

초호열성 고세균 *Thermococcus* sp. DT1331의 유황 화합물 이화 특성

곽이성* · 김영배¹

한국인삼연구초연구원, ¹고려대학교 생명공학원

Dissimilation of Sulfur Compounds by a Hyperthermophilic Archaeobacterium, *Thermococcus* sp. DT1331. Yi-Seong Kwak* and Young-Bae Kim.¹ Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Taejon 305-345, Korea, ¹Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea - Some sulfur compounds dissimilation characteristics of *Thermococcus* sp. DT1331 were studied. DT1331 had ether-like lipid compounds in addition to esters in the cell membrane. The specific growth rates of DT1331 decreased with increasing head spaces of the cultures. However, when the ratio of head space volume to medium volume was 5.60, the strain showed no growth. DT1331 showed vigorous growth with 1% or more elemental sulfur addition. Cystine could substitute elemental sulfur and DT1331 showed moderate growth with 0.1% or more cystine concentration. The specific growth rate and maximum cell concentration of *Thermococcus* sp. DT1331 in the presence of elemental sulfur were 0.80 hr⁻¹ and 2.0×10⁸ cells/ml, respectively, while they were 0.67 hr⁻¹ and 1.1×10⁸ cells/ml, respectively in the presence of cystine.

지구상에는 많은 종류의 미생물들이 존재하며 이들이 적응하여 살아가는 서식처들의 환경들도 다양하다(1, 2). 진화에 의해 극한에 가까운 조건에 적응하며 살아가고 있는 미생물들이 존재함이 밝혀지고 이러한 극한 환경에 사는 미생물들을 총체적으로 극한 미생물(extremophiles)이라고 부르며 고온 미생물(thermophiles)이 대표적인 예이다(3).

높은 온도에서도 성장하는 호열성균에 대한 연구는 1879년 *Bacillus stearothermophilus*를 분리하면서 부터 시작되었으며 1960년대 말까지 호열성균의 세균학적 또는 생화학적 연구는 주로 *Bacillus* 속을 대상으로 실행되어 왔다(4). 1960년대 말에 *Thermus* 속이 발견되어 호열성 세균을 75℃ 이상에서 성장할 수 있는 고도호열성 세균(extreme thermophiles)과 그 이하에서 성장하는 중도호열성 세균(moderate thermophiles)으로 나누게 되었다. 1970년대 말부터 더욱 성장온도가 높은 세균들이 알려지게 되면서 부터 85℃ 보다 높은 온도에서 성장하는 세균을 초호열성 세균(hyperthermophiles)이라고 부르게 되었다(5, 6). 호열성 세균은 최고 성장온도가 55℃ 이상인 세균의 총칭이며 그 적응 온도에 따라 중도호열성, 고도호열성 및 초호열성 세균으로 세분하며 이들은 최고성장온도가 55℃ 이상, 80-85℃ 이상 및 90℃ 이상으로 각각 기준을 삼고있다(7, 8).

Woese 등(9)은 rRNA sequencing 기술을 이용하여

기존의 세균과는 다른 종류를 발견해서 이들을 최초로 고세균(archaeobacteria)이라 명명하였다. 이들은 현존하는 생물중에서 가장 원시 생명체에 가까운 위치에 있다고 알려진 후 고세균의 분포와 새로운 종의 발견이 점차 늘어나면서 분류학적 위치도 확고해 졌다(10-12). 이들 고세균은 기본적으로는 원핵생물의 세포구조를 가지면서도 세포성분, 항생물질 감수성 등의 몇 가지 성질에 있어서 원핵생물과 다를뿐아니라 오히려 일부 진핵생물의 특징과 유사하다(11). 이러한 고세균은 기존의 미생물과는 다른 성질의 효소(13) 및 기타 산물(14)을 생산한다는 점에서 이들의 특성은 많은 연구자와 산업계의 흥미를 불러일으키고 있다.

저자 등(15, 16)은 심해의 열수분출지역으로 부터 초호열성 고세균, *Thermococcus* sp. DT1331 을 분리하여 이균의 분류학적 위치를 보고한 바가 있다. *Thermococcus* 속에 속하는 세균은 S, SO₃, SO₄, S₂O₃ 같은 유황화합물을 최종 전자수용체로 이용하여 H₂S로 환원시켜 성장하는데(6), 이러한 유황화합물과 초호열성 고세균의 성장과의 관계는 고세균의 분류학 연구에서 뿐만아니라 학문적 측면에서도 중요한 기초자료를 제공해 줄 것으로 생각된다. 본 연구에서는 초호열성 고세균에 대한 기초 자료를 제공하고자 하는 취지에서 최종 전자수용체로써 사용하는 유황화합물이 *Thermococcus* sp. DT1331의 성장에 미치는 영향을 조사하였다.

*Corresponding author

Tel. 82-42-866-5535, Fax. 82-42-861-1949

E-mail: yskwak@gtr.kgtri.re.kr

Key words: Hyperthermophilic archaeobacterium, *Thermococcus* sp. DT1331, Elemental sulfur, Cystine

재료 및 방법

사용균주

본 실험에 사용한 균주는 저자 등(15)에 의해 심해(일본 오키나와 해역, 28°23'N, 127°38'E)의 열수분출지역으로 부터 분리된 *Thermococcus* sp. DT1331 균주를 사용하였다. 실험을 통해 사용한 인공해수배지의 조성 및 배양 방법은 이미 보고한 바와 같다(15).

균의 성장 측정

균의 성장은 위상차 현미경(Nikon, JAPAN) 하에서 counting chamber (Herber's bacterial counting chamber)를 이용하여 세포수를 직접 세어서 균의 성장을 계산하였다.

세포막의 지질분석

세포막의 지질은 Fig. 1에 요약한 바와 같이 Ross 등(17)의 방법에 의하여 전처리하고 silica gel plate와 petroleum ether: diethyl ether(85:15, v/v)를 용매계로 사용하여 분석하였다.

산소에 대한 감수성

균체 성장에 미치는 산소의 영향을 조사하기 위하여 배지의 양을 변화시켜 head space를 다르게 한 후 균을 접종하고 80°C에서 24시간 배양한 후 현미경을 이용하여 균의 성장을 관찰하였다(18).

최종전자 수용체의 검토

전자수용체에 대한 검토는 유황 대신에 -S-를 함유한 아미노산 (methionine, cysteine, cystine)을 유황이 배제된 배지에 0.2%(최종농도)되게 첨가한 후 조사 하였다(18).

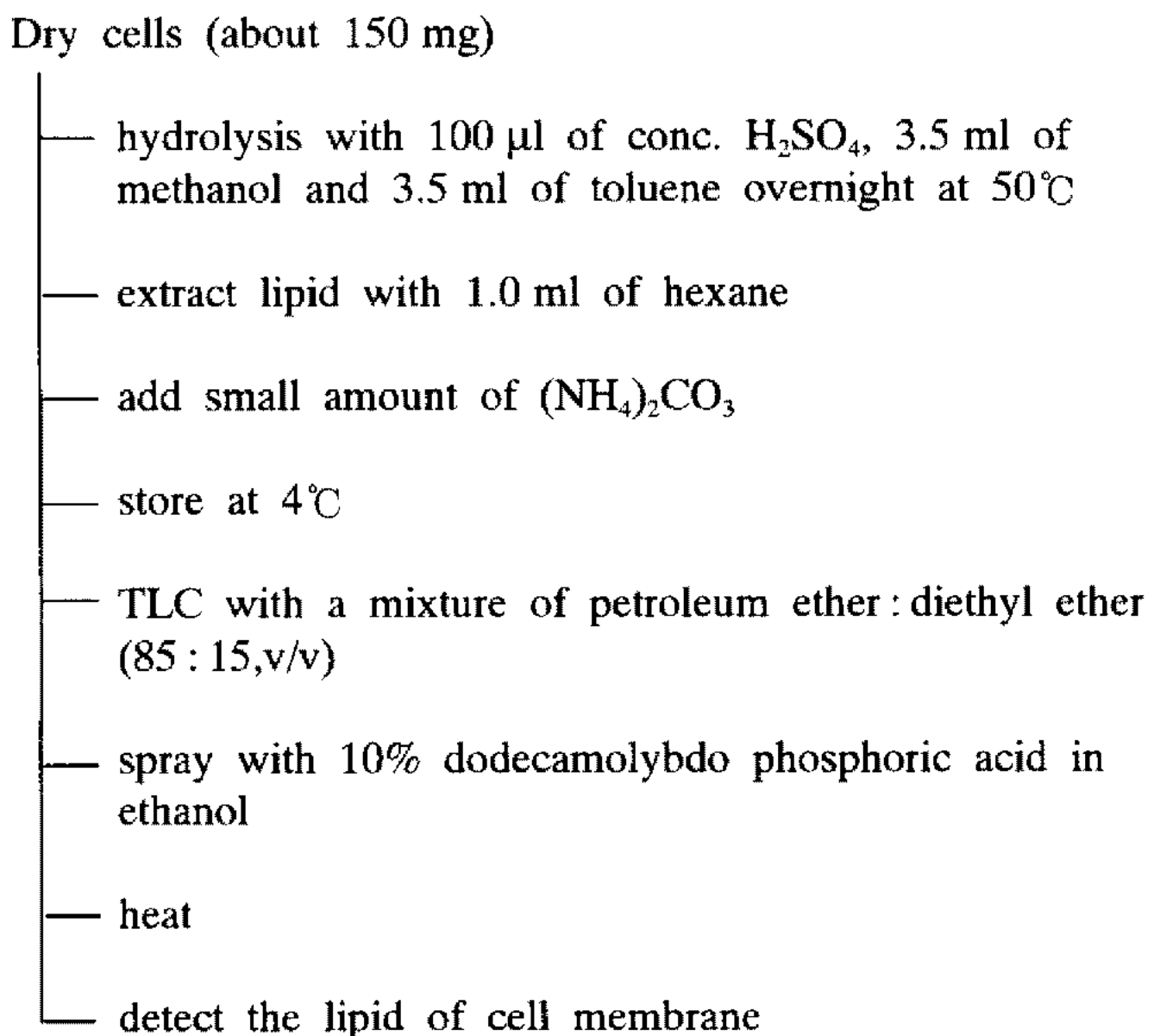


Fig. 1. Scheme for the total lipid analysis in the cell membrane by TLC.

결과 및 고찰

세포막의 지질분석

Thermococcus sp. DT1331 균주의 세포막 지질 특성을 알아 보기 위하여 동결건조 균체를 acid methanolysis 시킨 후 그 산물을 TLC로 분석한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 대조균으로는 진정세균 *Escherichia coli* MV 1184와 고세균 *Natronococcus occultus* ATCC43101을 사용하였다. TLC로 분석한 결과는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 *E. coli*에서는 지방산의 methyl ester 만이 발견되었고 *Natronococcus*에서는 GDEM(glycerol diether moieties)만이 발견되었다. 그러나, DT1331에서는 FAME (fatty acid methyl ester) 외에도 다른 3 개의 band가 나타났다. 이들은 methyl ester와는 다른 화합물로서 정확한 구조를 연구하기 위해서는 추가적인 실험을 행해야 할 것으로 생각되나 특히 R_f 값이 낮은 2개의 band는 De Rosa 등(21)이 보고한 것과 비교할 때 분자량이 GDEM과는 다른 ether 화합물의 한 종류로 추정된다.

고세균의 가장 큰 특징중의 하나는 그 세포막 지질이 원핵생물 및 진핵생물에서 볼수 있는 ester 형태가 아닌

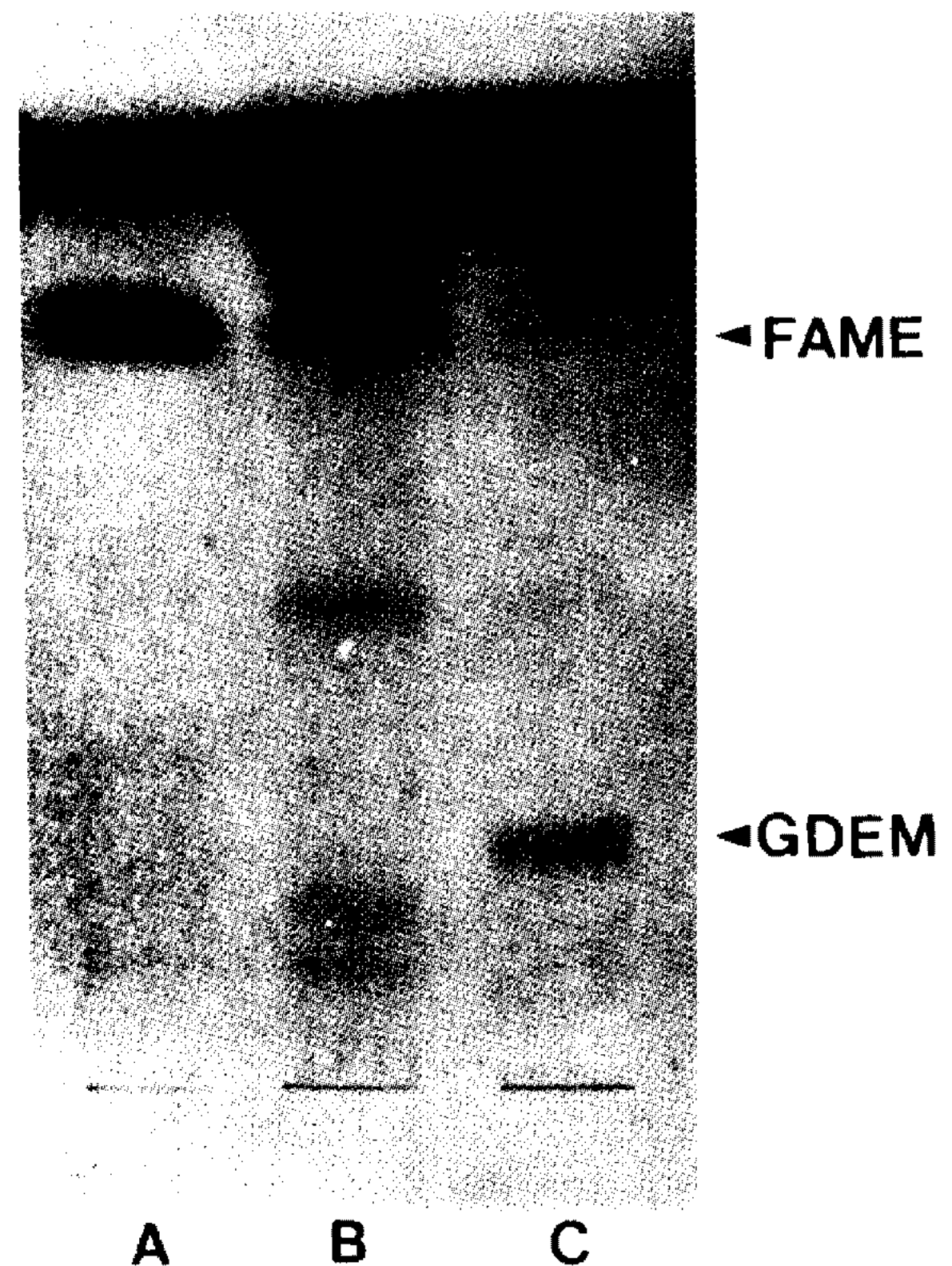


Fig. 2. Thin layer chromaogram of whole cell methanolysates of *E. coli* MV1184 (A), *Thermococcus* sp. DT1331 (B), and *Natronococcus occultus* ATCC43101 (C).

Developing solution was a mixture of petroleum ether (b.p. 60 to 80°C)/diethyl ether(85:15, v/v). Eubacterium *E. coli* MV1184 contains FAME (fatty acid methyl esters) and archaeobacterium *Natronococcus occultus* ATCC43101 contains GDEM (glycerol diether moieties).

ether 형으로 존재하며 또한 탄화수소의 부분도 직쇄 지방산 뿐 아니라 isoprenoid 단위로 구성되어 있고, 탄화수소들이 공유 결합으로 연결되어 단층으로 존재한다는 점이다(19). 또한, 이들 탄화수소는 부분적으로 cyclization 되기도 하여 막의 안정성을 증가시켜 높은 온도에서 생존할 수 있게 하고 ether 결합도 ester 결합에 비해서 산이나 열에 안정하다고 보고되어 있다(20). De Rosa 등(21)도 *Thermococcus celer*, *Pyrococcus woesei*, *Thermococcus* sp. AN1 등의 초호열성 고세균은 진정세균과 달리 그들의 세포막에 하나 혹은 두개의 인지질로 구성된 diether lipid를 함유하고 있었다고 보고하였다. 따라서, 이러한 세포막 지질의 ether 결합이 호열성 고세균 *Thermococcus* sp. DT1331의 호열성과 관계가 있을 것으로 추정된다.

산소에 대한 감수성

Thermococcus sp. DT1331의 성장에 미치는 산소의 영향을 조사하기 위하여 head space의 부피를 조정하여 실험을 행한 결과를 Table 1에 나타내었다. Table 1에 나타낸 바와 같이 배지에 대한 head space의 비율이 0.10에서 0.65인 경우에는 균의 성장율(specific growth rates)이 0.74 내지 0.75 hr⁻¹로 균의 성장이 활발하였다. 그러나 배지에 대한 head space의 비율이 0.65 이상이면 점차로 균의 성장이 불량하여 배지에 대한 head space의 비율이 5.60이면 균의 사멸을 초래 하였다. 또한 head space를 Ar이나 N₂ 가스로 완전히 치환 시킨 것은 가능한 많은 배지를 채우고 head space를 적게 한 경우와 비교해서 균의 성장에서 큰 차이가 발견되지 않았다. DT 1331은 산소에 민감하였으며, 많은 양의 산소는 균의 사멸을 초래하였다. 따라서 본균은 혐기성 균임을 알수 있었다.

Pledger 등(18)은 심해의 열수분출지역으로 부터 분리한 초호열성 고세균 ES1은 85°C에서 24 시간 배양하면서 산소에 노출시켰을 때 완전히 사멸하였다고 보고하였

Table 1. Effect of head space volume on the specific growth rates of *Thermococcus* sp. DT1331

A*	B*	B/A ratio	Specific growth rate
(cm ³)			(hours ⁻¹)
5.0	28.0	5.60	0.00
10.0	23.0	2.30	0.53
15.0	18.0	1.20	0.63
20.0	13.0	0.65	0.74
25.0	8.0	0.32	0.75
30.0	3.0	0.10	0.74
5.0	Ar**		0.74
5.0	N ₂ **		0.72

*A: medium volume. B: head space volume. **Head space was saturated with argon or nitrogen gas.

Table 2. Effect of elemental sulfur concentration on the growth of the *Thermococcus* sp. DT1331

Concentration (%)	Growth
10.0	+++
5.0	+++
1.0	+++
0.5	++
0.1	+

* +++: Vigorous growth (cell number >1.0×10⁸ cells/ml), ++: Moderate growth (1.0×10⁷ cells/ml<cell number<1.0×10⁸ cells/ml), +: Slight growth (1.0×10⁶ cells/ml<cell number<1.0×10⁷ cells/ml).

다. 또한 Miroshnichenko 등(22)은 본 균주와 영양요구성 및 성장특성이 매우 유사한 초호열성 고세균 *Thermococcus stetteri*의 경우 -30 mV(resazurin의 색으로 추정하였음) 이상의 산화환원 전위를 가지는 산화된 배지에서는 균의 성장을 관찰할 수 없었고, 이와 같은 결과에 의하여 절대적 혐기성 균이라고 보고하였다.

최적 유황 농도 검토

저자 등(16)이 이미 보고한 바와같이 *Thermococcus* sp. DT1331은 SO₃¹⁻, SO₄²⁻, S₂O₃²⁻, NO₃¹⁻ 같은 전자수용체들을 이용하지 못하고 유일하게 S⁰을 전자수용체로써 이용하였다. 유황의 농도를 달리하여 균의 성장을 조사한 결과를 Table 2에 나타내었다. Table 2에 나타낸 바와같이 유황농도 1% 이상에서는 균이 잘 성장하였지만, 그 이하의 농도에서는 성장이 불량하였다. 또한 유황농도 1% 이상에서는 유황농도를 증가시켜도 균의 성장이 일정하였다. 이는 유황이 소수성을 띠고 있어 배지에 잘 분산되지 않기 때문인 것으로 생각된다.

합황아미노산의 이용

Thermococcus sp. DT1331의 성장에 이용되는 전자수용체를 알아 보기 위하여 유황대신에 -S-를 함유한 아미노산(methionine, cysteine, cystine)을 유황이 배제된 배지에 첨가하여 조사한 결과를 Table 3에 나타내었다. Table 3에 나타낸 바와 같이 -S-를 함유한 아미노산인 cystine 을 첨가한 배지에서만 균의 성장이 관찰되어 cystine 만이 전자수용체로써 S⁰을 유일하게 대체할 수

Table 3. Effect of -S- contained amino acids such as methionine, cysteine, or cystine on the growth of *Thermococcus*

Substrates ^a	Growth
L-methionine	-
L-cysteine	-
L-cystine	+

* +: growth, -: no growth. ^aThe final concentration of substrates is 0.2%.

Table 4. Effect of cystine concentrations on the growth of the *Thermococcus* sp. DT1331

Concentration (%)	Growth
1.00	++
0.50	++
0.25	++
0.10	++
0.05	+

* ++: Moderate growth (1.0×10^7 cells/ml < cell number < 1.0×10^8 cells/ml), +: Slight growth (1.0×10^6 cells/ml < cell number < 1.0×10^7 cells/ml).

Table 5. Maximum cell concentration and specific growth rates of *Thermococcus* sp. DT1331 in the presence of elemental sulfur and L-cystine

Substrates	Lengths of lag phase (hr)	Maximum cell concentrations (cells/ml)	Specific growth rates (hr ⁻¹)
S ⁰	3	2.0×10^8	0.80
L-Cystine	5	1.1×10^8	0.67

있었다.

유황대신에 cystine이 전자수용체로서 이용될 수 있었으므로 cystine의 농도를 달리하여 균의 성장을 조사한 결과를 Table 4에 나타내었다. Table 4에 나타낸 바와 같이 cystine 0.1% 이하에서는 균의 성장이 불량하였지만, 그 이상의 농도에서는 균의 성장이 일정하였다.

최종 전자수용체와 균체성장

유황과 cystine을 사용하였을 때의 균의 성장을 비교를 Table 5에 나타내었다. Table 5에 나타낸 바와 같이 cystine의 경우는 유황의 비증식속도 0.80 hr⁻¹와 비교해서 0.67 hr⁻¹으로 균의 성장속도가 느렸으며 최대균수도 유황의 2.0×10^8 cells/ml과 비교할때 1.1×10^8 cells/ml 정도로 낮은 수준이었다. *Thermococcus* sp. DT1331이 분리된 열수분출지역의 black smoker chimney의 주성분은 탄산염으로 이루어져 있고, 열수 침전물은 유황의 과립을 함유하고 있다는 사실을 고려한다면(23) DT 1331은 이러한 환경에 잘 적응하여 성장하고 있는 유황 환원 세균으로 생각된다.

요 약

심해의 열수분출지역으로부터 분리된 초호열성 고세균 *Thermococcus* sp. DT1331의 유황화합물의 이화 특성을 검토하였다. DT1331의 세포막 지질의 성분은 methyl ester 지방산 이외에도 ether로 추정되는 화합물을 함유하고 있었다. DT1331의 성장에 미치는 산소의 영향을 조사한 결과 배지에 대한 head space의 비율이 0.10-

1.20인 경우에는 비증식속도가 0.75-0.63으로 균의 성장이 활발하였으나, 배지에 대한 head space의 비율이 5.60이면 균의 사멸을 초래하였다. 유황농도 1% 이상에서는 균의 성장이 활발하였고 전자수용체로서 cystine이 유황을 대체할 수 있으며 cystine 농도 0.1% 이상에서 성장하였다. 한편, 유황 및 cystine을 사용하였을 때의 균의 성장속도는 각각 0.80 hr⁻¹ 및 0.67 hr⁻¹이었으며, 최대균수도 각각 2.0×10^8 cells/ml 및 1.1×10^8 cells/ml이었다.

참고문헌

- Danson, M. T., Hough, D. W. and Lunt, G. G. 1991. The archaeobacteria: Biochemistry and biotechnology. Portland Press, London.
- Gold, T. 1992. The deep hot biosphere. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**: 6045-6049.
- Horikoshi, K. and Grant, W. D. 1990. Superbugs: Microorganisms in extreme environments, Pp. 3-5. Japan Scientific Societies Press, Japan.
- Edwards, C. 1990. Microbiology of extreme environments: Thermophiles, Pp.1-32. McGraw-Hill Publishing Company, New York.
- Stetter, K. O. 1968. Thermophiles: General, molecular and applied microbiology, Pp. 1-10. Wiley-Interscience Publication, New York.
- Stetter, K. O., Segerer, A., Zillig, W., Huber, G., Fiala, G., Huber, R. and Konig, H. 1986. Extremely thermophilic sulfur-metabolizing archaeobacteria. *System. Appl. Microbiol.* **7**: 393.
- Brock, T. D. 1978. Thermophilic microorganisms and life at high temperature, Pp. 1-11. Springer-Verlag, New York.
- Zehnder, A.J.B. 1988. Biology of anaerobic microorganisms, Pp. 34-38. John Wiley and Sons Inc., New York.
- Woese, C. R. and Fox, G. E. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**: 5088-5090.
- Woese, C. R. and Olsen, G. J. 1986. Archaeobacterial phylogeny: Perspectives on the urkingdoms. *System. Appl. Microbiol.* **7**: 161-177.
- Balows, A., Truper, H. G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K. H. 1992. The prokaryotes: Archaea, Pp. 677-808. Vol.1. Springer-Verlag, New York.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P.H.A., Staley, J. T. and Williams, S. T. 1994. Determinative bacteriology (Ninth edition), Pp. 719-754. Williams and Wilkins Company, New York.
- Mullis, K. B. 1990. Process for amplifying nucleic acid sequences. *Science.* **6**: 16-25.
- Brierley, C. L. and Murr, L. E. 1973. Leaching: Use of a thermophilic and chemoautotrophic microbe. *Science.* **179**: 488.
- Kwak, Y. S., Kobayashi, T., Akiba, T., Horikoshi, K.

- and Kim, Y. B. 1994. Isolation and characterization of an extremely thermophilic sulfur-metabolizing bacterium from a deep-sea hydrothermal vent system. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. **4**(1): 36-40.
16. Kwak, Y. S., Kobayashi, T., Akiba, T., Horikoshi, K. and Kim, Y. B. 1995. A hyperthermophilic sulfur-reducing archaeobacterium, *Thermococcus* sp. DT1331, isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**(9): 1666-1669.
 17. Ross, H.N.M., Collins, M. D., Tindall, B. J. and Grant, W. D. 1981. A rapid procedure for the detection of archaeobacterial lipids in halobacteria. *J. Gen. Microbiol.* **123**: 75-80.
 18. Pledger, R. J. and Baross, J. A. 1989. Characterization of a extremely thermophilic archaeobacterium isolated from a black smoker polychaete at the Juan de Ridge. *System. Appl. Microbiol.* **12**: 249-256.
 19. De Rosa, M., Gambacorta, A., Nicolaus, B., Chappé, B. and Albrecht, P. 1983. Isoprenoid ethers: backbone of complex lipids of the archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus*. *J. Bacteriol.* **753**: 249-256.
 20. Langworthy, T. A., Mayberry, W. R. and Smith, P. F. 1974. Long chain glycerol diether and polyol dialkyl glycerol triether lipids of *Sulfolobus acidocaldarius*. *J. Bacteriol.* **119**(1): 106-116.
 21. De Rosa, M., Gambacorta, A., Trincone, A., Basso, A., Zillig, W. and Holz, I. 1987. Lipids of *Thermococcus celer*, a sulfur-reducing archaeobacterium: Structure and biosynthesis. *System. Appl. Microbiol.* **9**: 1-5.
 22. Miroshnichenko, M. L., Bonch-Osmolovskaya, E. A., Neuner, A., Kostrina, N. A., Chernych, N. A. and Alekseev, V. A. 1989. *Thermococcus stetteri* sp. nov., a new extremely thermophilic marine metabolizing archaeobacterium. *System. Appl. Microbiol.* **12**: 257-262.
 23. Gamo, T. et al. 1991. Growth mechanism of the hydrothermal mounds at the CLAM site, Mid Okinawa Trough, inferred from their morphological, mineralogical and chemical characteristics. Proceedings of the 7th SHINKAI 2000 Symposium, Japan Marine Science and Technology Center. 163-184.

(Received 15 December 1995)