

## **Flavobacterium odoratum의 TOL 플라스미드를 전달받은 광합성세균으로부터의 수소 생성**

오순옥 · 조인선 · 이희경 · 민경희

숙명여자대학교 이과대학 생물학과

## **H<sub>2</sub> Production of Photosynthetic Bacteria Transferred TOL Plasmid from *Flavobacterium odoratum***

**Oh, Soon-Ok, In-Sun Cho, Hee-Kyung Lee and Kyung-Hee Min**

*Department of Biology, College of Sciences, Sookmyung Women's University, 140-742, Seoul, Korea*

**ABSTRACT:** TOL plasmid size of *Flavobacterium odoratum* SUB53 was estimated as 83 Md and the optimum concentration of *m*-toluate degradation by TOL plasmid was 5 mM. H<sub>2</sub> production by *Rhodospseudomonas sphaeroides* KCTC1425 was largely dependent on nitrogenase activity and showed the highest at 30 mM malate with 7 mM glutamate as nitrogen source. Nitrogenase activities were inhibited by 0.3 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ions, to be appeared the decrease of H<sub>2</sub> production. Conjugation of TOL plasmids from *F. odoratum* SUB53 and *Pseudomonas putida* mt-2 to *R. sphaeroides* showed the optimum at the exponential stage of recipient cells in presence of helper plasmid pRK2013. According to the investigation of catechol-1,2-oxygenase (C-1, 2-O) and catechol-2,3-oxygenase (C-2,3-O) activities of *R. sphaeroides* C1 (TOL SUB53) and C2 (TOL mt-2), the gene for C-2,3-O is located on TOL plasmid and gene for C-1, 2-O on the chromosome of *R. sphaeroides*. *m*-Toluate was biodegraded by TOL plasmid in *R. sphaeroides* C1 and C2, presumably to be produced H<sub>2</sub> gas from the secondary metabolites of *m*-toluate.

**KEY WORDS** □ H<sub>2</sub> evolution, *Rhodospseudomonas sphaeroides*, TOL plasmid transfer

지구상에는 점차 석유자원이 고갈되어 가고 있으므로 그 대신 대체할 에너지로 수소가 이상적인 것으로 주목을 받고 있다. 왜냐하면 수소는 청정한 에너지원일 뿐만 아니라 열 효율이 높은 에너지원이기 때문이다. 따라서 최근 각국에서는 생물학적 방법에 의한 수소 생성에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 생물학적 방법에 의한 수소생성은 광합성 세균이나 몇몇 종속 영양의 절대 및 통성 혐기성 균을 포함한 많은 미생물이 수소를 생성 할 수 있는 것으로 알려져 있다 (Gray와 Gest, 1965). 특히 광합성 세균은 광조사하에서 여러가지 유기물로부터 많은 양의 수소를 생성하며 (Hillmer와 Gest, 1977; Kim등, 1980). 오염된 폐수처리에 효과적으로 사용 할 수 있는 장점도 갖고 있다(Hirayama 등, 1986; Odom과 Wall, 1983; Siefert등, 1978; Sawada와 Rogers, 1977). 광합성 세균에 의한 수소생성기작은 광조사하에서 그리고 혐기성 상태에서만 nitrogenase와 hydrogenase 작

용에 의하여 발생된다고 보고된 바 있다(Hillmer와 Gest, 1977; Vignais 등, 1985).

본 연구에서는 이미 토양에서 분리하여 보고한 *Flavobacterium odoratum* SUB53의 TOL plasmid (Cho 등, 1989)를 광합성 세균인 *Rhodospseudomonas sphaeroides*에로 전달시키고 transconjugant로 하여금 toluate를 분해시켜서 최종산물인 pyruvate를 만들게 하고 2단계로 광합성 세균이 pyruvate로부터 수소 가스를 생성케 하고자 시도하였다. 따라서 이러한 방법으로 난분해성 물질인 toluate를 폐수처리함과 동시에 대체 에너지인 수소 가스 생성에 관한 기초 자료를 얻고자 본 연구를 수행하였다.

### 재료 및 방법

#### 1. 사용균주

Toluate 분해균주로서 *Flavobacterium odoratum*

**Table 1.** Bacterial strains used for this experiment.

| Strain                                       | Relevant characteristics         | Source   |
|--|----------------------------------|--|
| <i>Flavobacterium odoratum</i> SUB53         | TOL <sup>+</sup> Km <sup>r</sup> | This laboratory  |
| <i>F. odoratum</i> SUB53-1                   | TOL Km <sup>r</sup>              | Cured strain from SUB53  |
| <i>Pseudomonas putida</i> mt-2 ATCC23973     | TOL <sup>-</sup> Km <sup>r</sup> | KCTC   |
| <i>P. cepacia</i> SUB37                      | TOL <sup>+</sup> Km <sup>r</sup> | This laboratory  |
| <i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i> KCTC1425 | TOL Km <sup>r</sup>              | KCTC   |
| <i>R. sphaeroides</i> C1(TOL SUB53)          |                                  | This laboratory  |
| <i>R. sphaeroides</i> C2(TOL mt-2)           |                                  | This laboratory  |
| <i>E. coli</i> L600                          | helper plasmid;pRK2013           | Center for Biochemistry,<br>Imperial College,<br>Univ. of London |
| <i>Lactobacillus casei</i> SUB12             | plasmid pLC                      | Moon 등 (1989)  |

\*KCTC: Korean Collection for Type Culture. KIST.

SUB53와 *Pseudomonas putida* mt-2 ATCC23973을 본 실험에 사용하였다. 그리고 수소 생성 균주로는 수소 생성능이 뛰어난 광합성 세균인 *Rhodopseudomonas sphaeroides* KCTC1432를 사용하였으며 conjugation 시에 helper plasmid pRK2013이 있는 *E. coli* L600 (Ditta 등, 1980)을 이용하였다. 본 실험에 사용한 균주는 Table 1에서 보여주는 바와 같다.

## 2. 배지조성 및 배양방법

*F. odoratum* SUB53과 *P. putida* mt-2의 배양 및 특성연구에는 M9 minimal medium (Maniatis, 1982)를 사용하였으며 M9 minimal medium에는 단일 탄소원인 glucose 대신 5 mM m-toluuate를 첨가하여 사용하였다. 광합성세균인 *R. sphaeroides* KCTC1425의 배양을 위한 배지 성분은 Ormerod 최소배지 (Ormerod 등, 1961)를 사용하였다. 배지제조와 전 과정은 Hungate technique를 기초로 한 serum bottle modification technique (Miller 등 Wolin, 1974)을 적용하여 실시하였다.

TOL 플라스미드가 있는 *F. odoratum* SUB53과 *P. putida* mt-2를 5 mM m-toluuate가 포함된 M9 최소배지에서 30°C의 온도 조건하에서 배양하였다. 한편 수소 생성과 nitrogenase 활성을 측정하기 위하여, *R. sphaeroides*를 3-4일간 배양된 세포를 회수하여 10 mM potassium phosphate buffer (pH 6.8)에 현탁하여 혐기상태로 4°C 냉장 보관한 resting cell suspension을 준비하였다. 이것을 다시 Ormerod 최소 배지와 탄소원을 첨가하여 광조사하에서 5일간 수소생성과 nitrogenase 활성을 측정하였다. 수소 생성을 위하여 Ormerod 최소 배지에 탄소원을 첨가한 배지 10 ml를 serum bottle (15 ml)에 넣어 8,000-12,000 Lux의 광조사하에서 30°C로 유지하면서 배양했다. 온도 변화를 최소화하기 위하여 수조에서 배양하였고 혐기성 상태를 위해 argon gas를 3-5 분간 흘려주었다.

## 3. TOL plasmid의 분리 및 Curing

TOL plasmid는 Nakazawa (1978)의 방법에 따라 분리하였으며 Toluate의 분해능이 플라스미드에 기

인하는 지를 확인하기 위해서 플라스미드의 제거 실험을 Cho 등 (1989)의 방법에 따라 실시하였다.

## 4. Catechol-2,3-oxygenase 활성 측정

Cell-free extract는 50 mM의 potassium phosphate buffer, pH 7.5에 10%(v/v)의 acetone을 첨가하여 공기에 의한 불활성을 방지하였다. 효소활성 유도배지에서 배양한 균주를 원심분리하여 균체를 수확한 후 0.85% KCl로 세척한 후 buffer에 완전히 분산시킨 후 초음파 파쇄기를 사용하여 얼음수조에서 파쇄하였다 (Nakai 등, 1983).

Catechol-2,3-oxygenase 활성의 측정은 light path가 1 cm인 cuvette에 50 mM potassium phosphate buffer 2.8 ml과 0.1 ml의 0.01M catechol 용액을 섞은 후 20°C에서 0.1 ml의 효소용액을 넣고 반응을 시킨 후 생성되는 2-hydroxymuconic semialdehyde를 375 nm에서 흡광도로 측정하였다 (Nakazawa와 Yokota, 1973). Specific activity를 dry cell mg당 1분간에 전환되는  $\mu\text{mole}$ 로 계산 하였다.

## 5. Catechol-1,2-oxygenase 활성 측정

Catechol-1,2-oxygenase 활성의 측정은 cis, cis-muconate의 형성율을 측정함으로써 확인하였다. 세포추출액에서 catechol-1,2-oxygenase를 측정하기 위해서 50 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 10분간 처리하여 90-95%의 catechol-2,3-oxygenase 활성을 억제하였다. Cuvette에 potassium phosphate buffer 2 ml을 넣고 0.01 M catechol 용액을 섞은 후 효소를 넣은 다음 260 nm에서 흡광도를 측정하였다(Nakazawa와 Yokota, 1973).

## 6. Nitrogenase activity 측정

혐기상태로 배양한 균체에 의해 발생하는 기체상의 시료를 일정시간 간격으로 반응용기의 head-space로부터 gas-tight microsyringe로 100  $\mu\text{l}$  취하여 gas-chromatography를 이용하여 acetylene reduction으로 분석하였으며 분석 조건은 Meyer 등 (1987)의 조건에 따랐다. Nitrogenase activity는 acetylene의 환원에 의해 생성된 ethylene의 peak 높이로 환산하였으며, 순수한 ethylene으로 표준 곡선을 작성하여

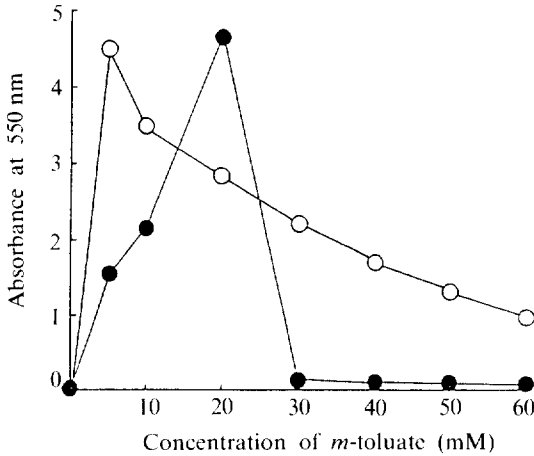


Fig. 1. Effect of m-toluate concentration on the growth of *F. odoratum* SUB53(●) and *P. cepacia* SUB37 (○).

이에 준하여 정량하였다.

7. 단백질 정량

Lowry 등 (1985)의 방법에 의하여 단백질의 농도를 결정하였고, 단백질 정량의 표준시료로는 bovine serum albumin을 사용하였다.

8. Conjugation

대수증식의  $2 \times 10^8$  cells/1 ml의 공여세포와  $2-4 \times 10^8$  cells/ml의 수용세포를 각기 다른 비율로 혼합한 후 여과막 (0.2  $\mu$ m pore size, 25 mm diameter, Gelman, Science, INC.)으로 여과 한 후 여과막을 penassay 한천 배지 위에서 몇 시간 동안 놓아둔 후 1 ml 식염수에 현탁시킨 후 적당히 희석하여 선택 배지에서 접종하였다. 대조 실험으로는 공여세포와 수용세포 각각을 위와 같은 조건으로 여과 한 후, 선택배지에서 생장여부를 확인하였다. 전달율 (transfer frequency)는 conjugant/donor cell의 비율로 산출하였다 (Cho 등, 1989).

9. H<sub>2</sub> evolution 측정

수소 발생용 배지인 Ormerod 최소 배지에서 혐기성 상태, 30C, 8,000-12,000 Lux, pH 7.0 조건하에서 세포를 배양하였다. 일정시간이 경과 한 후 gas phase에서 sample을 gas syringe로 채취하여 gas-chromatography (Hitachi Model 163)로 분석하였다. Gas-chromatography의 분석조건은 Won과 Kho (1986)의 방법에 따라 순수한 수소로 표준곡선을 작성하여 이에 준하여 정량하였다.

결과 및 고찰

1. *F. odoratum* SUB53 균주의 TOL plasmid의 특성

TOL 플라스미드를 갖은 *F. odoratum* SUB53의 m-toluate 농도에 따른 분해능을 고찰하여 본 결과

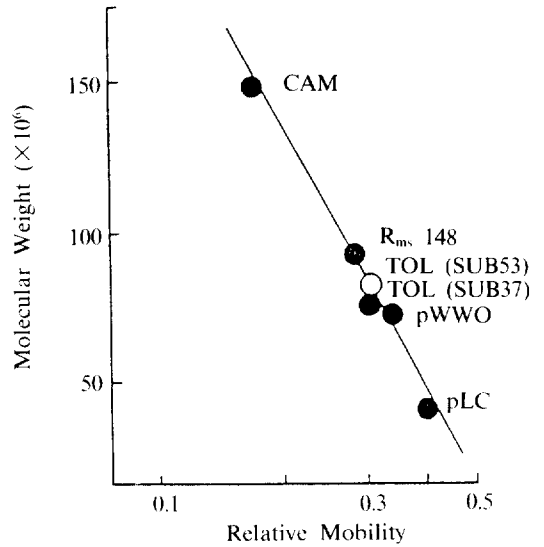


Fig. 2. Determination of molecular weight of TOL plasmid from *F. odoratum* SUB53 by relative mobility on agarose gel electrophoresis. The reference plasmids were CAM( $150 \times 10^6$ ), R<sub>m</sub> 148( $95 \times 10^6$ ), TOL( $82 \times 10^6$ ) from *F. odoratum* SUB53, TOL( $79.3 \times 10^6$ ) from *P. cepacia* SUB 37, pWWO( $78 \times 10^6$ ) from *P. putida* mt-2 and pLC( $35 \times 10^6$ ) from *Lactobacillus casei* SUB12.

M9 최소 배지에서 5 mM m-toluate를 넣었을 때 가장 우수한 생장을 보였으나 20 mM m-toluate의 최적농도를 보여준 *P. cepacia* SUB37의 결과와는 상이하였다(Fig. 1). 따라서 *F. odoratum* SUB53의 TOL 플라스미드의 toluate 이용능은 *P. cepacia* SUB 37 보다 낮게 나타났음을 알 수 있었다.

m-Toluate 분해능을 갖은 *F. odoratum* SUB53의 TOL plasmid를 분리하였으며, 분자량을 측정하기 위하여 분자량이 이미 알려진 plasmid를 표준 marker로 하여 agarose gel 전기영동하여 분자량과 상대적인 이동 거리사이의 상관관계를 비교하여 보았다. 표준 marker로는 150 Md인 CAM plasmid와 95 Md인 R<sub>m</sub>s148, *P. putida* mt-2 pWWO(78 Md), *L. casei*의 플라스미드 pLC(35 Md)를 이용하여 상대 이동 거리를 측정한 결과 *F. odoratum* SUB53의 TOL plasmid 분자량은 82 Md으로 밝혀졌으며 (Fig. 2), 이것은 *P. putida* mt-2의 78 Md나 (Nakawaza와 Yokoda, 1973) *P. cepacia* SUB37의 79.3 Md(Cho 등, 1989) 보다 크게 나타났다.

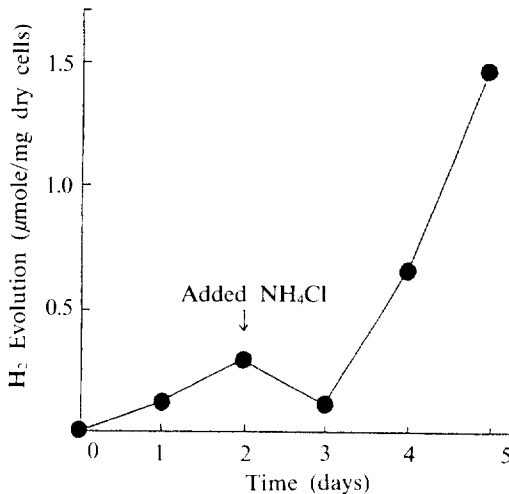
2. *Rhodospseudomonas sphaeroides* KCTC1425 균주의 수소생성

기질로서 유기산중에서 malic acid를 선택하여 *R. sphaeroides* KCTC1425의 최적 조건을 결정하기 위하여 기질농도를 조사하였다. 최적 기질 농도를 규명하기 위해 Ormerod 최소 배지에 단일 탄소원인

**Table 2.** Effect of nitrogen sources on hydrogen production and nitrogenase activity by *R. sphaeroides* KCTC1425.

| Nitrogen Sources (7 mM) | H <sub>2</sub> production (nmoles/hr/mg dry cells) | Nitrogenase (nmoles/hr/mg dry cells) |
|-------------------------|--|--------------------------------------|
| Glutamate               | 48.41  | 12.44                                |
| NH <sub>4</sub> Cl      | 29.45  | 5.22                                 |
| Arginine                | 17.76  | 4.35                                 |
| Alanine                 | 24.95  | 9.57                                 |

Nitrogenase activity was measured by reductio of acetylene to ethylene. H<sub>2</sub> production showed the highest level at 30 mM malate and 7 mM glutamate as nitrogen source.



**Fig. 3.** Effect of NH<sub>4</sub>Cl (0.3 mM) on hydrogen evolution by resting cells of *R. sphaeroides* KCTC 1425 on Ormerod minimal medium with 30 mM malic acid. The cultures were grown in Ormerod minimal medium (Ormerod, 1961) supplemented with 30 mM malate as carbon source.

malic acid의 농도를 0, 15, 30, 45, 60 mM 첨가하여 각각 배양하여 수소생성능을 측정된 결과는 30 mM의 malate 첨가시에 수소를 최대로 생성하였다. 이 결과는 Lee와 Bae (1983)의 결과와 일치함을 알 수 있었다.

*R. sphaeroides*의 경우는 질소원이 수소생성능에 영향을 미친다는 보고가 있다(Sweet and Burris, 1981; Lee and Bae, 1983). 본 실험에서는 몇가지 질소원을 첨가하여 수소가스 생성량을 측정해 본 결과는 Table 2와 같다. 일반적으로 H<sub>2</sub>생성은 nitrogenase 활성과 비례관계에 있으며 30 mM malate가 포함된 Ormerod 최소 배지에 7 mM의 NH<sub>4</sub>Cl, glutamate, arginine, alanine등과 비교하여

**Table 3.** Transfer frequency of TOL plasmid to *R. sphaeroides* KCTC1425 by different growth phase

| Growth phase Donor Strain | Lag                  | Exponential          | Early stationary     |
|---------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| <i>F. odoratum</i> SUB53  | 1.5×10 <sup>-7</sup> | 1.3×10 <sup>-4</sup> | 7.8×10 <sup>-6</sup> |
| <i>P. putida</i> mt-2     | 2.6×10 <sup>-7</sup> | 5.5×10 <sup>-4</sup> | 1.9×10 <sup>-6</sup> |

본 결과 7 mM의 glutamate 첨가에서 가장 많은 수소가스를 생산하는 것으로 나타났다 (Table 2). 이 결과는 Lee와 Bae (1983)가 보고한 *R. sphaeroides* K7의 경우에서도 동일한 결과를 얻었다.

수소생성에 있어서 nitrogenase 활성이 질소원의 농도에 대한 영향을 검토하기 위하여 30 mM malic acid가 포함된 Ormerod 최소 배지에서 2일간 배양한 후 0.3 mM NH<sub>4</sub>Cl을 배양 도중에 첨가한 결과 하루동안은 수소생성이 감소하였으나 그 이후는 수소생성이 현저히 증가함을 볼 수 있었다 (Fig. 3). 이러한 결과가 나타나는 것은 광합성 세균이 수소생성에 관여하는 nitrogenase 활성이 0.3 mM의 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>에 의해 저해되는 것으로 추측된다 (Sweet와 Burris, 1981; Hillmer와 Gest, 1977; Kim등, 1980). 그러나 세포를 계속해서 배양하여 보면 점차 수소 생성이 회복되는데 그 이유는 높은 농도의 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>에 의해 nitrogenase 활성이 하루 동안에는 현저히 저해되었으나 그 이후에는 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ion의 농도가 감소함에 따라 더욱 활성이 증가됨을 알 수 있었다.

**3. *R. sphaeroides* 에로의 TOL plasmid 전달**

일반적으로 공여세포의 플라스미드를 수용세포로 옮기는 과정은 세포의 growth phase에 따라 다르게 전달율을 나타낸다. 본 실험에서는 일반적으로 growth phase에 따른 전달율(transfer frequency)은 exponential phase의 세포를 접합시켰을 경우 가장 높았으며, 그 다음이 stationary phase의 세포, lag phase의 세포순으로 나타났다. *R. sphaeroides*에로 *F. odoratum*의 TOL이 접합될 때 exponential phase에서 1.2×10<sup>-6</sup>로 가장 높은 전달율을 나타내었다. 또한 *R. sphaeroides*에로 *P. putida* mt-2의 TOL의 접합은 exponential phase에서 9.0×10<sup>-6</sup>으로 가장 높은 전달율을 나타내었으며(Table 3). 이때 접합시간은 10-15 시간에서 최적이었다.

접합시 helper plasmid의 존재하에서는 공여세포와 수용세포가 적절히 조합되었을 때 높은 전달율을 나타낼 수 있다. 따라서 2×10<sup>8</sup> cell/ml 공여세포와 2-4×10<sup>8</sup> cell/ml 수용세포수를 1:1, 5:1, 10:1, 1:5, 1:10의 비율로 혼합하였다. 그 결과 공여세포수와 수용세포수를 10:1로 섞어서 접합시켰을때 transconjugant *R. sphaeroides* C1(TOL SUB53)의 생성은 4.4

**Table 4.** Transfer frequency of TOL plasmid by donor and recipient ratio

| Transconjugant Donor to recipient ratio | <i>R. sphaeroides</i> C1 (TOL SUB53) ( $\times 10^{-6}$ ) | <i>R. sphaeroides</i> C2 (TOL mt-2) ( $\times 10^{-6}$ ) |
|---|---|--|
| 1:1                                     | 3.2   | 2.4  |
| 5:1                                     | 4.3   | 2.8  |
| 10:1                                    | 4.4   | 4.9  |
| 10:1 (with helper)*                     | 4.5   | 5.1  |
| 1:5                                     | 3.5   | 4.6  |
| 1:10                                    | 3.5   | 4.0  |

\*Donors growing exponentially at  $2 \times 10^8$  cells/ml were mixed with recipients and *E. coli* with helper plasmid pRK2013 at the same stage and same concentration of cell number in the ratio of 10 donor: 1 recipient:5 *E. coli* L600. This could be achieved by mixing 5 ml of the donor, 0.5 ml of the recipient, and 2.5 ml of *E. coli* L600 in a 125 ml Erlenmeyer flask in a 30°C waterbath and be gently shaken.

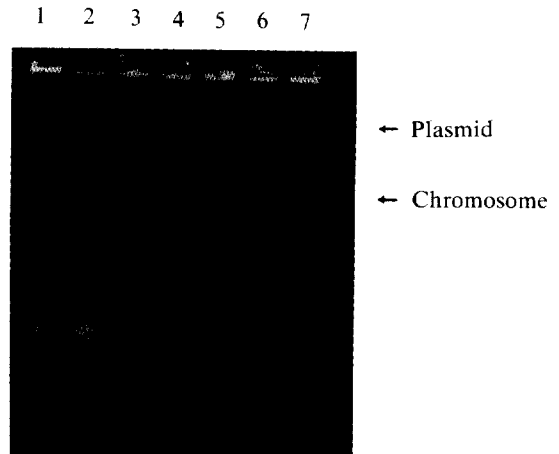
$\times 10^{-6}$ , *R. sphaeroides* C1(TOL mt-2)인 경우  $4.9 \times 10^{-6}$ 으로 가장 높은 전달율을 나타내었다(Table 4). 그러므로 공여세포와 수용세포의 비율은 공여세포를 수용세포보다 많이 혼합하여 주었을 때 더 높은 전달율을 나타내었다.

한편 접합시 tra protein을 분비하여 접합을 용이하게 도와주는 helper plasmid(Ditta 등, 1980)를 첨가하였을 때 *R. sphaeroides* C1(TOL SUB53)인 경우 전달율은  $4.5 \times 10^{-6}$ 으로, 첨가하지 않았을 경우  $4.4 \times 10^{-6}$ 의 전달율보다 다소 높게 나타났다. *R. sphaeroides* C1(TOL mt-2)인 경우 helper 존재시는  $5.1 \times 10^{-6}$ 로 helper가 없을 경우의  $4.9 \times 10^{-6}$ 보다 높게 나타났다. Ditta 등 (1980)에 의하면 helper plasmid를 이용했을 때 전달율이 현저하게 높은 것으로 보고되었으나, 본 실험 결과에 의하면 다소간 높게 나타났다. 이것은 helper plasmid를 가지고 있는 *E. coli* L600 균주의 성장온도와 수용세포균주의 성장온도에 차이가 있어 접합시 수용세포인 *R. sphaeroides*의 성장 온도인 30°C에 맞추어 접합시킨 결과로 *E. coli* L600의 pRK2013 plasmid 기능이 제대로 발현되지 못했기 때문인 것으로 사료된다.

#### 4. Transconjugant의 특성

##### 1) TOL plasmid의 존재

접합에 의해 공여세포인 *F. odoratum* SUB53의 TOL plasmid가 광합성 세균인 *R. sphaeroides*로 전달되었는가 확인하기 위하여 transconjugant의 TOL plasmid를 분리하여 보았다(Fig. 4). 그 결과 *F. odoratum* SUB53(Lane 5)과 *P. putida* mt-2(Lane 1)는 TOL plasmid를 보유하고 있었으나 광합성 세균인 *R. sphaeroides*(Lane 7)은 plasmid를 보유하고 있지 않았다. 이러한 두 균주를 접합 시킨 결과 transconjugants (Lane 2, Lane 4, Lane 6)는 TOL

**Fig. 4.** Agarose gel electrophoresis of plasmid from parental strains and exconjugants.

Lane 1: *P. putida* mt-2(TOL), Lane 2: *R. sphaeroides* (TOL mt-2), Lane 3: *P. cepacia* SUB37 (TOL), Lane 4: *R. sphaeroides* (TOL SUB37), Lane 5: *F. odoratum* SUB53 (TOL), Lane 6: *R. sphaeroides* (TOL SUB53), Lane 7: *R. sphaeroides* KCTC1425 (TOL).

plasmid가 확인되었으며 m-toluuate가 유일한 탄소원으로 들어있는 Ormerod 최소 배지에서 잘 성장하였다. 따라서 이같은 실험 결과가 나온 것은 *R. sphaeroides*에도 전달된 TOL plasmid가 toluate를 분해하는 것으로 생각된다.

##### 2) Toluate 분해효소의 활성

Transconjugant의 TOL 플라스미드에 의하여 생성되는 toluene분해 단계중의 주요 효소인 catechol-2,3-oxygenase(C-2, 3-O)와 catechol -1,2-oxygenase(C-1, 2-O)의 활성을 측정하여 비교하여 보았다.

Table 5에서 보여주는 바와 같이 여러 균주들의 두 가지 효소 활성을 살펴보면 *F. odoratum* SUB53 (TOL) 균주의 C-2, 3-O 활성은 10.26  $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$  protein으로 TOL 플라스미드가 없는 균주 *F. odoratum* SUB53-1(TOL) 0.04  $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$  protein 보다 훨씬 높은 specific activity를 보였다. TOL 플라스미드를 전달받은 transconjugant인 *R. sphaeroides* C1(TOL SUB53)이나 *R. sphaeroides* C2 (TOL mt-2)는 각각 10.98과 13.81  $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$  protein으로 수용세포인 *R. sphaeroides*의 0.11  $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$  protein보다 현저히 높은 C-2, 3-O의 비활성을 타나내고 있었다. 그러므로 수용세포인 *R. sphaeroides* KCTC 1425도 다소간의 aromatic 화합물을 분해할 수 있으나 (William과 Evans, 1973; Whittle 등, 1976) TOL 플라스미드가 전달됨으로써 더욱 현저하게 aromatic 화합물을 분해할 수 있게 된 것으로 생각된다.

C-1, 2-O 활성은 각 균주에서 TOL 플라스미드의

**Table 5.** Specific activities of catechol-1,2-oxygenase and catechol-2,3-oxygenase of donors and transconjugants

| Strains                                       | Catechol-1,2-oxygenase                           | Catechol-2,3-oxygenase                           |
|---|--|--|
|   | ( $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ protein) | ( $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ protein) |
| <i>F. odoratum</i> SUB53(TOL)                 | 0.50   | 10.26  |
| <i>F. odoratum</i> SUB53-1(TOL <sup>-</sup> ) | 0.63   | 0.04   |
| <i>P. putida</i> mt-2(TOL)                    | 1.46   | 12.70  |
| <i>R. sphaeroides</i> KCTC1425                | 0.59   | 0.11   |
| <i>R. sphaeroides</i> C1(TOL SUB53)           | 0.62   | 10.98  |
| <i>R. sphaeroides</i> C2(TOL mt-2)            | 1.95   | 13.81  |

**Table 6.** Utilization of various substrates by *R. sphaeroides* KCTC1425 and transconjugant with TOL plasmid

| Substrate (30 mM)       | <i>R. sphaeroides</i> |                           | <i>R. sphaeroides</i> C1(TOL SUB53) |                           |
|-------------------------|-----------------------|---------------------------|-------------------------------------|---------------------------|
|                         | Growth                | H <sub>2</sub> production | Growth                              | H <sub>2</sub> production |
|                         | (660 nm)              | (nmoles/hr/mg dry cells)  | (660 nm)                            | (nmoles/hr/mg dry cells)  |
| Carbohydrate            |                       |                           |                                     |                           |
| Fructose                | 0.50                  | 30.46                     | 0.48                                | 18.49                     |
| Sucrose                 | 1.04                  | 51.91                     | 0.89                                | 38.45                     |
| Maltose                 | 0.70                  | 51.11                     | 0.74                                | 19.36                     |
| Amino acid              |                       |                           |                                     |                           |
| Glutamate               | 2.80                  | 2.28                      | 2.86                                | 0.36                      |
| Arginine                | 0.26                  | —                         | 0.22                                | —                         |
| Organic compound        |                       |                           |                                     |                           |
| Malic acid              | 2.52                  | 26.23                     | 2.69                                | 19.96                     |
| Succinic acid           | 2.41                  | 7.98                      | 2.36                                | 0.52                      |
| Sodium citrate          | 1.12                  | 54.90                     | 1.98                                | 8.27                      |
| Sodium oxalate          | 0.65                  | —                         | 1.75                                | —                         |
| Pyruvic acid            | 0.80                  | 35.93                     | 2.60                                | 47.51                     |
| Propionic acid          | —                     | —                         | —                                   | —                         |
| m-toluic acid<br>(5 mM) | —                     | —                         | 2.85                                | 6.39                      |

Photoproduction of H<sub>2</sub> with each substrate by resting cells of *R. sphaeroides* KCTC1425 and *R. sphaeroides* C1 (TOL SUB53); The cells were grown in Ormerod minimal medium containing 30 mM malate.

유무에 관계없이 심한 차이를 보여주지 않는 것으로 보아, *P. putida* mt-2의 경우 Nakazawa 등 (1973)이 보고한 바와 같이 *ortho pathway*를 유도하는 C-1, 2-O의 유전자는 chromosome에 의한 것으로 사료된다. TOL 플라스미드를 갖는 모든 균종에서 C-2, 3-O의 비활성이 C-1, 2-O의 비활성보다 높은 활성을 나타내었는데, 이는 TOL 플라스미드 내에 있는 *meta cleavage*를 강하게 유도하기 때문이라고 생각된다 (Nakazawa 등, 1978).

### 3) 수소생성능

*R. sphaeroides*는 광합성 세균중 nonsulfur bacteria로서 혐기성 상태, 광조사시, 여러 유기산을 분해할 수 있는 동시에 수소를 발생시키는 특성을 지니고 있다 (Watanabe 등, 1981; Hillmer와 Gest, 1977; Gest와 Kamen, 1949). 이러한 특성이 *R. sphaeroides*와 conjugant인 *R. sphaeroides* C1(TOL

SUB53)에서 어떻게 나타나는가를 비교하여 보았다. 그 결과 *R. sphaeroides*는 당, 유기산, 아미노산을 기질로 이용할 수 있었으나 m-toluic acid는 기질로 이용하지 못하였다. 그러나 conjugant인 *R. sphaeroides* C1(SUB53)은 당, 유기산, 아미노산은 물론 m-toluic acid도 기질로 이용할 수 있었다. 또한 각 기질을 이용하여 수소 생성량을 측정한 결과 recipient인 *R. sphaeroides*는 sodium citrate를 이용하여 54.90 nmole/hr/mg dry cells의 많은 수소를 발생시켰으며 transconjugant인 경우는 pyruvic acid를 기질로 이용하였을 때 47.51 nmole/hr/mg dry cells를 발생시켰다. 그러나 m-toluic acid를 탄소원으로 첨가하였을 경우 수용균주는 전혀 분해할 수 없었으나 TOL 플라스미드가 전달된 집합균주는 수소를 발생하여 6.39 nmole/hr/mg dry cells을 보여주었다 (Table 6). 이 결과는 위에서 기술한 바와 같이 TOL 플라스미드의

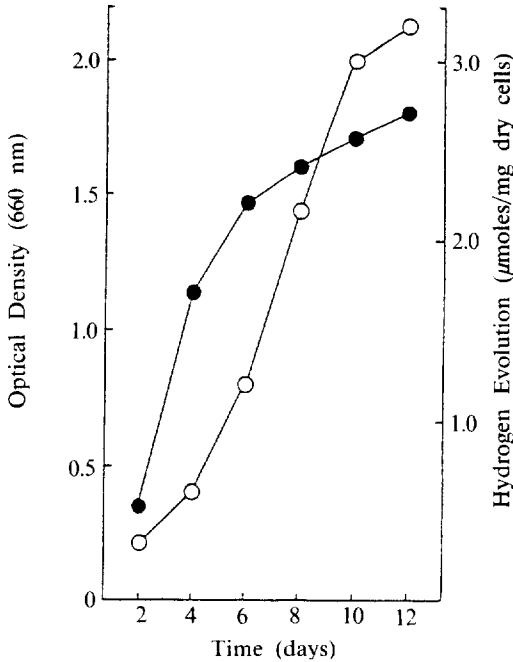


Fig. 5. Hydrogen evolution by resting cells of *R. sphaeroides* (TOL SUB53) on Ormerod minimal medium with 5 mM *m*-toluate. The culture was carried out 30°C and 8,000 Lux anaerobically. Optical density; (●), Hydrogen evolution; (○).

기능으로부터 유래된 것으로 사료된다.

Toluato로부터 접합균주인 *R. sphaeroides* C1 (TOL SUB53)의 수소생성능을 5 mM *m*-toluate가 포함된 Ormerod 최소 배지에서 비교 검토하여 보았다 (Fig. 5). 접합균주는 5 mM toluate에 대하여는 6일만에 그 생장이 stationary phase가 되는 반면 수소 생성은 배양일에 따라 계속 증가하여 10일 이상에서는 현저하게 증가하는 경향을 보였다. 이러한 결과는 접합균주가 *m*-toluate를 직접 기질로 이용하는 것이 아니라 TOL plasmid에 의해 분해되어 생

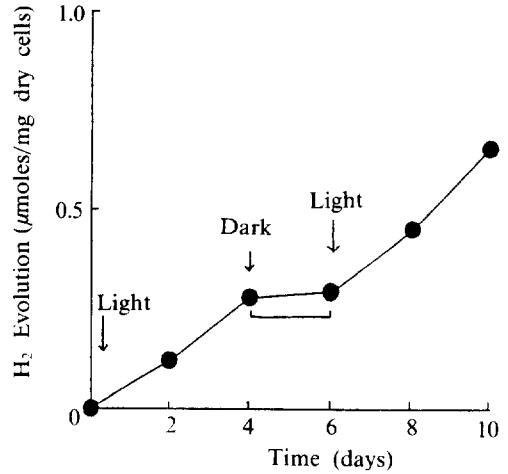


Fig. 6. Effect of light (1,200 lux) on hydrogen evolution by resting cells of *R. sphaeroides* C1 (TOL SUB53) on Ormerod minimal medium with 5 mM *m*-toluate. The preculture was the same as Fig. 3.

성된 pyruvic acid와 acetaldehyde를 이차적으로 기질로 이용하여 수소를 생성하는 것으로 사료된다.

광합성 세균이 수소생성을 하는 과정에서 광 에너지가 전자 수용체인 ferredoxin의 환원력을 증가 시켜주는 역할을 하기 때문에 광은 필수적인 요소이다 (Meyer 등, 1978; Gest와 Kamen, 1949). 이러한 광 효과를 조사하기 위하여 *R. sphaeroides* C1 (TOL SUB53)을 5 mM toluate를 탄소원으로 하는 Ormeroid 최소 배지에서 수일간 광조사 하에서는 수소생성이 증가하다가 수일은 광을 차단한 상태에서 배양시키면 수소생성이 정지되고 이것을 다시 광조사에서 배양하였을 때는 수소 생성량이 다시 증가하는 결과를 얻었다 (Fig. 6). 이러한 결과는 광합성 세균이 광에 의존하고 있으며, 접합균주인 *R. sphaeroides* C1 (TOL SUB53)도 역시 광의 존재하에서 *m*-toluate로부터 수소를 생성함을 알 수 있었다.

## 적 요

*Flavobacterium odoratum* SUB53의 TOL 플라스미드의 크기는 83 Md이 있으며 TOL 플라스미드에 의한 *m*-toluate의 최고분해능도는 5 mM이었다. *Rhodospseudomonas sphaeroides* KCTC1425의 수소생성은 nitrogenase의 활성과 비례하였으며 30 mM malic acid와 질소원으로서 7 mM glutamate의 최적농도에서 최고의 수소생성을 보여 주었다. 한편, 0.3 mM NH<sup>+</sup> ion에 의해 nitrogenase의 활성이 저해되어 수소 생성이 현저히 감소 하였다. *F. odoratum* SUB53과 *Pseudomonas putida* mt-2의 TOL 플라스미드는 *R. sphaeroides*에로의 접합시 수용세포의 대수증식기에서 10시간-15시간 동안에 최적이었으며 helper plasmid pRK2013에 의해 접합능이 증가하였다. Transconjugants인 *R. sphaeroides* C1 (TOL SUB53)과 C2 (TOL mt-2)의 catechol-1,2-oxygenase(C-1, 2-O)와 catechol-2,3-oxygenase(C-2, 3-O)의 활성을 비교 검토한 결과 C-2, 3-O 유전자를 code하는 유전인자는 TOL 플라스미드 위에 있으며, C-1, 2-O 유전자의 위치는 chromosome 위에 있는 것으로 사료된다. 전자 공여체로서, *m*-toluate는 *R. sphaeroides* C1과 C2의 TOL 플라스미드에 의하여 분해되어 수소를 생성함을 알 수 있었다. 이 결과는 TOL 플라스미드에 의하여 *m*-toluate가 일차적으로 분해되고 생성된 이차산물로부터 광선하에서 수소를 생성하는 것으로 추정된다.

## 사 사

본 연구는 1990년도 문교부 학술진흥재단 자유공모과제로 수행되었음.

## 참 고 문 헌

1. Cho, B.N., I.S. Cho, Y.H. Rhee, J.K. Rhy and K.H. Min, 1989. Isolation and characterization of naturally occurring bacteria carried TOL plasmid. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **17**, 321-326.
2. Ditta, G., S. Stanfield, D. Corbin and D.R. Helinski, 1980. Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria; construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **77**, 7347-7351.
3. Gest, H. and M.D. Kamen, 1949. Photoproduction of molecular hydrogen by *Rhodospirillum rubrum*. *Science*, **109**, 558-559.
4. Gray, G.T. and H. Gest, 1965. Biological formation of molecular hydrogen. *Science*, **148**, 186-192.
5. Hillmer, P. and H. Gest, 1977. H<sub>2</sub> metabolism in the photosynthetic bacterium, *Rhodospseudomonas capsulata*; H<sub>2</sub> production by growing cultures. *J. Bacteriol.*, **129**, 724-731.
6. Hillmer, P. and H. Gest, 1977. H<sub>2</sub> metabolism in the photosynthetic bacterium, *Rhodospseudomonas capsulata*; Production and utilization of H<sub>2</sub> by resting cells. *J. Bacteriol.*, **129**, 732-739.
7. Hirayama O., K. Uya, Y. Hiramatsu, H. Yamada and K. Moriwaki, 1986. Photoproduction of hydrogen by immobilized cells of a photosynthetic bacterium, *Rhodospirillum rubrum* G-9 BM. *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 891-897.
8. Kim, J.S., K. Ito and H. Takahashi, 1980. The relationship between nitrogenase activity and hydrogen evolution in *Rhodospseudomonas palustris*. *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 827-833.
9. Lowry O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
10. Lee and Bae, 1983. A study on nitrogenase evolution of molecular hydrogen in *Rhodospseudomonas sphaeroides* K-7. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **11**, 211-216.
11. Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook, 1982. Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y.
12. Meyer, J., B.C. Keiley and P.M. Vignais, 1978. Effect of light on nitrogenase function and synthesis in *Rhodospseudomonas capsulata*. *J. Bacteriol.*, **136**, 201-208.
13. Miller, T.L. and M.J. Wolin, 1974. A serum bottle modification of the Hungate technique for cultivating obligate anaerobes. *Applied Microbiol.*, **27**, 985-987.
14. Moon, K.H., C.H. Park, S.Y. Choi, Y.M. Lee, T. H. Kim, Y.S. Kim and K.H. Min, 1989. Molecular cloning of phospho- $\beta$ -galactosidase gene of *Lactobacillus casei* in *E. coli* Kor. *J. Microbiol.*, **27**, 181-187.
15. Kakai, C., H. Kagamiyama, M. Nozaki, T. Nakazawa, S. Inouye, Y. Ebina and A. Nakazawa, 1983. Complete nucleotide sequence of the metapyrocatechase gene on the TOL plasmid of *Pseudomonas putida* mt-2. *J. Biol. Chem.*, **258**, 2923-2928.
16. Nakazawa, T. and T. Yokota, 1973. Benzoate metabolism in *Pseudomonas putida* mt-2; demonstration of two benzoate pathways. *J. Bacteriol.*, **115**, 262-267.
17. Nakazawa, 1978. TOL plasmid in *Pseudomonas aeruginosa* PAO: thermosensitivity of self-maintenance and inhibition of host cell growth. *J. Bacteriol.*, **133**, 527-535.
18. Odom, J.M. and J.D. Wall, 1983. Photoproduction of H<sub>2</sub> from cellulose by an anaerobic bacterial culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 1300-1305.
19. Ormerod, K.S., J.G. Ormerod and G. Howard, 1961. Light-dependent utilization of organic compound and photoproduction of molecular hydrogen by photosynthetic bacteria. *Arch. Biochem. Biophysiol.*, **94**, 449-463.
20. Sawada, H. and P.L. Rogers, 1977. Photosynthetic bacteria in waste treatment. *J. Ferment. Technol.*, **55**, 297-310.
21. Siefert, E., R.L. Irgens and N. Pfennig, 1978. Phototrophic purple and green bacteria in a Sewage treatment plant. *Appl. Environ. Microbiol.*, **35**, 38-44.
22. Sweet, W.K. and R.H. Burris, 1981. Inhibition of nitrogenase activity by NH<sub>4</sub><sup>+</sup> in *Rhodospirillum rubrum*. *J. Bacteriol.*, **1245**, 824-831.
23. Watanabe, K., J.S. Kim, K. Ito, L. Buranakarl, T. Kampee and H. Takahashi, 1981. Thermostable nature of hydrogen production by non-sulfur purple photosynthetic bacteria isolated in Thailand. *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 217-222.
24. Whittle, P.J., D.O. Lunt and W. Charlesevans, 1976. Anaerobic photometabolism of aromatic compounds by *Rhodospseudomonas* sp. *Biochem. Soc. Trans.*, **4**, 490.
25. Williams, R.J. and W.C. Evans, 1973. Anaerobic metabolism of aromatic substrants by certain micro-organism. *Biochem. Soc. Trans.*, **1**, 186.
26. Won, G.S. and Y.H. Koh, 1986. The relationship between hydrogenase nitrogenase for hydrogen evolution in *Rhodospseudomonas* sp. KCTC 1437. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **14**, 384-389.

(Received December 3, 1991)

(Accepted December 17, 1991)