	Yeast extract (100mg /l)	+
Malonate	+	Thiosulfate	-
Propionate	+	Sulfate	-
α -Ketoglutarate	+	Maleic acid	-
Succinate	+	Benzoate	-
Tartarate	±	Glycerol	+
Gluconate	+	Ethanol	+
Fructose	+	Methanol	±
Glucose	+	Propionate	
Pyruvate	+		

Unless otherwise stated substrates were added to a concentration of 30mM each.

+ : Growth, - : No growth, ± : Scant or no growth.

며, 유황화합물인 thiosulfate나 sulfate를 이용하지 못하는 것으로 보아 non-sulfur bacteria임을 알 수 있었다(Table 4).

이상의 결과를 종합하면 본 균주는 유기물 존재하에서 광합성 색소를 형성하면서 왕성히 생육하나 유황화합물을 전자공여체로 이용하지 못하므로 non-sulfur purple bacteria인 Rhodospirillaceae에 속한다. Carotenoid 생합성 경로에서 spheroidene이 주된 성분으로서 Group 2의 ketocarotenoid pathway를 갖는 것으로 보이며, 형태적으로 ovoid이면서 binary fission으로 증식하는 것으로 보아 *Rhodobacter* sp.로 분류되어야 한다. 본 균주는 광범위한 탄소원의 이용성으로부터 판단하여 *Rhodobacter sphaeroides*로 동정하였고 균주 분리번호 KS56을 붙여 명명하였다

요 약

혐기성 광조건의 낮은 농도의 NH_4^+ 존재하에서 포도당으로부터 많은 양의 수소를 생성하는 홍색 비유황 광합성 세균을 수계혐기층으로부터 분리하였다.

이 세균은 형태적, 배양적, 생리적 특성에 따라 *Rhodobacter sphaeroides* KS56으로 동정되었다.

참고문헌

1. 金森正雄 : 光合成細菌の菌體成分, 發酵と工業, 36, 934 (1978).
2. Kobayashi, M. : *Bull. Japanese Soc. Sc. Fisheries*, 33, 657 (1967).
3. Kobayashi, M., Tchan, Y. T. : *Water Research (England)*, 7, 1219 (1973).
4. Ormerod, J. G., Ormerod, K. S. and Gest, H. : *Arch. Biochim. Biophys.*, 94, 449 (1961).
5. Lechvlier, L. : *Handbook of Microbiology*, Vol. 1, CRC press (1974).
6. Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E. : *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (9th ed.), The Williams & Wilkins Company, Baltimore (1994).
7. Pfenning, N. : *Ann. Rev. Microbiol.*, 21, 285 (1967).
8. Jensen, S. L. : "Biochemistry of Chloroplasts" vol. 1. ed. by Goodwin, T. W., Academic press Inc. London and New York, P. 437 (1966).
9. P. Gerhard : *Manual of methods for general bacteriology*, 26 (1981).

(1997년 10월 27일 접수)