KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL.
Vol. 18, *No.* 3 (1986)

수소세균 *Alcaligenes eutrophus* ATCC 17697의 배양조건 및 균체성분

함경식 · 김길환

한국과학기술원 식품공학연구실

Culture Conditions and Cell Composition of Hydrogen Bacteria *Alcaligenes eutrophus* ATCC 17697

Kyung Sik Ham and Kil Hwan Kim

Food Science and Technology Laboratory, Korea Advanced Institute of Science and Technology

Abstract

The culture conditions and cell composition of a hydrogen bacterica, *Alcaligenes eutrophus* ATCC 17697, were investigated. Optimum pH and temperature for cell growth under autotrophic condition (H_2 as energy source, CO_2 as crabon source) were around 7.0 and 30°C, respectively. Effect of oxygen partial pressure in the range of 0.059 atm and 0.27 atm on cell growth was also studied. Maximum specific growth rate (μ_{max} = 0.31hr^{-1}) was observed at 0.11 atm of oxygen partial pressure (H_2:O_2:CO_2 = 7:1:1). The contents of crude protein, nucleic acid and ash in cells were 69.2%, 17.6% and 3.62%, respectively.

서 론

수소세균은 에너지원으로 수소, 탄소원으로 이산화탄소를 이용하는 chemoautotroph로서 1960년대 전반부터 주목을 받아 산업적인 균체생산[1] 뿐만아니라 장기간의 우주여행에 있어 우주선의 가스균형을 조절하고 배양한 균체를 식품으로 이용하려고 연구되기도 하였다[2-5]. 이 외에 저장물인 poly-β-hydroxybutyrate의 생산[6,7], 원자로로 부터 수소가스의 제거[8], plasmid변형[9]등에 이들 균주를 이용하려고 시도되어 왔으며 현재도 계속 활발히 연구가 진행되고 있다. 그러나, 이와같이 다양한 이용가능성에도 불구하고 아직 우리나라에서는 수소세균연구에 대한 보고가 없을 뿐만 아니라 가스배지를 이용한 실험에 관한 연구보고도 없는 실정이다.

한편, 수소세균은 성장속도가 매우 빠른 점 및 배양에 H_2, O_2, CO_2의 혼합가스와 무기영양소 및 물만을 이용하기 때문에 균체단백질을 식품으로 사용시 배지로부터의 독성물질 오염의 염려가 없는 점등 단세포단백질자원으로서도 여러가지 장점을 갖고있다.

이에 수소세균을 단세포단백질자원으로 이용하기위하여 본 연구에서는 수소세균의 배양조건 및 식량으로의 이용가능성에 대한 기초적인 연구를 수행하여 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

혼합가스 제조

세균배양 시 에너지원 및 탄소원으로 이용되는 혼합가스의 제조장치는 Fig. 1과 같다. B의 jar에는 CO_2가 용해되는 것을 방지하기 위해서 산성화시킨 물을 넣고 가스공급은 각각 실린더를 통하여 공급하였다. 혼합가스를 만드는 방법은 진공펌프를 이용하여 B의 jar를 물로 채운후 H_2, O_2, CO_2 각각을 원하는 비율로 주입 혼합하였다. 균체배양용기의 가스교환은 E의 가스교환장치를 이용하였다.

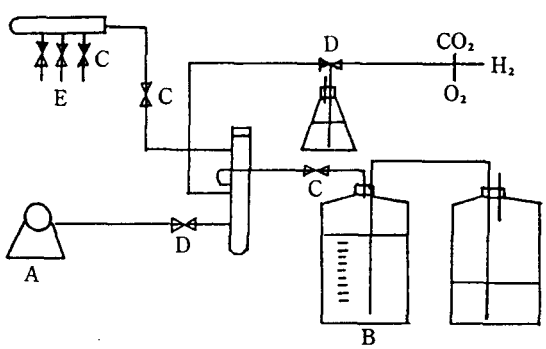

Fig. 1. Schematic diagram of the device for preparation of gas mixture
A: vacuum pump B: graduated jar
C: straight-stopcock
D: three way stopcock
E: gas exchange apparatus

균주 및 배양방법

본 실험에 사용된 균주는 American Type Culture Collection에서 구입한 *Alcaligenes eutrophus* ATCC 17697이었다. 균체배양 시 100*ml* 삼각플라스크와 500*ml*삼각플라스크에 silicone rubber stopper를 마개로 사용하여 배양액을 각각 10*ml*, 50*ml* 씩주입한후균체activation 및 배양용으로 사용하였다. 접종시에 활발히 자라는 균주를 이용하기 위하여 4℃에 보관한 균주를 사용하는 경우에는 최소 2차 activation을 시킨 후 접종하였으며 접종량은 배양액의 10%를 사용하였다. 균체를 접종한 배양용기에 가스를 교환한 후 진탕배양기에서 20~21시간 배양하였다. 배지는 Morinaga등[10]의 배지를 변형시켜 1.0*g* $(NH_4)_2SO_4$, 1.0*g* KH_2PO_4, 0.2*g* $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 5.0*mg* $CaSO_4 \cdot 2H_2O$와 20*mg* $FeSO_4 \cdot 7H_2O$를 1ℓ 수도물에 용해시켜 사용하였다.

균체량의 측정 및 균체회수

균체량은 540*nm*에서 흡광도를 측정하여 정하였다. 비증식속도는 균체량과 흡광도사이의 검정곡선을 만든 결과 흡광도 0.5까지는 비례관계를 보여 이 범위 안에서 흡광도를 측정하여 구하였으며 흡광도가 0.5이상인 경우에는 0.5이하로 희석하여 흡광도를 측정한 후 희석배수를 곱하여 계산하였다. 이때 흡광도 1unit는 균체량 0.2*mg/ml*에 해당되었다. 한편 균체는 배양액의 pH를 2N HCl로 1.5까지 떨어뜨려 염침전물을 녹인 후 13,000 ×*g*, 4℃에서 10분동안 원심분리하여 회수하였다. 회수한 균체는 105℃ oven에서 상압건조한 후 분석에 사용하였다.

균체성분 분석

조단백 및 회분 분석은 AOAC방법[11]에 의했다. 총 핵산함량의 분석은 Ohta등[12]의 방법에 따랐고 표준핵산으로는 *Torula* yeast의 RNA(Sigma Chemical Co., U.S.A)를 이용하였다.

아미노산 분석

균체단백질의 아미노산 조성은 amino acid autoanalyzer(Beckman model 116)로 분석하였다. 균체단백질은 Moore등[13]의 방법에 의해 가수분해시켰으며Tryptophan과 Cystein은 정량하지 않았다.

결과 및 고찰

균체성장에 미치는 pH의 영향

배양액의 초기 pH가 균체성장에 미치는 영향을 Fig. 2에 나타내었다. 균체증식을 위한 최적 pH는 7.0이었으며 $\mu = 0.31 hr^{-1}$를 보였다. pH 7이하에서의 비증식속도는 pH 7 이상에서 보다 더욱 민감한 변화를 보였다.

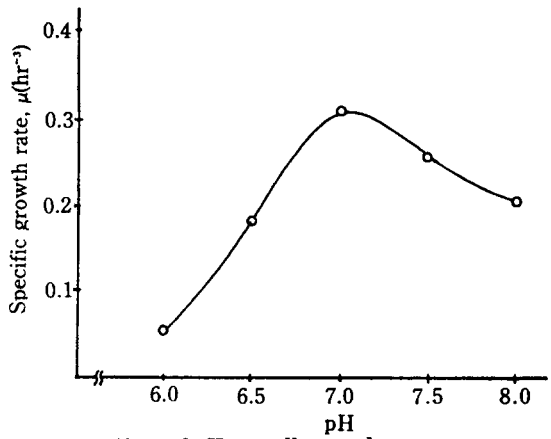

Fig. 2. Effect of pH on cell growth
The cultivation was carried out at 30°C and mixed gas composition was $H_2:O_2:CO_2 = 7:1:1$.

배양온도의 영향

배양온도가 균체성장에 미치는 영향을 Fig. 3에 나타내었다. 배양최적온도는 30℃부근이었으며 30℃에서 $\mu = 0.17 hr^{-1}$이었다.

산소분압이 균체성장에 미치는 영향

H_2/CO_2의 비율을 7 : 1로 일정하게 유지하고 산소의 분압을 0.059atm으로부터 0.27atm까지 변화시키면서 균체성장에 미치는 산소분압의 영향을 Table 1에 나타내었다. 혼합가스조성을 $H_2 : O_2 : CO_2 = 7 : 1 : 1$로 하였을 경우 가장 큰 비증식속도를 보였다. 이러한 결과는 지체분리한 균주 TH-1을 사용하여 산소분압을 0.09atm으로부터 0.33atm까지 변화시켰으나 거의 균체성장의 변화가 없었다고 보고한 Goto등[14]의 연구결과와 큰 차이

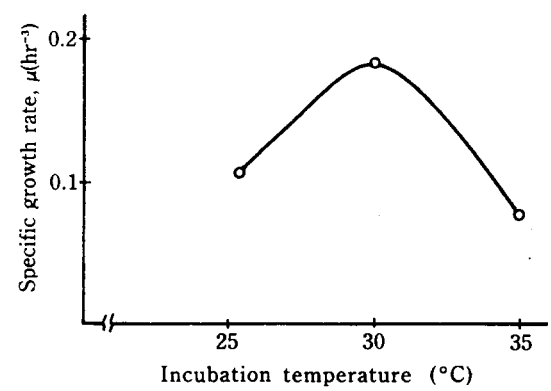

Fig. 3. Effect of temperature on cell growth
The hydrogen bacteria were cultivated on pH 7 and mixed gas composition was $H_2:O_2:CO_2 = 7:2:1$.

Table 1. Effect of partial pressure of oxygen on cell growth

Gas compostion (H_2:O_2:CO_2)	Partial pressure of oxygen : atm	Specific growth rate : hr^{-1}
7 : 0.5 : 1	0.059	0.25
7 : 1 : 1	0.11	0.28
7 : 2 : 1	0.2	0.19
7 : 3 : 1	0.27	0.13

가 있었다. 이와같은 결과의 차이는 진탕배양조건, 배양기구의 기하학적인 구조, 초기 세균농도 및 균주자체의 차이 등에 의해 발생한 것으로 사료되며 보다 정확한 결과를 얻으려면 연속배양방법을 이용하여야 할 것이다. 또한 Table 1에서 산소분압이 0.2atm이상부터는 성장속도가 둔화되었는데 이는 수소세균의 에너지생산 Key enzyme인 hydrogenase가 산소에 의해 불활성화되기때문에 수소세균의 성장이 산소의 일정농도 이상부터는 저해를 받는다[15]는 사실을 반영하는 것으로 사료된다.

세균배양

수소세균을 50ml배지를 넣은 500ml삼각플라스크에 접종하여 $H_2 : O_2 : CO_2 = 7 : 2 : 1$, 온도 30℃에서 배양할 때의 균주 성장곡선을 Fig. 4에 나타내었다. Fig. 4에서 보듯이 배양 후 7시간까지 lag phase를 보이며 이후 logarithmic phase를 거쳐 배양 후 약 17시간 후부터 stationary phase의 균체성장을 보였다.

한편, stationary phase에 있는 균에 가스교환을 하였을때 다시 균체성장이 일어나는 것이 관찰되었으며 이 사실로부터 균체성장의 stationary phase로의 이입은 주로 gas substrate의 limitation에 기인하는 것으로 추측된다. 또한 접종 균체량을 증가시키거나 더욱 활성적인 균체를 접종용으로 사용 또는 초기의 산소분압을 감소시켰을때 lag poriod가 줄어드는 현상이 일어났는데 이 사실로부터 lag period는 주로 용존산소에 의한 균체성장저해때문에 일어나는 것으로 사료된다.

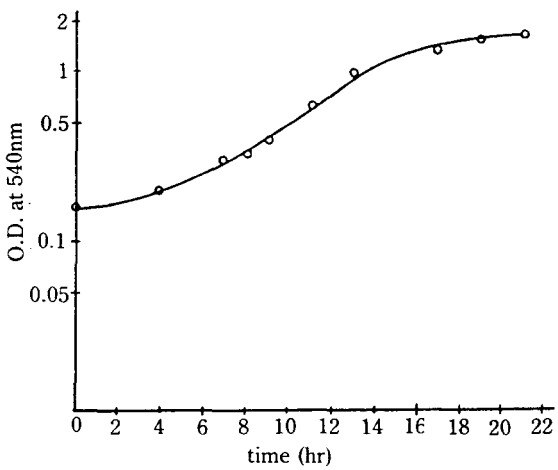

Fig. 4. Growth curve of *Alcaligenes eutrophus* ATCC 17697

The cultivation of *A. eutrophus* was preformed in 500*ml* shaking flask containing 50 *ml* of medium. The composition of gas mixture was H_2:O_2:CO_2=7:2:1. Cell samples were diluted to fall within the proportional range of optical density and cell concentration. Optical density values were calculated from these dilutions.

수소세균의 성분 분석

균체성분 분석은 Table 2와 같다.

Table 2에서 보듯이 균체의 단백질함량은 69.2%로서 이 값은 효모, 곰팡이의 단백질함량 40~50%[16], 일반적인 다른 세균의 단백질함량 50~60%[16,17]보다 훨씬 높은 값을 보였다. 또한 핵산함량도 17.6%로 다른 세균의 핵산함량보다 약간 높은 값을 보였다 일반적으로 단세포단백질을 식용으로 사용 시 안전성면에서 심각한 문제점중의 하나가 높은 핵산함량인데[17-19] 인체에 1일 핵산허용섭취량이 2*g*임[20]을 감안하면 수소세균을 식량자원으로 활용시 일일허용섭취 균체량은 약 12*g*(dry weight base)이 될 것이다. 이런 사실로 미루어 볼 때 본 세균의 단세포단백질의 이용을 위해서는 핵산 제거 방법이 개발되어야 할 것이다.

아미노산 조성

배양된 균체의 아미노산 조성을 타단백질원과 비교하기 위해 이미 보고 된 *Pseudomonas saccharophila*와 casein의 아미노산 조성[21]을 Table 3에 나타내었다. Table 3에서 보듯이 *A. eutrophus* ATCC 17697 균체단백질의 아미노산 조성은 *P. saccharophila*의 아미노산 조성과 거의 비슷했으며 casein과 비교할 때 methionine, threonine, leucine의 함량에서 유사한 수준이었다.

Table 2. Proximate cell composition of *Alcaligenes eutrophus* ATCC 17697

Composition	% (w/w, dry weight basis)
Protein	69.2*
Nucleic acid	17.6
Ash	3.62

Nitrogen content × 6.25

요 약

수소세균을 단세포단백질자원으로 이용하기 위한 기초연구로서 수소를 에너지원으로 이산화탄소를 탄소원으로 하는 autotrophic condition에서 수소세균 *Alcaligenes eutrophus* ATCC 17697의 배양조건 및 균체성분을 조사하였다. 균체성장을 위한 최적 pH와 온도는 각각 7.0과 30℃이었으며 0.059atm부터 0.27atm까지의 산소분압범위에서 균체 성장에 대한 산소분압의 영향을 본 결과 산소분압 0.11atm(H_2: O_2: CO_2=7 : 1 : 1)에서 최대비증식속도 μ_{max} =0.31hr^{-1}를 보였다. 건조균체의 조단백, 핵산, 회분함량은 각각 69.2%, 17.6%, 3.62%이었다.

문 헌

1. Y. Miura, M. Okazacki, K. Ohi, and T. Nishimura: *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 1181(1981)
2. J.F. Foster, J.H. Litchfield: *Biotech. Bioeng.*, **6**,441(1964)
3. M.D. Lechtman, B.H. Goldner, J.H. Canfield: *Dev. Ind. Microbiol.*, **5**, 229(1964)
4. L. Bongers, B. Kok: *Dev. Ind. Microbiol.*, **5**, 183(1964)
5. E.C.B. Ammann, L.L. Read, J.E. Duchek, JR.: *Appl. Microbiol.*, **16**, 822(1968)
6. E.R. Howells: *Chem. Ind.*, **15**, 508(1982)
7. G. Sonnlieitner, E. Heinzle, G. Braunegg, R.M. Lafferty: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **7**, 1(1979)
8. A. Klibanov, J. Huber: *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 1537(1981)
9. A. Anderson, R.C. Tait, W.R. King: *Arch. Microbiol.*, **129**, 389(1981)
10. Y. Morinaga, S. Yamanaka, A. Ishitaki, Y. Hirose: *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 439(1978)
11. A.O.A.C.: *Official Methods of Analysis*, 13th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C. (1980)
12. S. Ohta, S. Maul, A.J. Sinskey, S.R. Tannenbaum: *Appl. Microbiol.*, **22**, 415(1971)
13. S. Moore, D.H.Spackman, W.H. Stein: *Anal. Chem.*, **30**, 1185(1958)
14. E. Goto, T. Kodama, Y. Minoda: *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 685(1977)

Table 3. Amino acid composition of *Alcaligenes eutrophus* ATCC 17697 compared with those of casein and *Pseudomonas saccharophila* (values expressed as g/16g of nitrogen)

Amino acid	*A. eutrophus* ATCC 17697	Published compositions	
		Casein	*P. saccharophila*
Tryptophan	—	1.34	—
Threonine	4.60	4.30	5.37
Lysine	5.46	8.06	5.73
Methionine	2.85	3.10	2.03
Cystine	—	0.38	0.36
Isoleucine	4.71	6.59	4.14
Leucine	9.83	10.11	8.35
Phenylalanine	4.38	5.42	3.56
Tyrosine	2.90	5.86	2.32
Valine	8.14	7.44	7.55
Histidine	2.14	3.04	1.81
Arginine	8.55	4.10	5.01
Alanine	8.93	3.38	13.57
Aspartic acid	9.88	7.44	9.72
Glutamic acid	12.44	2.32	10.52
Glycine	6.29	2.00	9.65
Proline	2.41	11.82	5.59
Serine	3.48	6.69	4.64
Total	98.06	93.39	99.92

15. Y. Nakamura, J. Someya, J. Ooyama: *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 1825(1979)
16. J.H. Litchfield: *Science*, **219**, 740(1983)
17. H.G. Schlegel, R.M. Lafferty: *Adv. Biochem. Eng.*, **1**, 143(1971)
18. S.L. Chem., H.J. Peppler: *Dev. Ind. Microbiol.*, **19**, 79(1978)
19. J.C. Edozien, U.U. Udo. V.R. Young, N.S. Scrimshow: *Nature* (London), **228**, 180(1970)
20. Anon., Protein Advisory Group. Guideline No.4. Single Cell Protein, United Nations, New York [S.L. Chem. and H.J. Peppler: *Dev. Ind. Microbiol.*, **19**, 79(1978)]
21. D.H. Caloway, A.M. Kumar: *Appl. Microbiol.*, **17**, 176(1969)

(1986년 3월 7일 접수)