

# 光合成細菌에 의한 水素 生産에 관한 연구 (제 1 보) 光合成菌의 分離 및 同定

裴 武, 梁成雨, 高永熹,  
한국과학기술원 응용미생물연구실  
(1982년 1월 20일 수리)

## Studies on Hydrogen Evolution by Photosynthetic Bacteria

### (Part 1) Isolation and Identification of the Photosynthetic Bacteria

**Moo Bae, Sung Woo Yang and Yung H. Kho**

Applied Microbiology Laboratory,  
Korea Advanced Institute of Science and Technology,  
P.O. Box 131, Dongdaemun, Seoul, Korea  
(Received January 20, 1982)

#### Abstract

Many microorganisms capable of hydrogen photoproduction were isolated from samples of mud flats of paddy field collected in Seongnam area near Seoul. Among the 63 isolants, a strain K-13 was selected for the capability of hydrogen evolution. As the results of examinations in physiological, morphological and cultural characteristics, the strain K-13 was identified as *Rhodospseudomonas gelatinosa*.

#### 서 론

태양에너지를 고정하여 인간생활에 이용하려는 노력은 많은 분야에 걸쳐 이루어져 왔으며 특히 최근 화석에너지가 고갈되어 감에 따라 더욱 많은 관심이 집중되고 있다. 광합성세균에 관한 연구도 태양에너지를 이용하는 것으로서 광합성세균은 유기폐수처리에 이용되고<sup>(1,2)</sup> 균체는 단백질, 색소 및 생리활성물질의 給源이 되며<sup>(3-10)</sup> 발생하는 水素는 대체에너지화 하고 있다. 光合成細菌이 光에 의존하여 水素를 發生하는 것은 1949년 Gest와 Kamen<sup>(11)</sup>에 의하여 발

견된 이래 水素發生의 기작이 糾明되고 최근에 와서 활발한 연구가 이루어지고 있다.<sup>(12-20)</sup>

본 연구에서는 경기도 성남근교의 논토양에서 수소발생능이 왕성한 균주를 분리하고 이 균주의 미생물적 특성을 조석하여 동정하였는바 그 결과를 보고한다.

#### 실험재료 및 방법

##### 光合成細菌의 분리

菌 分離源으로 서울, 성남, 인천 근교의 논, 호수, 바다 등의 水界嫌氣層에서 시료 77점을 취

하였다. 균 분리용 배지는 van Niel에 의한 Table 1과 같은 조성의 photosynthetic non-sulfur bacteria 분리용 배지를 사용하였다.<sup>(21)</sup> 시료를 멸균생리식염수로 희석하여 van Nial 배지가 든 cap tube에 접종하고 200 W의 백열등 아래 30 cm 거리에서 30°C를 유지하면서 1주일간 배양시킨 후 붉은 색 또는 갈색을 형성한 것을 다시 2~3회 enrichment culture를 실시하였다. 다음 Roux culture bottle에 한천 1.5%를 함유한 van Niel 배지를 넣고 멸균 후 얇게 평판을 만들고 enrichment culture한 배양액을 희석하고 도달한 뒤 아르곤가스로 공기를 치환하여 혐기상태로 하였다. 이것을 200 W 백열등 아래 30 cm에서 30°C로 1주일간 배양한 후 형성되는 붉은 색 또는 갈색의 colony를 分離하여 Van Niel 배지에 보존하였다.

**Table 1. Analytical Condition of Gas Chromatograph for Hydrogen Gas**

|                   |                                       |
|-------------------|---------------------------------------|
| Column            | Molecular sieve 5A<br>(2m x 1/8 inch) |
| Detector          | Thermal conductive detector           |
| Column temp.      | 80°C                                  |
| Detector temp.    | 120°C                                 |
| Filament temp.    | 290°C                                 |
| Carrier gas       | Argon                                 |
| Flow rate         | 20 ml/min.                            |
| Gas chromatograph | Varian Model 3700                     |

#### 菌株의 선정

수소발생용 배지는 Table 2와 같은 조성의 Ormerod<sup>(22)</sup>의 배지를 사용하였다.

1차선발은 Ormerod 배지에 한천 0.2%를 첨가하여 cap tube에 반유동배지를 만든 후 순수분리된 균을 1백금이 접종하여 분리방법에서와 같은 방법으로 1주일 동안 배양하였으며 기포의 밀생을 나타내는 균을 선발하였다. 1차선발된 균을 Hillmer<sup>(13)</sup>에 의하여 고안된 syringe를 배양용기로 하여 gas의 발생량을 정량적으로 측정하였으며 syringe에 포집된 gas를 gas chromatography에 의하여 분석하고 가장 수소발생량이 많은 균주를 선정하였다.

**Table 2. Medium Composition for Isolation of Photosynthetic Non-Sulfur Bacteria**

|   |         |
|---|---------|
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                 | 2.0 (g) |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O            | 0.2     |
| NaCl  | 2.0     |
| NaHCO <sub>3</sub>                              | 5.0     |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 2.0     |
| Yeast ext.                                      | 0.1     |
| Organic substrate*                              | 2.5     |
| Tap water                                       | 11      |
| pH (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ) 7.0        |         |

\* Lactate, malate, succinate

#### 수소 gas의 정량분석

포집된 gas의 분석을 위한 gas chromatograph의 조건은 Table 3과 같으며 이러한 조건에서 분석하였을 때 retention time에 따른 표준 gas의 분석결과는 Fig. 1과 같다.

#### 菌株의 同定

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (8th ed.)<sup>(23)</sup> 및 Handbook of Microbiology에 준하여 동정하였으며 별도의 설명이 없는 한 배지는 Ormerod 배지를 사용하였다. Gram staining은 Hucker 변법<sup>(25)</sup>으로 염색하여 현미경 관찰하였고 운동성 유무는 한천 0.2% 함유한 cap tube에 stab culture하여 조사하였다. Gel-

**Table 3. Basal Medium for Hydrogen Evolution**

|                                      |          |
|--------------------------------------|----------|
| NgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 200 (mg) |
| CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O | 75       |
| FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 12       |
| EDTA                                 | 20       |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>      | 900      |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      | 600      |
| Trace elements soln*                 | 1 ml     |
| Lactate                              | 30 mM    |
| Glutamate                            | 7 mM     |
| Yeast ext.                           | 300 mg   |
| Distilled water                      | 1        |
| pH (NaOH) 6.8                        |          |

\* MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 2.1 g, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 2.8 g, Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O 40 mg, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 40 mg, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 750 mg, H<sub>2</sub>O 11

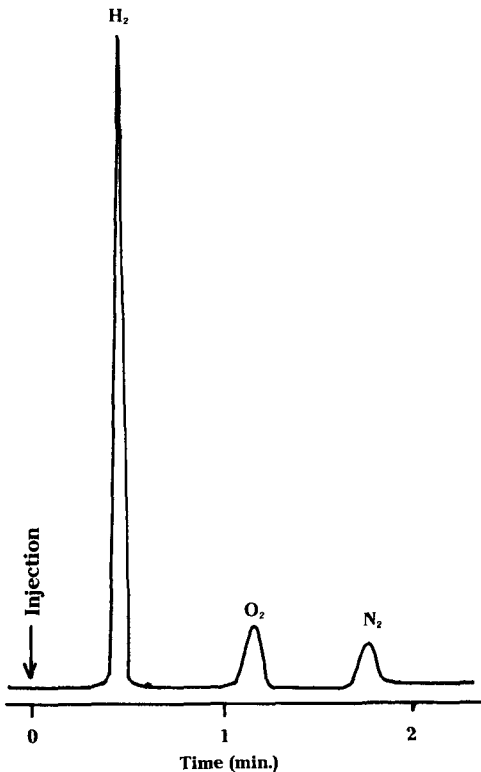


Fig. 1. Gas Chromatograph for Authentic Gas Sample.

atine 액화력은 gelatine 0.4%를 함유시킨 Ormerod 고체배지에 균을 접종, 배양한 후 mercuric chloride액으로 투명대 형성을 보고 gel-

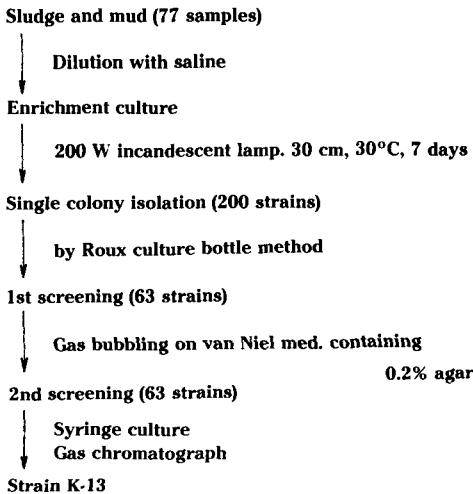


Fig. 2. Isolation of H<sub>2</sub> Producing Photosynthetic Bacteria.

atine 액화능을 조사하였다.<sup>26)</sup> 진분 및 Casein의 이용성, Catalase 활성은 상법에 따라 조사하였다. Growth factor의 요구성은 Ormerod 배지에서 yeast ext.을 빼고 각종 vitamin을 첨가하여 균의 성장을 660nm에서 O. D를 측정하여 조사하였다. Bacteriochlorophyll은 원심분리한 균체를 60% sucrose 용액에 현탁시킨 후 Beckman Model 25 spectrophotometer을 이용하여 scanning 하였다.

호기적 조건에서의 배양은 斜面배지에 접종, 배양하였고 호기적 조건에서의 배양은 cap tube의 表面을 paraffin oil로 밀폐시켜 배양하였다.

### 실험결과 및 고찰

#### 光合成細菌의 분리 및 선정

Fig. 2와 같이, 양지바른 水界嫌氣層에서 채취한 77점의 sludge 및 진흙(mud) 시료를 멸균 生理食염수로 희석하여 enrichment culture를 행한 후 Roux culture bottle을 이용하여 적색 및 갈색 colony 200여주를 분리하였으며 한천 0.2% 함유하는 van Niel 배지에서 明, 혐기배양으로 기포를 생성하는 63주 1차 선정하였다. 이것을 다시 syringe를 이용한 배양방법으로 생산된 가스를 정량적으로 측정하고 gas chromatography에 의한 分析으로 가장 水素生産이 많은 균주 K-13을 최종적으로 선정하였다.

#### 선정된 균주의 동정

행태적 특성: 분리 선정된 균주 K-13은 binary fission으로 증식하였으며 桿菌으로 운동성이 있고 포자를 형성하지 않았다. Gram 음성으로 광합성세균의 일반적인 특성을 갖고 있었다 (Table 4).

Table 4. Morphological Characteristics of the Selected Strain K-13.

|                 |                      |
|-----------------|----------------------|
| Size            | 0.4—0.5 x 1.2—2.5 μm |
| Shape           | rod                  |
| Gram staining   | negative             |
| Motility        | motile               |
| Spore formation | negative             |

생리적, 배양상의 특성 : 嫌氣的 및 好氣的 조건에서 明, 暗에 상관없이 모두 成長하였다. 嫌氣的 조건에서는 明暗 다같이 붉은 색을 띄었으나 好氣的 조건에서는 색을 띄지 않았다 (Table 5). 嫌氣的 조건에서 생육한 生菌體의 bacteriochlorophyll은 a의 특성을 갖고 있었다. Gelatine을 액화시켰고 catalase 및 hydrogenase가 양성이었으나 전분이나 casein을 가수분해시키지 못하였다.

**Table 5. Cultural and Physiological Characteristics of the Selection Strain K-13.**

|                                     |                    |
|-------------------------------------|--------------------|
| Growth                              |                    |
| anaerobic, light                    | +                  |
| anaerobic, dark                     | +                  |
| aerobic, light                      | +                  |
| aerobic, dark                       | +                  |
| Pigment                             |                    |
| anaerobic, light                    | purple red         |
| anaerobic, dark                     | pale red           |
| aerobic, light                      | none               |
| aerobic, dark                       | none               |
| Bacteriochlorophyll of living cells | a (866,806,590 nm) |
| Celatine liquefaction               | positive           |
| Casein utilization                  | negative           |
| Starch hydrolysis                   | negative           |
| Catalase                            | positive           |
| Hydrogenase                         | positive           |

Growth factor의 요구성 : Ormerod 배지에서 yeast ext.를 제하고 vitamin free의 casamino acid를 첨가하였을 때 분리균 K-13은 성장하지 않았다. 따라서 이 균주는 growth factor를 요구하는 것으로 판단하고 yeast ext. 대신 다른 vitamin을 첨가하여 배양하였을 때의 결과는 Table 6과 같다. 즉, yeast ext.를 첨가하였을 때 가장 왕성한 균체의 증가를 보인것은 복합적인 영양분 때문이며 thiamine과 biotin을 동시에 첨가하였을 때도 다른 시험구에 비해 월등한 균체의 성장을 나타내었으므로 분리균 K-13의 growth factor는 thiamine과 biotin으로 판단된다.

유황 화합물에 대한 生長시험 : Thiamine 과

**Table 6. Effect of Vitamins and Yeast ext. on the Growth of the Selected Strain K-13.**

| Vitamin                    | Concentration | Cell growth (O.D. <sub>660</sub> ) |
|----------------------------|---------------|------------------------------------|
| Control (Vitamin free)     |               | 0.06                               |
| Biotin                     | 10 ug/l       | 0.07                               |
| p-Aminobenzoic acid (pABA) | 200 ug/l      | 0.05                               |
| Thiamine                   | 1 mg/l        | 0.07                               |
| Vitamin B <sub>12</sub>    | 300 ug/l      | 0.11                               |
| Yeast ext.                 | 300 mg/l      | 0.94                               |
| pABA + Biotin              |               | 0.05                               |
| Thiamine + Biotin          |               | 0.58                               |

biotin을 growth factor로 첨가한 Ormerod 배지에 환원된 유황화합물을 첨가하여 배양하였을 때의 결과는 Table 7과 같다. 즉 유황화합물을 光合成的으로 CO<sub>2</sub>를 자화하기 위한 전자공여체로서 분리균 K-13에 사용될 수 없으며 매우 적은 농도의 H<sub>2</sub>S가 분리균 K-13의 성장을 저해하였다. 따라서 분리균 K-13은 비유황세균으로서 Rhodospirillaceae科에 속한다는 것을 알 수 있다.

유기물 및 水素供與體의 利用 : 지금까지 얻어진 실험결과를 종합하면 분리균 K-13은 Rhodospirillaceae科로서 thiamine과 biotin을 growth factor로 요구하며 gelatine을 액화하는 것으로 보아 *Rhodopseud. gelatinosa*로 잠정적으로 동정하였다.

*Rhodopseud. gelatinosa*의 가장 두드러진 특징은 gelatine을 액화하는 점이다. 따라서 분리균 K-13을 *Rhodopseud. gelatinosa* NCIB 8290과 비교하여 각종 유기물 및 수소공여체의 이용성을 조사하였는데 그 결과는 Table 8과 같다.

**Table 7. Utilization of Reduced Sulfur Compounds by the Selected Strain K-13.**

| Sulfur compound     | Concentration (%) | Cell growth (O.D. <sub>660</sub> ) |
|---------------------|-------------------|------------------------------------|
| Control (no sulfur) | 0                 | 0.56                               |
| Thiosulfate         | 0.05              | 0.06                               |
| Thioghycolate       | 0.05              | 0.06                               |
| Sulfide             | 0.02              | 0.04                               |

**Table 8. Utilization of Electron Donors and Organic Compounds by the Selected Strain K-13 for Comparison with *Rhodopseudomonas gelatinosa*.**

| Carbon or electron donor | <i>Rhodopseudomonas gelatinosa</i> | Selected strain K-13 |
|--------------------------|------------------------------------|----------------------|
| Control (no carbon)      | 0                                  | -                    |
| Acetate                  | +                                  | +                    |
| Arginine                 | 0                                  | +                    |
| Aspartate                | 0                                  | +                    |
| Benzoate                 | -                                  | +                    |
| Citrate                  | +                                  | -                    |
| Ethanol                  | +                                  | +                    |
| Formate                  | ±                                  | +                    |
| Fructose                 | 0                                  | +                    |
| Fumarate                 | +                                  | -                    |
| Gluconate                | 0                                  | +                    |
| Glucose                  | +                                  | +                    |
| Glutamate                | 0                                  | +                    |
| Glycerol                 | -                                  | +                    |
| Lactate                  | +                                  | +                    |
| Leucine                  | 0                                  | +                    |
| Malate                   | +                                  | +                    |
| Malonate                 | 0                                  | ±                    |
| Mannitol                 | ±                                  | -                    |
| Methanol                 | ±                                  | ±                    |
| Propionate               | ±                                  | ±                    |
| Pyruvate                 | +                                  | +                    |
| Sorbitol                 | 0                                  | -                    |
| Succinate                | +                                  | +                    |
| Tartarate                | ±                                  | +                    |
| Sulfide (0.02)           | -                                  | -                    |
| Thiosulfate (0.05)       | -                                  | -                    |

Unless otherwise stated substrates were added to a concentration of 0.1% (w/v).

Acids were added as sodium salts

+: good growth ±: scant or no growth -: no growth 0: not tested

탄소원으로서는 glycerol을 제외한 모든 유기물의 이용성이 동일 하였다. 이러한 사실로 미루어 보아 분리선정균 K-13은 *Rhodopseudomonas gelatinosa* 이거나 근연의 새로운 변종인 것으로 판단된다.

## 요 약

光合成세균에 의한 水素生産을 目的으로 성남 근교의 논 토양으로부터 수소를 다량 生産하는 비유황세균 1株를 分離하고 同定하였다. 이 균주의 生理的 형태적 및 배양상의 特性을 규명한 결과 *Rhodopseudomonas gelatinosa* K-13으로 同定 되었다.

## 참고문헌

- 1) 小林達治, 阿江教治, 岸本眞希男, 木下昌三, 烏飼康子, 高橋英一, 葛西善三郎: 日農化誌, **50**, 157~161 (1976)
- 2) 小林正泰: 發酵と工業, **36**, 753~766 (1978)
- 3) 小林正壽: 食品工業, **14**, 4 (1971)
- 4) Kobayashi, M.: Bull. Japanese Soc. Sci. Fisheries, **33**, 657 (1967)
- 5) Pfennig, N.: Ann. Rev. Microbiol., **21** 285 (1967)
- 6) Lascelles, J.: J. Biol. Chem., **62**, 78 (1956)
- 7) Sheer, H., W.A. Svec, B.T. Cope, M.H. Studier, R.G. Scott and J.J. Katz: J. Am. Chem. Soc., **96**, 3714 (1974)
- 8) Hirayama, O.: Agric. Biol. Chem., **32**, 34 (1968).
- 9) Ramasarma, T.: Adv. in Lipid Research, **1**, 107 (1968)
- 10) Lascelles, J. and T.P. Hatch: J. Bacteriol., **98**, 712 (1969)
- 11) Gest, H. and M.D. Kamen: Science, **109**, 558 (1949)
- 12) Gest, H., J.G. Ormerod and K.I. Ormerod: Arch. Biochem. Biophys., **97** 21-33 (1962)
- 13) Hillmer, P. and H. Gest: J. Bacteriol., **129**, 732-739 (1977)
- 14) Ormerod, J.G., K.S. Ormerod and H. Gest: Arch. Biochem. Biophys., **94**, 449-463 (1961)
- 15) Heyer, J., B.C. Kelly and P.M. Vignals: Biochimie, **60**, 245 (1978)
- 16) Klemme, J.H.: Arch. Mikrobiol., **64**, 29 (1968)
- 17) Wall, J.D., P.F. Weaver and H. Gest: Nature, **258**, 630 (1975)
- 18) Bruce, A.M., R.A. Pelroy and J.A. Bassham: J. Bacteriol., **138**, 446-452 (1979)
- 19) Kim, J.S., K. Ito and H. Takahashi: Agric. Biol. Chem. **44**, 827-833 (1980)

- 20) Antarikanoda, P., H. Berndt, F. Mayer and H. Lorenzen : *Arch. Microbiol.* **126**, 1-10 (1980)
- 21) Van Niel, C.B. : *Bact. Rev.* **8**, 1-118 (1944)
- 22) Carr, N.G. : *Methods in Microbiol.* **38**, 66 (1969), Academic Press
- 23) Buchanan, R.E. and N.E. Gibbons : *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., The William & Wilkins Company, Baltimore (1974)
- 24) Lechevlier, L. : *Handbook of Microbiol.* **1** 17 (1974), Crd ress.
- 25) Gerhard, P. : *Manual of Methods for General Bacteriol*, 26 (1981)
- 26) Gibbs, B.M. and D.A. Shapton : *Identification Methods for Microbiologists*, Academic Press, New York, (1968)