

광합성 홍색 유황 세균 *Thiocapsa roseopersicina*에 의한 수소생산 최적화

*,**김 미선¹⁾, 이 유진²⁾, 이 동열³⁾

Optimization of photobiological H₂ production using *Thiocapsa roseopersicina*

*,**Mi-sun Kim, Yu-jin Lee, Dong-yeol Lee

Key words :Phototrophic purple sulfur bacterium(광합성 홍색 유황세균), *Thiocapsa roseopersicina*(광합성 홍색 유황세균), growth condition(성장조건), photobiological H₂ production(광합성 생물학적 수소생산), Hydrogenase(수소생산효소)

Abstract: *Thiocapsa roseopersicina* NCIB 8347은 purple sulfur bacteria이며 광합성종속영양 조건에서는 nitrogenase 효소계가 유도되어 질소를 고정하며, 수소를 발생한다. 또한 광합성독립영양 조건에서는 hydrogenase 효소계가 유도되어 3~4개 종류의 특성이 다른 hydrogenase가 membrane에 결합되어 있거나, cytoplasm에 존재하며, 이 중의 일부는 산소농도와 온도의 상승에도 비교적 안정하다. 본 연구에서는 *T. roseopersicina* NCIB 8347이 광합성종속영양 조건에서 수소를 생산할 수 있는 제반 배양조건을 최적화하고, nitrogenase와 일부 hydrogenase역가를 측정하여 purple non-sulfur bacteria, *Rhodobacter sphaeroides* KD131의 nitrogenase와 비교하여 수소생산을 최적화하였다. 할로겐램프를 8-9 Klux/m²로 조사할 때와 배양온도 26-30°C, 배양시간 72시간에서 균체 성장과 수소생산이 가장 높았다. *T. roseopersicina* NCIB 8347는 광합성 독립영양, 종속영양 조건에서 모두 성장 할 수 있었다.

1. 서론

미생물을 이용한 수소생산 기술은 화석연료의 문제점을 극복할 수 있는 청정에너지로써 주목받고 있다¹⁻³⁾. 지구상에 존재하는 많은 미생물은 세포내에 존재하는 수소생산효소를 이용한 수소생산/소비를 통해 에너지 대사를 조절하고 있으며 그 외에도 다양한 역할이 알려져 있다⁴⁾. 미생물에 존재하며 생물학적 수소생산에 관여하는 수소생산효소는 열이나 산소에 의해 쉽게 활성을 잃기 때문에 수소생산 공정에 적용할 때 혐기 상태를 유지해야 하며 미생물 생육에 적절한 온도를 유지해야 한다⁵⁾. 최근에 분리된 광합성 홍색 유황세균인 *Thiocapsa roseopersicina*가 생산하는 수소생산효소는 그 활성 중심에 니켈, 철과 같은 금속이온을 갖고 있으며, 세포막에 2개의 세포막결합(membrane-bound) 수소생산·소비효소 및 세포질에 수소감지효소 및 soluble 수소생산효소

등 총 4종류의 효소가 존재한다. 이 중 세포질 내에 존재하는 soluble 수소생산효소는 산화 환원 전위에 따라 생산과 소비를 동시에 할 수 있는 membrane-bound 수소생산효소와는 달리 주로 수소생산을 한다고 보고되어 있다⁶⁾. 또한 이 효소는 고온성 균주에서 분리한 효소와 같은 내열성을 갖고 있으며 산소, 단백질 분해 효소, 계면활성제 등 효소 활성에 치명적 저해요소가 되는 것들에 강한 내성을 갖고 있다고 알려져 있으나 세포질 내부에 존재하고 있어서 분리 정제에 관한 연구 사례가 제한되어 있다^{7,8)}.

*T. roseopersicina*가 생산하는 수소생산효소

- 1) 한국에너지기술연구원
E-mail : bmmskim@kier.re.kr
Tel : (042)860-3554 Fax : (042)860-3739
- 2) 한국에너지기술연구원
E-mail : dohwoa82@kier.re.kr
Tel : (042)860-3556 Fax : (042)860-3739
- 3) National Institute for Environmental Studies
E-mail : lee.dongyeol@nies.go.jp
Tel : 81-290-850-2725

가 갖고 있는 강한 내열성과 산소 내성과 같은 장점은 생물학적 촉매제를 이용하는 생물학적 수소 생산 기술에 있어서 중요한 가치를 지니고 있다고 사료되어 산업적 연구가치가 있는 수소생산 효소를 좀 더 빠르고 수소생산 활성을 가능한 유지하면서 대량생산하는 기술은 수소생산을 상용화할 수 있는 지름길로 여겨진다.

본 연구에서는 효율적인 수소생산을 위한 기초 연구로 광원 및 광도, 배양온도, 다양한 탄소원, 질소원 및 미네랄이 수소생산효소와 질소고정효소에 미치는 영향을 검토하고 균주의 성장과 수소생산을 최적화하는 연구를 수행하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 배지와 성장 조건

2.2.1 시료

사용한 균주는 광합성 홍색유황세균인 *T. roseopersicina* NCIB 8347이다. 이 균주를 Pfennig's 배지⁸⁾에 접종하고 할로겐램프를 8-9 Klux/m²로 조사하면서 25°C에서 CO₂(2±0.5%)를 함유한 N₂를 200 ml/min의 속도로 공급하여 광합성 독립영양 조건으로 배양하였다.

T. roseopersicina NCIB 8347 균체를 다량 배양하여 수소생산효소를 분리하기 위하여 다음과 같이 연속적으로 배지를 첨가하면서 배양하였다. 즉, 초기 균체 농도를 660 nm에서 흡광도가 0.7이 되도록 Pfennig's 배지에 접종하고, 24시간 광합성 배양 후 0.05% acetate, 6 mM ammonium chloride와 각종 trace elements(Na₂EDTA 8 μM, FeSO₄·7H₂O 4 μM, CoCl₂·6H₂O 0.7 μM, MnCl₂·4H₂O 0.3 μM, ZnCl₂ 0.3 μM, NiCl₂·6H₂O 0.1 μM, Na₂MoO₄·2H₂O 0.07 μM, H₃BO₃ 5 μM, CuCl₂·2H₂O 0.01 μM)를 첨가하였다. 이와 같이 반연속적으로 배지를 첨가하여 약 96시간 배양하고, 균체 농도가 660 nm에서 흡광도 약 3.0일 때 수확하였다.

2.2.2 수소생산효소 및 질소고정효소 역가측정

5 ml vacuum vial에 1.3 ml의 50 mM PIPES buffer(pH 7.0)와 2.5 mM methyl viologen, 수소생산효소를 넣어 섞고, 10분 동안 50°C water bath에서 미리 온도적응 시킨 후 0.2 ml의 230 mM sodium dithionite를 넣어 반응을 시작하였다. 이때 희석은 50 mM PIPES buffer(pH 7.0)로 하였고, 반응은 질소가스로 치환한 후 혐기 조건하에서 이루어졌다. 반응시작 후 10분 간격으로 40분 동안 가스 크로마토그래피로 측정하여 생성된 수소의 양을 측정하였다. 효소 활성 1 Unit은 분당 1

μmol의 수소가 생산되는 양으로 정하고, 효소 비활성도는 U/mg-protein으로 정하였다. 단백질 농도는 bovine serum albumin을 표준시료로 하여 Lowry 법을 이용하여 측정하였다⁹⁾.

2.2.3 pH와 온도

Hydrogenase의 활성최적 pH를 위한 역가측정을 50 mM PIPES buffer를 사용하여 50°C에서 측정하였다. 역가 측정을 위한 최적온도는 40-80°C이었다.

2.2.4 수소함량 분석

수소 함량은 배양기내의 head space 가스를 gas-tight micro-syringe로 100 μl를 채취하여 Gas Chromatography(shimadzu 14-B)로 분석하였으며 사용한 column은 molecular sieve 5A(Supel. Inc.)를 충전한 column이고 TCD로 수소를 검출하였다. 분석 온도는 column 80°C, injector 100°C, detector 120°C이었으며, flow rate는 35 ml/min으로 Ar을 carrier가스로 사용하였다.

2.2.5 유기산 분석

유기산은 균체와 상등액을 분리한 후 상등액 20 μl를 유기산 분석용 column인 Aminex HPX-87H를 장착한 HPLC(Shimadzu LC-10AT)로 실온에서 분석하였으며, 각종 유기산 농도와 종류는 0.01 N H₂SO₄를 이동상으로 하여 flow rate 0.6 ml/min로 용출하여 UV detector의 파장 210 nm에서 측정하였다.

2.2.5 건조 균체량 측정

균체농도는 일정시간 간격으로 채취한 발효액을 UV-visible spectrophotometer (Shimadzu UV1)로 파장 660 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 건조균체량은 전자식 수분 측정기(Precisa HA300)를 이용하여 5 ml 배양액을 105°C에서 20분간 건조 후 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 광원 및 광도 영향

황화합물로부터 전자를 받아서 수소를 생산하는 광합성 세균인 *T. roseopersicina* NCIB 8347은 heterotrophic 배양조건에서 할로겐램프와 형광램프를 조사하면서 배양할 때 균체는 48시간 동안 2.5~10 Klux/m²으로 조사한 빛에서 유사한 성장속도를 보였으나, 수소 생산율은 할로겐램프를 이용

할 때가 높았다. 이와 같은 현상은 purple bacteria에서 일반적으로 발생하는 현상으로 bacteriochlorophage1(Bchl.)의 흡수과장이 800 nm 이상에 존재하기 때문이다. 그리고 할로겐램프는 형광램프보다 발생하는 빛의 스펙트럼이 장파장에 다량 존재하는 반면, 형광램프는 단파장의 스펙트럼을 갖는다. 할로겐램프를 10 Klux이상 또는 72시간이상 배양할 경우 균체의 성장이 약간 저하되었으며, 약 2.5 Klux/m²이상에서는 균체가 잘 자라지 않았다. *T. roseopersicina* NCIB 8347은 할로겐램프를 8-9 Klux로 조사하면서 72시간 배양할 때 가장 좋은 균체성장과 수소생산율을 나타내었다.

3.2 배양 온도 영향

*T. roseopersicina*는 중온성 균주이며 생육조건이 배양온도 25 °C에서 anaerobic 조건으로 light를 줄때 성장하는 것으로 알려져 있으나 본 실험에서는 빛에 대한 영향과 아울러 최적온도를 15°C~37°C에서 실험하였다(Table 1). 15°C에서 배양할 때 균체는 26°C~30°C에서 성장할 때 균체량의 약 50%에 불과하며, 수소도 발생되지 않았다. 또한 배양 72시간동안 26°C~30°C에서 succinate가 99%이상 분해되었으나, 15°C에서는 약 30%만이 분해되었다. 이 실험 결과 최적배양 및 수소발생온도는 30°C에서 48-72시간 배양이 최적조건으로 검토되었다.

Table 1. Effect of temperature on the growth characteristics and H₂ production of *T. roseopersicina* NCIB 8347 during photo-fermentation.

(A) 48 hr

Temp.(°C)	15	26	30	37
pH	8.63	7.89 ± 0.015	7.91 ± 0.050	7.82 ± 0.020
dcw* (g/L)	0.932	1.716 ± 0.022	1.691 ± 0.016	1.440 ± 0.013
ml H ₂ /mg-dcw	0	1.117 ± 0.009	1.074 ± 0.109	1.131 ± 0.001
Succinate 분해율(%)	0.41	72.55 ± 13.36	35.85 ± 3.66	53.05 ± 0.26

(B) 72 hr

Temp.(°C)	15	26	30	37
pH	8.63	7.76 ± 0.075	7.79 ± 0.040	7.73 ± 0.020
dcw* (g/L)	0.881	1.179 ± 0.180	1.672 ± 0.123	1.714 ± 0.069
ml H ₂ /mg-dcw*	0.011	1.736 ± 0.016	1.336 ± 0.100	1.246 ± 0.114
Succinate 분해율(%)	32.04	99.26 ± 0.610	98.72 ± 1.010	99.79 ± 0.005

*dcw : dried cell weight

3.3 *T. roseopersicina* NCIB 8347 growth curve

3.2.1 광합성종속영양 성장

30°C 배양온도에서 할로겐램프로 8-9 Klux/m²를 조사하면서 광합성종속영양 조건으로 배양할 때 *T. roseopersicina* NCIB 8347은 figure 1과 같은 성장과 수소생산을 보였다. 첨가한 succinate는 배양 초기부터 분해되기 시작하여 약 48-50시간에 모두 소비되었다. 초기 pH 7.0은 배양 15-18시간까지 pH 9로 증가하다가 점점 저하하여 32시간까지 pH 8.1-8.2로 내려갔고 이후는 계속 유지되었다. 균체는 초기부터 성장하여 배양 22-24시간에 최대로 성장하였고, 수소는 성장대수기 중간인 18시간부터 발생하여 succinate가 소비되는 45시간까지 발생하였고, 그 이후는 더 이상 생산되지 않았다. 배양 55시간까지는 생산된 수소가 감소되는 현상은 보이지 않았다.

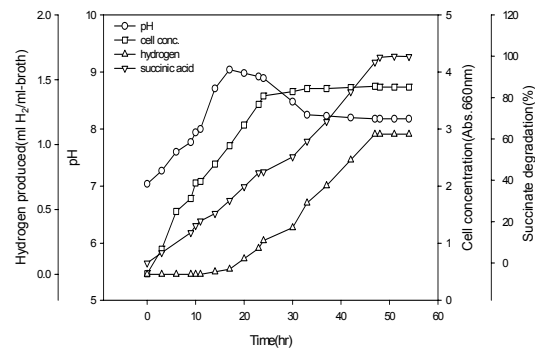


Figure 1. Growth curve of *T. roseopersicina* NCIB 8347 during photo fermentation under the anaerobic condition using synthetic media containing succinic acid and Na₂S

3.2.2 광합성독립영양 성장

T. roseopersicina NCIB 8347과 같은 유황성분을 전자 공여체로 이용하는 세균은 광합성종속영양 조건에서도 대사를 할 수 있고, 또한 광합성독립영양 대사를 가져서 공기 중 이산화탄소를 이용할 수 있었다. 100시간 동안 배양하여 균체는 2 g-dcw/L까지 상승하였고 단백질은 10.5 mg/L정도였지만 수소생산효소 specific evolution H₂ase activity는 배양 22시간일 때 가장 높았다.

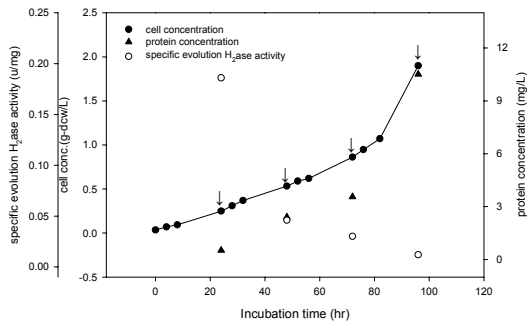
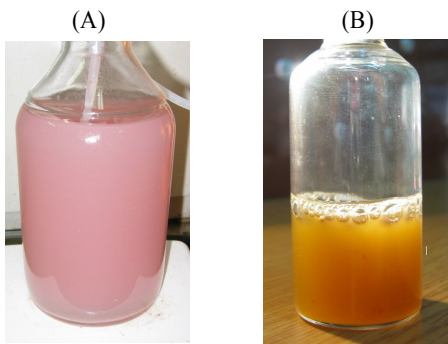


Figure 2. Effect of acetate on cell growth of *T. roseopersicina* during photo-autotrophic cultivation and its evolution H₂ase activity. (↓ acetate added(0.05%))



Picture 1. Comparison of photo-autotrophic (A) and -heterotrophic (B) culture conditions of *T. roseopersicina* NCIB 8347 on their growth

3.4 탄소원의 영향

T. roseopersicina NCIB 8347과 같은 유황성 분을 전자 공여체로 이용하는 세균은 전술한 바와 같이 광합성중속영양 조건에서도 대사를 할 수 있고, 또한 광합성독립영양 대사를 가져서 공기 중 이산화탄소를 이용할 수 있지만, 광합성중속영양 조건에서 이용할 수 있는 유기물의 범위는 제한되어 있다. 본 실험에서 이용한 *T. roseopersicina* NCIB 8347은 Na₂S로 황 화합물을 공급할 때 succinate와 lactate를 탄소원으로 이용하여 균체가 성장할 수 있으나 succinate가 수소 생산에 좋은 기질이였으며 이때 수소생산성은 33 mM succinate를 포함하는 합성 배지에서 2.5~2.8 ml H₂/ml-배양액이었다(Table 2). 이는 1 mol succinate로부터 최대 6 mol H₂가 발생할 수 있다고 가정할 때 약 56~63% 전환율에 해당한다. Acetate를 이용하여 균체는 성장하였고 배양 24시간 후에 첨가된 acetate의 약 80%가 분해되었으나 배양액이 pH 10이상 상승하여 수소생산을 나타내지 않았다. 그러나 이 균주는 formate, DL-malate, butyrate는 탄소원으로 이용하지 않았다.

Table 2. Effect of organic acids and Na₂S on H₂ production and cell growth by *T. roseopersicina* NCIB 8347 at 48hr of photo-heterotrophic incubation

Organic acids	Na ₂ S	pH	dcw*(g/L)	ml H ₂ /mg-dcw	organic acid 분해율(%)
Succinate	+	7.90	1.366	1.359	92.32
	-	7.78	1.396	1.341	88.82
Malate	+	8.04	1.486	0.843	96.21
	-	7.82	1.348	0.931	96.08
Lactate	+	7.91	1.793	0.215	95.35
	-	7.78	1.869	0.176	94.05
Sodium -acetate	+	10.92	1.477	0	97.35
	-	10.44	1.217	0	99.28
butyrate	+	7.03	0.354	0	3.372

*dcw : dried cell weight

3.5 질소원 및 미네랄의 영향

광합성 미생물 배양을 위한 합성 배지로 종종 사용되는 sistrom 및 GL 배지를 이용하여 *T. roseopersicina* NCIB 8347을 배양하였다. 이 균주는 succinate를 주요 탄소원으로 이용하고, (NH₄)₂SO₄, aspartate 및 nitriloacetate를 일부 질소원으로 사용하는 sistrom 배지에서 균체 성장 및 수소생산이 좋은 반면, lactate와 L-glutamate를 각각 탄소원과 질소원으로 첨가한 배지에서는 수소생산성이 저하하였다(Table 3).

Table 3. Comparison of synthetic culture media on H₂ production by *T. roseopersicina* during photo fermentation

Culture media	Time (hr)	Organic acids(mM)	Nitrogen sources (mM)	organic acids 분해율(%)
Sistrom	48		(NH ₄) ₂ SO ₄ (3.78)	69.53
	72	Succinate (33.87)	Aspartate (0.30) Nitrilotriacetate (1.05)	98.83
GL	48	Lactate (70)	Glutamate (10)	19.48
	72			32.12

Culture media	pH	Cell growth (Abs. 660nm)	H ₂	
			ml H ₂ /ml-배양액	%
Sistrom	7.74	3.563	2.29	61.93
	7.70	2.472	2.93	68.33
GL	7.70	2.773	0.96	35.89
	7.47	2.999	1.27	43.99

3.6 *T. roseopersicina* NCIB 8347 유래 nitrogenase의 활성

T. roseopersicina NCIB 8347이 sistrom 배지에서 최적조건으로 성장할 때 수소생산에 직접 관여하는 nitrogenase 역가는 배양시간이 경과함에

따라 배양 72시간까지 증가하였다(Table 4).

Table 4. Nitrogenase activity of *T. roseopersicina* NCIB 8347

culture time (hr)	Dry cell weight (g/L)	gas 축적량 (ml)	H ₂ (%)	ml H ₂ /ml-bro th	Nitrogenase activity (10-3 μmol C ₂ H ₄ /min · mg of dcw)
24	1.6739	20	8.67	0.217	1.493
48	2.4737	43	55.95	2.034	1.738
72	2.1259	47	58.07	2.236	2.399

4. 결론

- 1) *T. roseopersicina* NCIB 8347은 할로겐램프를 8-9 Klux로 조사하면서 72시간 배양할 때 가장 좋은 균체 성장과 수소생산율을 나타내었으며 최적 수소 생산 온도 및 시간은 30°C, 48~72시간 이었다.
- 2) 광합성종속영양조건에서 *T. roseopersicina* NCIB 8347은 succinate를 50시간 동안 모두 소비하였고 이때 발생한 수소량은 1.2 ml H₂/ml 배양액이다.
- 3) 광합성독립영양조건에서 *T. roseopersicina* NCIB 8347의 specific evolution H₂ase activity는 22시간 배양에서 0.17 μmol H₂/mg-protein이었다.
- 4) *T. roseopersicina* NCIB 8347은 succinate와 lactate를 탄소원으로 이용하여 균체가 성장할 수 있었고 수소생산성은 33 mM succinate를 포함하는 합성 배지에서 2.5-2.8 ml H₂/ ml배양액으로 약 56-63% 전환율에 해당한다.
- 5) *T. roseopersicina* NCIB 8347이 sistrom 배지에서 최적조건으로 성장할 때 nitrogenase 역가는 배양 72시간까지 증가하였다.

후 기

이 연구(논문)는 교육과학기술부의 지원으로 수행하는 21세기 프론티어연구개발사업(수소에너지사업단)의 일환으로 수행되었습니다.

References

- [1] D. B. Levin, L. Pitt, and M. Love, 2004, "Biohydrogen production:prospects and limitations to practical application", Int. J. Hydrogen Energy, Vol. 29, pp. 173-185
- [2] J. Benemann, 1996, "Hydrogen biotechnology : progress and prospects", Nature Biotechnology, Vol. 14, pp. 1101-1106
- [3] P. F. Weaver, S. Lien and M. Seibert, 1973, "Photobiological production of hydrogen", J. Solar

Energy, Vol. 24, pp. 3-45

- [4] O.A. Zadvorny, N.A. Zorin and I. N. Gogotov, 2000, "Influence of metal ions on hydrogen from the purple sulfur bacterium *Thiocapsa roseopersicina*", Biochemistry (Moscow), Vol. 65, pp. 1525-1529
- [5] J. Schnackenberg, M. Miyake, J. Miyake, N. A. Zorin, and Y. Asada, 1999, "In vitro and vivo coupling of *Thiocapsa* hydrogenase with cyanobacterial and algal electron mediators", J. Bioscience and Bioengineering, Vol. 88, pp. 30-34.
- [6] G. Rakhely, A. T. Kovacs, G. Maroti, B. D. Fodor, G. Csanadi, D. Latinovics, and K. L. Kovacs, 2004, "Cyanobacterial-type, heteropentameric, NAD⁺-reducing NiFe hydrogenase bacterium *Thiocapsa roseopersicina*", Appl. and Environ. Microbiol., Vol. 70, pp. 722-728.
- [7] K. L. Kovacs and C. Bagyinka, "Structural properties functional states and physiological roles of hydrogenase in photosynthetic bacteria", FEMS Microbiol. Rev, Vol. 87, pp. 407-412.
- [8] N. A. Zorin, O. N. Pashkova, and I. N. Gogotov, 1995, "Isolation and characterization of two form of hydrogenase from *Thiocapsa roseopersicina*", Biochemistry (Moscow), Vol. 60, pp. 379-384
- [9] E. H. Choi, Y. K. oh and M. S. Kim, 2006, "Purification of hydrogenase from *T. roseopersicina*: effect of ammonium sulfate precipitation and heat-treatment", Trans. of the Korean Hydrogen and New Energy Society, Vol. 17, pp. 371-378