

## 홍색유황세균, *Thiocapsa roseopersicina*의 photoheterotrophic 조건에서의 수소생산

† 김 미 선 · 인 선 경 · 백 진 숙 · <sup>1</sup>이 정 국  
한국에너지기술연구원, 바이오매스 연구센터, <sup>1</sup>서강대학교 생명과학부  
(접수 : 2005. 11. 12., 게재승인 : 2005. 11. 30.)

## Hydrogen Production by Purple Sulfur Bacteria, *Thiocapsa roseopersicina* in Photoheterotrophic Culture Condition

Mi-Sun Kim<sup>†</sup>, Sun-Kyoung In, Jin-Sook Baek, and Jeong. K. Lee<sup>1</sup>

Biomass Research Center, Korea Institute of Energy Research, Jang-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-343, Korea

<sup>1</sup>Department of Life Science, Sogang University, Shinsu-dong, Mapo-gu, Seoul 121-742, Korea

(Received : 2005. 11. 12., Accepted : 2005. 11. 30.)

The purple sulfur phototrophic bacterium, *Thiocapsa roseopersicina* NCIB 8347 has been studied on hydrogen production and cell growth under different culture conditions, such as light source, light intensity, and growth temperature. *T. roseopersicina* showed maximum cell growth of 1.38 and 1.42 g-DCW/L under 7.5-10 klux of halogen and fluorescent light, respectively, and produced maximum amount of hydrogen with values of 0.90 and 0.48 mL-H<sub>2</sub>/mg-DCW under the irradiation of 10 klux of halogen and fluorescent light, respectively. The optimum growth temperature for hydrogen production was 26°C, and hydrogen production rate was lowered over 30°C. When *T. roseopersicina* was grown photoheterotrophically under irradiation of 8-9 klux of halogen lamp, the generation time was 4.2 hr. The strains started producing hydrogen from the middle of the logarithmic growth phase and continued until succinate concentration leveled out.

**Key Words :** *Thiocapsa roseopersicina*, photoheterotrophy, hydrogen production, nitrogenase, hydrogenase

### 서 론

다양한 수소제조 기술 중에서도 생물학적인 방법에 의한 수소 생산의 장점이 부각되고 있으며, 수소생산성이 우수한 미생물을 자연계로부터 선별 분리하거나, 유전자를 개선하는 연구와 더불어, 배양기술 등이 집중적으로 보고되고 있다. 일부의 자연계 미생물이 광합성 작용과 수소생산 효소에 의해서 수소 가스를 발생한다는 사실은 이미 오래 전부터 생물학자들에 의해 밝혀졌으며, 관련된 미생물은 녹조류, 시아노박테리아, 홍색 세균 등이 알려져 있다. 그러나 이들은 광합성을 하는 미생물이라는 공통점 외에는 분류학적으로나 생리학적 특징이 상이하다.

홍색세균은 붉은색을 띠는 광합성 세균으로 세포막에서

광합성 메카니즘이 일어나며, 이때 존재하는 bacteriochlorophyll (BChl) a 또는 b에 의해 빛을 흡수하고 광합성 작용 I을 한다. 흡수파장 중 일부는 800 nm 이상에서 높은 흡광도를 내기 때문에 붉은색을 띠는데 이러한 점이 녹조류나 고등식물이 갖는 광합성 작용과 다르다. 홍색세균은 비교적 작은 분류군으로 30~40여개의 균종으로 구성되어 있지만 유전정보 중 GC 함량이 46~73%의 광범위한 분포를 나타내는 것으로 보아서 작은 분류군이지만 유전적으로는 다양한 유연성을 갖는 균종으로 구성 되어있다. 이 그룹은 황화수소와 같은 환원 유황 화합물을 산화하여 환원력을 공급할 수 있는 여부에 따라 홍색 유황세균과 홍색 비유황세균으로 구분되며, 이들은 유황화합물 산화력 외에도 생리학적 및 생태학적인 차이점이 뚜렷하게 다르다. 홍색 유황세균은 광합성 독립 영양 (photo-autotrophic)을 하므로 공기 중의 이산화탄소를 고정하여 탄수화물 등 고분자 물질을 합성하고, 광합성 인산화 과정에서 ATP를 생산하며, 동시에 H<sub>2</sub>S가 산화하는 과정 중이나 분자 상의 수소가 산화할 때 발생하는 전자가 환원력을 공급한다. 반면 홍색 비유황세균은 광합성 종속영양 (photo-heterotrophic)을 하기 때문에 외

† Corresponding Author : Biomass Research Center, Korea Institute of Energy Research, 71-2, Jang-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-343, Korea

Tel : +82-42-860-3554, Fax : +82-42-860-3739

E-mail : bmmskim@kier.re.kr

부에서 공급되는 유기물질을 탄소원으로 사용하며, 이로부터 전자가 공급되는데, 두 그룹 모두 전자는 광합성 작용 I 중에 있는 cytochrome으로 흐르고, cyclic 전자전달계를 형성한다.

*Thiocapsa roseopersicina*는 대표적인 광합성 종속 및 독립 영양을 할 수 있는 균주로서, nitrogenase 와 hydrogenase 유전자를 모두 갖고 있다(1). 광합성 독립영양 조건으로 배양할 때 hydrogenase를 생산할 수 있는 최적의 세균이며, 종속 영양 조건에서는 nitrogenase가 공기 중 질소를 고정하거나, 수소를 생산할 수도 있다. 즉 *T. roseopersicina*는 mixotrophic으로 다양한 조건에서 적응하며 수소를 생산할 수 있으나 빛, 온도 등 외부 배양조건에 대하여 잘 알려져 있지 않다.

이 연구에서는 홍색 유황세균인 *T. roseopersicina* NCIB 8347를 이용하여 광합성 종속영양 조건에서 수소생산과 균체성장을 최적화하기 위하여, 온도, 광원, 광세기 영향을 검토하였으며, 수소 생산에 관여하는 효소의 변화를 측정하였다.

## 재료 및 방법

### 사용 균주 및 배양조건

*T. roseopersicina* NCIB 8347은 0.04% Na<sub>2</sub>S 및 33.87 mM succinic acid, 0.3 mM L-aspartic acid, 3.8 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 함유한 modified Sistrom's 배지에서 2주마다 계대 배양하여 4°C에서 보관하며 사용하였다. 종균 배양은 위 배지와 균체를 serum bottle에 넣고 27°C에서 할로겐등 7,500~8,000 lux의 세기로 혐기·정지 배양하였다. 본 배양은 초기 균체농도가 660 nm에서 흡광도가 0.5가 되도록 접종하고, 배양액을 아르곤으로 5분간 치환하여 혐기조건을 만든 후 27°C 항온실에서 최종 pH 6.8으로 배양하였다. 광원으로 할로겐등을 사용하였으며 7,500~8,000 lux의 세기로 비추었다. 최적의 광원과 광세도를 결정하기 위해 할로겐등과 백열등을 사용하여 균체 성장과 수소생산을 비교하였다. 조도의 영향을 측정하기 위하여 0, 2,500, 5,000, 7,500, 10,000 lux로 비교하였다. 최적 배양온도를 측정하기 위해 15°C, 26°C, 30°C 및 37°C에서 할로겐등을 이용하여 7500 lux에서 알곤으로 치환한 *T. roseopersicina*를 혐기 배양하였으며 배양 중 수소생성량, pH, 균체 농도 및 유기산 분해율을 관찰하였다.

### Nitrogenase 및 hydrogenase 활성

광합성 종속영양 조건에서 배양한 *T. roseopersicina* NCIB 8347 배양액 20 ml을 원심 분리하여 얻어진 균체는 chloramphenicol 20 µg/mL 농도로 함유한 새 배지에 현탁한 후 serum bottle에 넣고 빛을 차단시킨 상태에서 10분간 Ar 치환하여 혐기 조건을 만든 후 27°C, 암소에서 10분간 적응시켰다. Serum bottle의 head space gas 10% (3 ml)를 주사기로 빼내고 동량의 acetylene gas로 채워준 후 7,500 lux의 할로겐램프를 비추며 27°C에서 반응시켰다. 반응 시간 10분 간격으로 GC를 측정하여 생성된 ethylene 가스양을 측정하여 활성을 계산하였다. Nitrogenase 1 unit은 1 µmol

of ethylene/min 생성량으로 정의하였다.

수소생산 활성 (H<sub>2</sub> evolution activity)은 dithionite로 환원된 methyl viologen을 이용하여 H<sub>2</sub>ase에 의해 발생하는 수소 양을 gas chromatograph 14-B (Shimadzu, kyoto, Japan)로 분석하여 측정하였다(2). 10 mL vacuum vial에 1.2 mL의 1.5 mM methyl viologen (MV)과 0.2 mL의 230 mM sodium dithionite를 첨가한 후 적당한 비율로 희석된 0.1 mL의 H<sub>2</sub>ase를 넣어 반응을 시작하였다. 이때 MV는 50 mM Na phosphate buffer (pH 7.0)로 제조하였으며, 모든 반응은 Ar 가스로 치환 후 혐기조건에서 이루어졌다. 반응 시작 후 5분 간격으로 GC를 측정하여 생성된 수소양을 측정하였다. 효소 활성 1 unit은 분당 1 µmole의 수소가 생산되는 양으로 정하고, 효소 비활성도는 unit/mg-단백질로 정하였다.

수소 산화 활성 (Uptake hydrogenase activity)은 수소가스로 포화된 methylene blue 염색시약의 H<sub>2</sub>ase에 의한 산화 반응에 의한 탈색을 분광광도계 (UV/VIS, Shimadzu, kyoto, Japan)로 분석하였다(3). 3 mL stoppered cuvette에 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)로 제조한 2 mL의 0.5 mM methylene blue를 넣고 수소 가스로 10분간 치환한 후 반응 온도에서 30분간 평형에 이르게 한 후 적당한 비율로 희석된 0.5 mL의 H<sub>2</sub>ase를 넣어 반응을 시작하였다. 반응 시작 후 10분 후에 탈색정도를 575 nm에서 측정하였다. 효소 활성 1 unit은 분당 1 µmole의 methylene blue가 산화되는 양으로 정하고, 효소 비활성도는 unit/mg-단백질로 정하였다.

## 결과 및 고찰

### 광원 및 광도

*T. roseopersicina* NCIB 8347는 succinate를 탄소원으로 첨가한 배양조건에서 빛을 조사하지 않을 때 균체가 성장하지 않았으며, 수소도 생성되지 않았다. 빛 세기가 높아질수록 동일한 배양시간 동안 succinate 분해율이 높아졌고, 수소생산량도 증가하였다(Table 1). 그러나 10-30 klux 이상에서는 균체 성장이 약간 저하되어 7.5 klux를 조사할 때의 약 90%이었다. 2.5-10 klux에서 자란 균체를 빛 조사량을 높여서 30 klux 이상으로 조사하였을 때 적녹색이 적색으로 서서히 변하였으며, 최종적으로는 색소를 잃었다. 이와 같은 표백 현상이나 광 저해 현상은 홍색 비유황 세균이 약 400 W/m<sup>2</sup> (100 klux로 환산됨, 1 klux = 4 W/m<sup>2</sup>) 이상인 강한 태양광이나 인공광으로 광합성 세균이 자라지 않거나, 또는 이미 자란 상태에서 강한 빛으로 인하여 색소를 잃는 경우가 보고된 적이 있다(4-7). 아직까지 광저해 현상에 대한 확실한 원인은 밝혀지지 않았으나 광합성 배양 중 높은 농도의 formate가 배양액 중에 축적되어서 pH가 저해하기 때문에 발생하거나, 빛 세기가 높을 때 빛을 받는 Bchl에 손상이 온 것으로 추측하고 있다(6). 형광 램프나 할로겐 램프는 광원으로 조사할 때 수소생산과 균체 성장에 유사한 경향을 보였으나, 후자가 *T. roseopersicina* NCIB 8347을 배양하기에 적합하였다. 즉, 할로겐 램프를 7.5 klux를 조사하면서 약 48시간 배양할 때 succinate의 분

해울 및 수소 생산량이 각각 70% 및 0.79 ml H<sub>2</sub>/mg dcw이었으며, 이는 같은 실험조건에서 형광 램프를 사용할 때보다 1.15배 및 2.80배 증가한 것이다. 그러나 균체 성장은 1.3 g dry cell weight (DCW)/L-배양액으로 두 램프의 차이는 보이지 않았다. 할로겐과 형광 램프가 내는 빛의 파장은 붉은색의 장파장 빛을 많이 갖고 있는 할로겐 램프가 홍색 유향 세균의 수소생산에 유리한 것으로 여겨진다.

**Table 1.** Effect of light intensities using halogen or fluorescent lamps on the growth characteristics and H<sub>2</sub> production of *T. roseopersicina* NCIB 8347 during 48hr of photo-fermentation

(A) Halogen lamp					
Light intensity (klux)	pH	Dry cell weight (g/L)	H <sub>2</sub>		Succinic acid degradation (%)
			ml H <sub>2</sub> /mg-dcw	H <sub>2</sub> %	
0	7.02	0.215	0	0	1.58
2.5	8.42	1.196	0.11	7.14	55.73
5.0	8.02	1.266	0.50	27.98	61.42
7.5	7.90	1.378	0.79	32.00	70.43
10	7.81	1.236	0.90	37.90	88.65

(B) Fluorescent lamp					
Light intensity (klux)	pH	Dry cell weight (g/L)	H <sub>2</sub>		Succinic acid degradation (%)
			ml H <sub>2</sub> /mg-dcw	H <sub>2</sub> %	
0	7.02	0.215	0	0	1.58
2.5	7.94	0.932	0	0	34.87
5.0	8.45	1.304	0.28	16.51	58.79
7.5	8.25	1.342	0.24	15.50	61.07
10	8.07	1.414	0.48	28.04	72.30

Purple sulfur bacteria, *T. roseopersicina* NCIB 8347는 할로겐 램프를 조사하면서 중속영양상태에서 약 4일간 배양할 때 pH는 초기에 8.2-8.6까지 약간 증가하였으나 24시간 이후는 7.8-7.9로 낮아졌다. 그러나 초기 pH 7.0보다 낮아지는 않았다. 균체는 24시간동안 약 1.154 g-DCW/L-배양액이었으며, 발생한 가스 중 수소함량은 약 20%이고, 배양 24시간 후에 0.29 mL-H<sub>2</sub>/g-dcw 가량이 발생하였다. 수소 발생은 succinate가 모두 소비되는 72시간까지 약 3.9배가 증가한 반면, 이후에는 약간 감소하였다. 생산된 수소가 일부 감소하는 경향은 홍색 비유향세균인 *Rhodobacter sphaeroides*를 이용한 수소생산 연구에서 보고되었는데, 이는 세포막에 결합된 uptake hydrogenase에 의한 것으로 사료된다(Table 2).

본 배양조건에서는 유리 투명 배양기 표면에서 약 7.5 - 10 klux를 할로겐 등으로 조사하면서 배양할 때가 *T. roseopersicina* NCIB 8347 균체 성장과 수소생산에 가장 적합한 것으로 사료된다. 이러한 광세기는 일반적으로 홍색 비유향 세균이 자연 상태, 즉 진흙이나 연못의 혐기상태인 곳에서 독립영양으로 서식할 때와 비교하면 약 20배 이상 강한 빛세기이다. 이러한 결과는 *T. roseopersicina* NCIB 8347이 자연에서는 낮은 빛 세기에서도 광합성 작용을 하면서 공기 중의 이산화탄소를 고정하며, 천천히 성장하는 반면, 인위적인 중속영양 배양조건에서는 높은 빛 세기도

이용할 수 있는 것으로 보인다. 홍색유향세균은 일반적으로 담수나 해수에 모두 서식하는 세균으로 호수의 경우 약 15 m 깊이에 태양광이 200-500 lux 정도 약하게 비추고, 산소가 희박한 곳에서 자라며, 이러한 곳 중에서도 동식물의 잔해나 오염된 유기물을 이용하여 sulfate reducing 세균이 발생한 H<sub>2</sub>S가 풍부한 진흙이나 늪 같은 곳에 주로 서식한다(8). 이러한 서식지 환경이 의미하듯이 태양광 중단과장의 빛은 차단되고, 장파장의 빛만이 일부 통과하므로 이 세균은 광합성을 하기위하여 bacteriochlorophyll (Bchl) a, b에서 흡수과장을 갖는다. Bchl a 최대 흡수과장은 375, 590, 805, 830-890 nm이고, Bchl b는 400, 605, 840, 1020-1040 nm인데, purple bacteria에서 대부분 흡수과장이 800 nm 이상에 존재한다.

**Table 2.** Growth characteristics and H<sub>2</sub> production of *T. roseopersicina* NCIB 8347 during photo-fermentation under the 7.5-10 klux irradiation using halogen lamp

Time (hr)	pH	Dry cell weight (g/L)	H <sub>2</sub>		Succinic acid degradation (%)
			mL H <sub>2</sub> /mg-DCW	H <sub>2</sub> (%)	
0	7.03	0.226	0	0	0
24	8.25	1.154	0.29	18.91	43.2
48	7.76	1.423	0.87	44.17	85.99
72	7.98	1.437	1.13	51.76	99.23
96	7.88	1.370	1.03	46.24	99.46

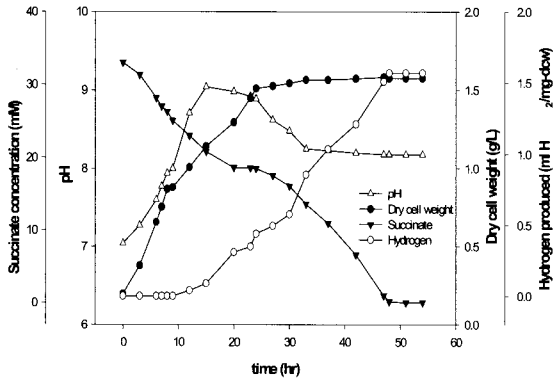
**Table 3.** Effect of temperature on the growth characteristics and H<sub>2</sub> production of *T. roseopersicina* NCIB 8347 during 72 hr of photo-heterotrophic under the irradiation of 7.5 klux using halogen lamp

Temperature	15°C	26°C	30°C	37°C
pH	8.63	7.76	7.79	7.73
Dry cell weight (g/L)	0.881	1.179	1.672	1.714
mL-H <sub>2</sub> /mg-DCW	0.011	1.736	1.336	1.246
Succinate degradation (%)	32.04	99.26	98.72	99.79

## 온도

Succinate를 탄소원으로하는 광합성 중속영양조건에서 *T. roseopersicina* NCIB 8347은 15°C에서도 균체가 자라지만, succinate 분해율은 약 32%에 불과하였다. 26-37°C에서 배양할 때는 15°C보다 약 1.3-1.9배 가량 균체량이 많았고, 첨가한 succinate도 모두 분해되었다. 그러나 수소생산율은 온도가 26°C에서 37°C로 증가할수록 낮아졌다(Table 3). Purple sulfur bacteria는 다양한 환경에서 존재하며, 균주가 갖는 최적 배양온도는 장기간 동안 서식한 곳의 환경에 적응한 생리적 특징의 하나로, 본 실험에 사용한 *T. roseopersicina* NCIB 8347은 26-30°C에서 잘 자라는 중온성 purple sulfur bacteria이었다. 또한 일본 유향온천에서 분리된 purple sulfur bacteria는 배양온도가 35-44°C로 높은 온도에서 자라는 종이며, *Chromatium vinosum*은 48-50°C에서 가장 잘 자라는 특징을 갖고 있다. Purple sulfur bacteria 중 일부는 배양온도 30°C와 1,000-2,000 lux의 비교적 강한 빛세기를 연속해서 비칠 때 잘 자라는 반면, 다른 종류들은 낮은 배양온도 20°C와 낮은 빛세기인 50-300 lux에서 주기적인 빛으로 배양하는 것을 선호하는 것도 있다. *T.*

*roseopersicina* BBS는 여러 개의 NiFe-hydrogenase를 세포 내에서 합성하며, 광합성 독립영양 조건에서 배양할 때 30°C 이상에서는 자라지 않지만, 세포막에 존재하는 수소생산 효소는 25~28°C보다도 80°C에서 역가가 높다고 보고되었다(1).



**Figure 1.** Growth curve of *T. roseopersicina* NCIB 8347 during photo fermentation under the anaerobic condition using Sistrom's media containing succinic acid and Na<sub>2</sub>S (△; pH, ●; cell concentration, ▼; Succinate concentration, ○; Hydrogen production).

**성장곡선**

30°C 배양온도에서 할로겐 램프로 8~9 klux를 조사하면서 photoheterotrophic 조건으로 배양할 때 *T. roseopersicina* NCIB 8347는 첨가한 succinate를 배양 초기부터 분해하기 시작하여 48~50시간 동안에 모두 소비되었다(Fig. 1). 초기 pH 7.0은 배양 15~18시간까지 pH 9로 증가하다가 점점 저하하여 32시간까지 pH 8.1~8.2로 내려갔고 이후는 계속 유지되었다. *T. roseopersicina*의 균체성장 최적 pH는 7.0~7.2로 알려져 있으며, 수소생산 최적 pH는 아직 알려진 바 없다(8). 균체 성장 및 수소생산 중의 pH 변화는 purple non-sulfur bacteria인 *R. sphaeroides*에서 관찰된 것과 유사하며, 이 때 배양 중의 pH 상승은 수소생산 보다 poly-β-hydroxybutyrate (PHB)와 같은 특정 대사산물의 대사를 촉진하는 것으로 보여진다. Koku *et al.*은 배양액의 초기 pH를 6.8에서 7.5로 올렸을 때 수소생산량은 약 7배 감소하였고 PHB의 축적량은 3배로 늘었으며, pH를 6.8로 보정하였을 때 보다 많은 양의 수소와 적은양의 PHB가 축적되었다고 보고하였다(9). 이와 같은 pH 효과는 *T. roseopersicina*에서도 적용이 가능할 것으로 여겨진다. 균체는 초기부터 성장하여 배양 22~24시간에 최대로 성장하였고, 세대시간은 약 4.2시간이었다. 수소는 성장대수기 중간인 18시간부터 발생하여 succinate가 소비되는 45시간까지 발생하였고, 그 이후는 더 이상 생산되지 않았다. 배양 55시간까지는 생산된 수소가 감소되는 현상은 보이지 않았고, 배양시간이 연장되면서 발생한 수소는 시간이 경과함에 따라 감소하였다. 균체는 이 배양조건에서 약 70시간까지 균체가 배양 중에 균일하게 성장하지만 약 70시간 이후에는 균체가 서로 응집하였으며, 교반으로도 균일하게 할 수 없는 것으로 미루어 배양 중 발생하는 염기 등이 세포 외벽의 전하를 변화시켜 발생하는 현상으로 추정되나 아직 정확한 이유는 밝혀지지 않았다. 그러나 본 실험

에서는 수소 생산성에는 이러한 균체 응집 현상이 영향을 주지 않았다. *T. roseopersicina* NCIB 8347과 같은 유황성분을 전자 공여체로 이용하는 세균은 전술한 바와 같이 photoheterotrophic 조건에서도 대사를 할 수 있고, 또한 photoautotrophic 대사를 가져서 공기 중 이산화탄소를 이용할 수 있지만, photoheterotrophic 조건에서 이용할 수 있는 유기물의 범위는 제한되어 있다. 본 실험에서 이용한 *T. roseopersicina* NCIB 8347은 Na<sub>2</sub>S로 황 화합물을 공급할 때 succinate와 lactate를 탄소원으로 이용하여 균체가 성장할 수 있으나 succinate가 수소 생산에 좋은 기질이였으며 이 때 수소생산성은 33 mM succinate를 포함하는 합성 배지에서 2.5-2.8 mL H<sub>2</sub>/ mL-broth이었다. 이는 1 mol succinate로부터 최대 6 mol H<sub>2</sub>가 발생할 수 있다고 가정할 때 약 56~63% 전환율에 해당한다.

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

Dry cell weight (mL-H <sub>2</sub> /mL-broth)	수소생산량 (mL-H <sub>2</sub> /mL-broth)	Nitrogenase activity of <i>T. roseopersicina</i> (Unit/mg-DCW)	Uptake hydrogenase activity (Unit/mg-protein)	Nitrogenase activity of <i>Rb. sphaeroides</i> (Unit/mg-DCW)
1.36	1.1	1.73	5.8 × 10 <sup>-2</sup>	1.61

**수소발생 효소**

일반적으로 *T. roseopersicina*는 phototrophic purple sulfur bacteria로서 환원된 황화합물 (sulfide, thiosulfide, 및 sulfur)을 이용하여 혐기조건에서 광합성을 하며, 암조건에서는 유기물 (당류 및 acetate)을 이용하여 성장할 수 있다(10). *T. roseopersicina*는 glutamate이나 arginine을 포함하는 배지에서 배양하거나, 질소고정 조건에서 배양할 때 nitrogenase에 의해 수소를 생산하며(11), 또한 nitrogenase가 저해된 조건 (질소 비고정 조건)에서는 hydrogenase에 의해 수소가 생산된다고 알려져 있다(12). 이 균주는 최소 4개의 hydrogenase를 가지고 있으며, 이중 2개는 세포막에 존재하고 나머지 2개는 세포질에 존재하여 수소의 생산, 소비 및 수소 sensor 역할을 한다(1). 본 연구에서는 photoheterotrophic 조건으로 배양하였으며 이때 수소 발생은 hydrogenase보다는 nitrogenase에 의한 것으로 사료된다(Table 4). 본 배양 조건에서 48시간 동안 배양한 균체를 수확하여 nitrogenase, uptake hydrogenase, 및 hydrogenase의 수소생성 활성을 측정된 결과, nitrogenase 활성은 1.73 unit/mg-DCW를 나타내었고, uptake hydrogenase의 활성은 5.8 × 10<sup>-2</sup> unit/mg-protein이었으며, 수소생산 hydrogenase의 활성은 극소량 측정되었다. Purple non-sulfur bacteria인 *R. sphaeroides*는 nitrogenase에 의해 수소를 발생하는 것으로 알려져 있으며, 동일 배양 조건에서 48시간 동안 배양한 균체를 수확하여 nitrogenase의 활성을 측정된 결과 활성값이 1.61 unit/mg-DCW을 나타내며 *T. roseopersicina*와 유사한 값을 나타내었다. 이 결과로 미루어 본 배양조건에서의 수소생산은 nitrogenase가 최종 수소생산에 관여하여 H<sup>+</sup>을 환원한 것으로 유추되었다.

*T. roseopersicina*는 다양한 서식지에서 생존하기위해 photoautotrophic 조건 뿐만 아니라, photoheterotrophic, 및 heterotrophic 조건 모두에서 생장이 가능하여 다양한 대사과정

을 수행할 수 있는 것으로 보인다. 지금까지 photoautotrophic 조건에서의 연구는 많이 이루어졌으나, photoheterotrophic 조건에서의 균체 성장 및 수소생산에 관련한 연구는 많이 이루어지지 않았다. 본 연구에서는 photoheterotrophic 조건에서 균체 성장 및 수소생산에 대한 광원, 광도, 및 온도의 영향을 관찰하였으며, 앞으로 균체성장 및 수소생산 최적화를 위한 탄소원, pH 및 공기영향 등의 연구가 계속될 계획이다.

## 요 약

홍색유황세균, *Thiocapsa roseopersicina*가 광합성 종속영양 상태에서 수소를 생산하기 위한 여러 가지 인자 중에서 광원, 광세기, 배양온도의 영향을 실험하였다. 또한 균체의 성장곡선과 아울러 수소 생산과 소비에 영향을 주는 효소 역가의 변화를 측정하였다. 할로젠등과 형광등을 사용하여 균체 성장과 수소생산을 관찰한 결과 배양 48시간 만에 균체성장은 할로젠등과 형광등을 7.5~10 klux로 조사할 때 각각 1.38 및 1.41 g-DCW/L로 가장 높은 균체 성장을 보였고, 수소생산성은 할로젠등과 형광등 10 klux일 때 각각 0.90 및 0.48 ml-H<sub>2</sub>/mg-dcw를 보여 할로젠등 10 klux일 때 가장 높은 수소생산성을 보였다. 최적 수소생산 온도는 26°C이었고, 30°C 이상에서는 수소생산이 감소하였다. 30°C에서 할로젠 램프로 8~9 klux를 조사하면서 photoheterotrophic 조건으로 배양할 때 *T. roseopersicina* NCIB 8347 세대시간은 약 4.2시간이었다. 수소는 성장대수기 중간의 18시간부터 발생하여 succinate가 모두 소비되는 45시간까지 발생하였고, 그 이후는 더 이상 생산되지 않았다. 그러나 배양시간이 연장되면서 발생한 수소는 시간이 경과함에 따라 감소하였다. 또한 본 배양 조건에서 발생한 수소생산은 nitrogenase에 의한 것으로 사료되었다.

## 감 사

이 연구(논문)은 과학기술부의 지원으로 수행하는 21세기 프론티어연구개발사업 (수소에너지사업단)의 일환으로 수행되었습니다.

## REFERENCES

1. Kovacs, K. L., B. Fodor, A. T. Kovacs, G. Csanadi, G. Maroti, J. Balogh, S. Arvani, and G. Rakhely (2002), Hydrogenase, accessory genes and the regulation of [NiFe] hydrogenase biosynthesis in *Thiocapsa roseopersicina*, *Int. J. Hydrogen Energy* **27**, 1463-1469.
2. Bryant, F. O. and M. W. Adams (1989), Characterization of hydrogenase from the hyperthermophilic Archaeobacterium, *Pyrococcus furiosus*, *J. Biol. Chem.* **264**, 5070-5079.
3. Cammack, R., V. M. Fernandez, and E. C. Hatchikian (1994), Nickel-Iron hydrogenase, *Methods in Enzymology* **243**, 43-69.
4. Szyper J. P., B. A. Toza, J. R. Benemann, M. R. Tredici, and O. R. Zaborsky (1998), Internal gas exchange photobioreactor. In *BioHydrogen*. Zaborsky OR, Ed. p. 441-446. New York and London: Plenum Press.
5. Kim, M. S. (2002), Integrated system for biological hydrogen production from organic wastes and waste-waters. International Symposium on Hydrogen and Methane Fermentation of Organic Waste. Japan Science and Technology Corporation 2002. p. 11-18.
6. Tramm-Werner, S., M. Hackethal, M. Weng, and W. Hartmeyer (1996), Photobiological hydrogen production using a new plate loop reactor. *Hydrogen energy progress. Proc. 11<sup>th</sup> World Hydrogen Energy Conference*. Stuttgart. Germany. 1996; 3: pp2407-2415.
7. Modigell, M. and N. Holle (1998), New Photobioreactor for application of biological hydrogen production, *Hydrogen Energy Progress, Proc. 12th World Hydrogen Energy conference*. 1998. pp2045-2055.
8. Pfennig, N. and H. G. Truper (1991), The family Chromatiaceae, In *The prokaryotes*, A. Balows, H. G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, and K.H. Schleifer Eds., pp3200-3221, Springer, Berlin.
9. Koku, H. K., I. Eroglu, U. Gunduz, M. Yucler, and L. Turker (2002), Aspects of the metabolism of hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides*, *Int. J. Hydrogen Energy* **27**, 1315-1329.
10. Vignais, P. M., B. Toussaint, and A. Colbeau (1995), Regulation of hydrogenase gene expression. In *Anoxygenic photosynthetic bacteria* Chapter 55, R. E. Blankenship, M. T. madigan, and C. E. Bauer Eds., pp1175-1190. Kluwer.
11. Kondrar'eva E. N., I. N. Gogotav, and I. V. Grusinskii (1979), Effect of nitrogen-containing compounds on hydrogen light emission and nitrogen fixation by purple bacteria, *Mikrobiologiya* **48**, 389-395.
12. Rakhely, G., A. T. Kovacs, G. Maroti, B. D. Fodor, G. Csanadi, D. Latinovics, and K. L. Kovacs (2004), Cyanobacterial-type heteropentameric, NAD<sup>+</sup>-reducing NiFe hydrogenase in the purple sulfur photosynthetic bacterium *Thiocapsa roseopersicina*, *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 722-728.