

## *Chlorobium limicola* f. *thiosulfatophilum* NCIB 8327에서 수소발생에 영향을 끼치는 요인분석

나종욱 · 감사옥

서울대학교 자연과학대학 미생물학과, 서울대학교 분자미생물학연구소

변형된 Pfennig 배지에서 Glutamate를 질소원으로 배양한 다음 수확된 *Chlorobium limicola* f. *thiosulfatophilum* NCIB 8327의 세포에서 수소생산이 수소전극법(hydrogen electrode)으로 측정되었다. 이 방법에 의해서 수소발생을 측정할 때, 산소, 빛, 암모니아, NADPH, ATP, methionine sulfoximine, NADPH, ATP, methyl viologen, 및 benzyl viologen 등이 영향을 주었다. 이 중에서 특히 수소생산율이 빛의 세기, 암모니아 이온농도 및 methionine sulfoximine의 농도에 따라 변하는 것을 보았을 때, 본 균주에서의 수소생산은 nitrogenase에 의존하고 있음을 알 수 있었다.

**KEY WORDS** □ hydrogen electrode, methionine sulfoximine, nitrogenase

미생물이 수소를 만들기 위해서는 혐기적 환경이 필수적이며, 이러한 조건에서 당을 이용한 발효의 부산물로 수소가 형성되는 경우와 질소를 고정하는 미생물에서 암모니아합성과 동시에 나타나는 수소발생의 경우가 있다. 광합성생물에서의 수소발생은 녹조류인 *Scenedesmos*에서 처음 보고된 이래 질소고정 능력이 있는 광합성세균에서 일어나는 보편적인 현상으로 인식되고 있다(2). 현재까지 紫色細菌(purple bacteria)에서 nitrogenase의 활성화에 영향을 끼치는 것은 'ammonia mediated switch on/off' 현상(6, 16) 이외에 빛, 산소, glutamine, asparagine, glutamic acid, uncoupler, reductant, glutamine synthetase 저해제 및 glutamate synthase 저해제 등이 알려져 있다(3). 지금까지 세균에서 분리된 glutamine synthetase로부터 밝혀진 작용특성은 이 효소가 질소나 암모니아의 대사에 중요하게 작용하며 질소고정에 중요한 효소인 nitrogenase의 활성이 glutamine synthetase의 활성 여부에 영향을 받는다는 사실이다(1, 11). 따라서, glutamine synthetase의 활성화에 영향을 끼치는 요소를 찾아 내어 이러한 조건을 해소시키는 것이 수소를 지속적으로 생산하는 지름길이다. 반면에 綠色細菌(green bacteria)에서는 *Chlorobium vibrioforme* f. *thiosulfatophilum*(8)와 *Chlorobium limicola* f. *thiosulfatophilum*(5)에서의 'switch on/off' 현상에 대해서만이 단편적으로 보고되어 있다. 따라서, 綠色細菌내에서의 빛의 전달과 암모니아 고정 및 질소고정에 관한 기작을 밝히는 자료가 요구된다.

본 연구실에서는 수년 전부터 綠色黃細菌(green sulfur bacteria)에 대하여 연구하고 있으며, 그 중에서도 특히 *Chlorobium limicola* f. *thiosulfatophilum*

NCIB 8327을 대상으로 광합성 및 수소, 질소대사과정에 초점을 맞추고 있다. 본 논문에서는 본 균주에서의 수소발생 현상이 어떤 요인에 의해 영향을 받고 있는지 알아내어, 궁극적으로는 綠色黃細菌에서 빛에 의한 수소발생 현상과 질소대사과정간의 조절기작을 규명하는데 초석이 되고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 균주

본 실험에 사용한 균주인 *Chlorobium limicola* f. *thiosulfatophilum* NCIB 8327는 R. Sirevag(Department of Biology, University of Oslo, Norway)로부터 분양받은 것이다.

#### 시약

고순도의 상업용 표준제품이 본 실험에서 시약으로 사용되었다.

#### 사용배지 및 배양

Pfennig의 방법(4)으로 만든 배지를 이용하여 30°C에서 330 lux의 빛으로 배양한 다음 계대하였다. 수소발생을 측정하기 위한 균체는 아래와 같은 조성으로 만든 변형된 Pfennig 배지(5)를 사용하여 30°C에서 330 lux의 빛을 쬐이며 3일간 배양한 다음 원심분리를 통하여 얻었다. 이 배지 1l에는 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g, glutamate 1.3g, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O 1g, 농축염용액(EDTA 500 mg, NaCl 20g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 10g, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 2.5에 증류수를 넣어 1l로 만듦) 20 ml, trace elements(EDTA 5.2g, FeCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 1.5g, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 190 mg, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 100 mg, H<sub>2</sub>BO<sub>3</sub> 6 mg, CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 17 mg, Na<sub>2</sub>MnO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 188 mg, NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 25 mg, VSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 30 mg, Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O

2 mg,  $\text{NaHSeO}_3$  2 mg에 증류수로 1 l로 만든) 1 ml, vitamin  $\text{B}_{12}$  20  $\mu\text{g}$ 이 포함되어, 최종농도가 각각 0.05 % (w/v)와 0.2% (w/v)인 sulfide와 bicarbonate가 포함된다. Bicarbonate는 분말상태로 습윤멸균한 다음 멸균된 증류수에 녹이고 순수한  $\text{CO}_2$ 를 무균적으로 15분 동안 불어 넣은 후, 농축염-초산용액에 넣어 잘 섞어준다.  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 는 끓는 물에 녹여 즉시 습윤 멸균한 다음 농축염용액에 넣고 pH를 7로 맞춘 뒤 배양조에 넣어 완전히 채운다.

### 조효소의 제조

배양액으로부터 6,000  $\times$  g에서 15분의 원심분리로 수확된 세포는 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)로 두번 세척하여 현탁한 다음 조효소로 사용하였다.

### 수소발생의 측정

수소의 발생은 Rao 등의 방법(10)을 변형하여 수소전극법으로 측정되었다. 즉, 5 ml의 sealed vial에서 20 mM potassium-phosphate buffer (pH 7.0)에 2.5 mM methyl viologen과 1 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (nitrogenase의 억제제로서 실험에 따라 빠지기도 함)이 첨가된 반응혼합액 1.3 ml에는 효소시료로 0.6 ml의 세척된 세균현탁액이 첨가되었다.  $\text{N}_2$ 나  $\text{Ar}$ 가스로 10 분간 flushing된 다음 30°C에서 5분간 처리되고, 10 mM dithionite가 첨가되어 2 ml로 된 다음 반응이 시작되었다. 4,000 Lx의 빛을 비추면서 30°C에서 수소전극으로 막주위의 전압변화를 측정한 다음 표준 곡선과 비교하여 발생된 수소의 양으로 환산하였다.

## 결과 및 고찰

광합성세균에서의 수소발생은 수소전극법, 가스 크로마토그래피법 및 양성자교환법(proton exchange) 등으로 측정가능하며, 현재까지 개발된 방법 중에서 가스 크로마토그래피를 이용하는 방법이 널리 사용되어 왔지만, 이러한 방법으로는 가스상태의 수소만 측정할 수 있는 한계에 있으므로 본 실험에서는 수용액속의 용존수소까지 측정할 수 있는 수소전극법을 이용하였다.

### 전자공여체의 영향

본 균주의 성장은 암모늄, glutamine, glutamate와 질소가스를 각각의 질소원으로 사용한 것 중에서 질소가스를 제외하고는 거의 일정하였다. 온전한 세포 (*in vivo*)에서의 수소발생은 반응액에 넣어준 생리적인 전자공여체와 (Table 1), 인공적인 전자공여체에 따라서 약간의 변이가 있었다 (Fig. 1). 이러한 변이는 생리적인 전자공여체의 경우 electron potential의 차이에 따른 결과일 것이라는 사실과, 인공적인 전자공여체의 경우 이들의 막투과성(membrane permeability) 때문이라는 보고(13)를 종합해 볼 때 균주에 따라 알맞은 공여체를 선택하는 것이 수소전극법에 의한 수소발생 측정시 제일 중요한 고려요소이다.

### 기체의 영향

반응액을 여러 가지 기체로 flushing할 때 산소를

Table 1. Effect of electron donors to hydrogen evolution.

Electron donors	Final conc. (mM)	$\text{H}_2$ evolution ( $\mu\text{M}/\text{min}$ )
$\text{Na}_2\text{S}$	12.5	(+) 5.30
	25	(-) 2.97
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	12.5	(+) 1.61
	25	(-) 2.64
NaSH	7.2	(+) 0.25
	10.8	(-) 7.38
2,3,5-Triphenyl-2H-tetrazolium chloride (TPTC)	10	(-) 0.98
	20	(-) 0.12
Na-glutamate	2.5	(+) 2.33
	5.0	(+) 0.11
	17.5	(-) 0.17
Glutamine	2.5	(+) 0.67
	5.0	(-) 0.06

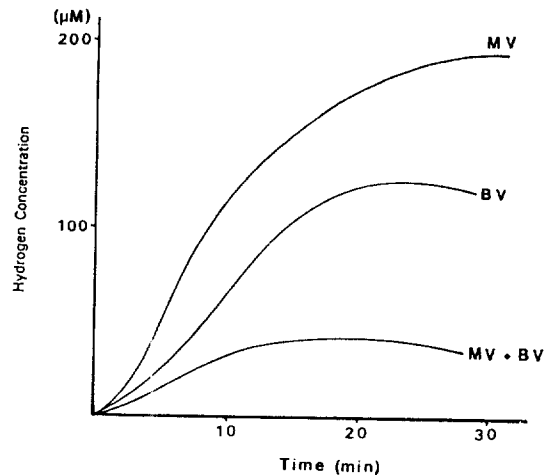


Fig. 1. Effect of viologen on hydrogen evolution in the glutamate grown cells: MV (methyl viologen), BV (benzyl viologen).

함유한 경우는 수소의 발생이 거의 일어나지 않는 것으로 보아 이 반응을 매개하는 효소계가 혐기성이고 oxidation damage에 의해 영향을 받고 있음을 보여 주고 있는 것으로 (Fig. 2) 이는 자색세균에서의 수소 생산이 산소분압에 영향을 받는다는 보고와 일치한다 (15).

### 암모늄이온과 methionine sulfoximine의 영향

암모늄이온을 첨가할 때 수소생산은 저해되지만, methionine sulfoximine에 의해 곧바로 회복되었다 (Fig. 3). 이러한 사실은 암모늄이온이 배양액속에 매우 낮은 농도(10~15 mM)로 일정량 공급될 때에 빛에 의해 수소가 발생된다는 보고(9)와 배치내 아

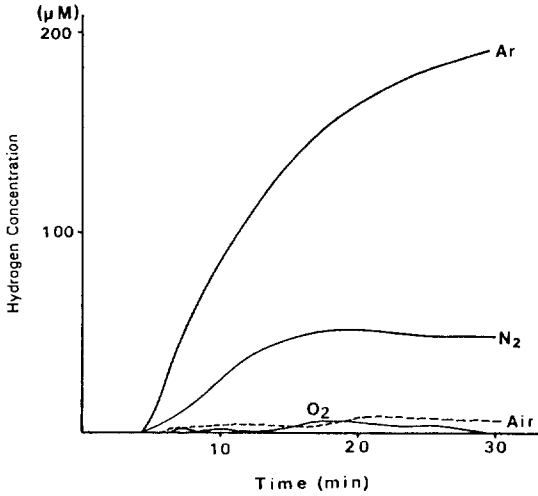


Fig. 2. Effect of gas on hydrogen evolution in the glutamate grown cells.

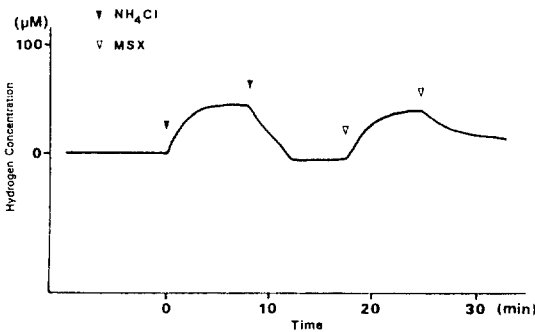


Fig. 3. Effect of ammonia and MSX (methionine sulfoximine) on hydrogen evolution in the glutamate grown cells.

미노산 기질의 N/C비율에 따라 증가하여 생산된 암모니아가 수소발생을 저해한다는 보고(7) 및 methionine sulfoximine가 첨가될 때 nitrogenase의 활성이 증가한다는 보고(14)로 미루어 볼 때, 반응액속의 암모니아농도가 높아질수록 수소생산이 저해되고, methionine sulfoximine을 첨가했을 때 암모니아가 동화되면서 반응액속의 농도가 낮아지게 되어 수소생산이 회복된다고 생각된다. 또한 이러한 현상은 이전의 녹색황세균에서의 실험결과와 일치하였다(5, 8).

**ATP와 NADPH의 영향**

ATP와 NADPH를 처리했을 때 일정농도 이상에서 수소발생이 증폭됨을 보여준다(Fig. 4). 이런 현상은 수소발생을 매개하는 효소계에서 NADPH와 ATP가 중요한 요소가 되고 있음을 나타내 준다.

**빛의 영향**

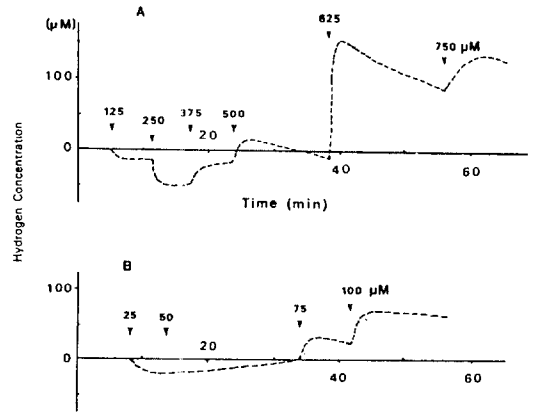


Fig. 4. Effect of NADPH (A) or ATP (B) on hydrogen evolution in the glutamate grown cells.

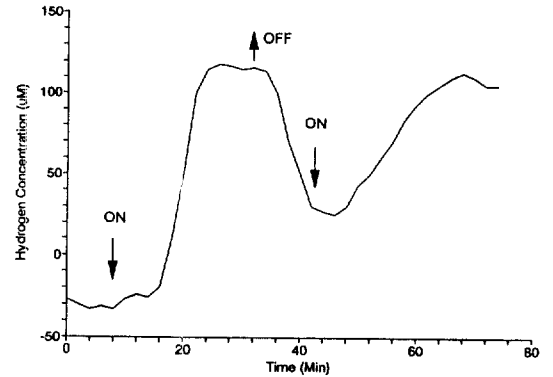


Fig. 5. Effect of light (4,400 Lx) on hydrogen evolution in the glutamate grown cells.

수소생산은 빛에 의존할 뿐만 아니라(Fig. 5), 빛의 세기에 의해서는 미세한 변이를 보여주었다(Fig. 6). 이러한 결과는 자색세균에서 6,500 Lx의 빛에서 성장과 수소생산이 포화되었다는 보고(7)와 광합성에 의한 수소생산시 빛이 전자공여체로부터 낮은 electron potential의 ferredoxin과 같은 reductant에게 전자를 전이시켜주는 energy로 작용한다는 보고(12)를 고려해 볼 때 빛의 파장과 세기가 수소생산에 영향을 끼치고 있다는 증거가 되므로, 앞으로의 빛에 의한 수소발생현상의 실험에는 보다 정교한 파장의 빛이 요구된다.

**수소발생의 조절**

수소생산이 빛에 의존하고, 고농도의 암모늄 이온에 의해 쉽게 저해되었다가 methionine sulfoximine에 의해 빠르게 회복되며, ATP나 NADPH의 농도가 높을수록 수소발생이 증폭되는 것으로 보아 본 균주는 nitrogenase에 의해 수소발생이 일어난다고 생각된다.

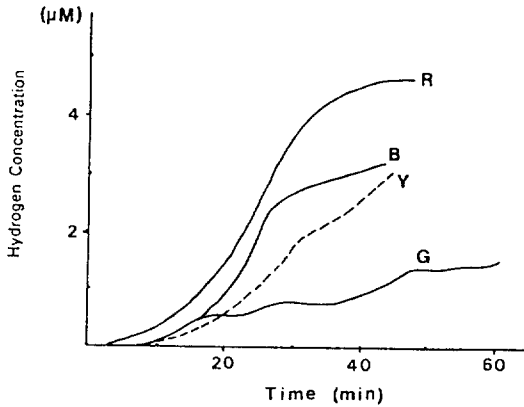


Fig. 6. Effect of light intensity on hydrogen evolution in the glutamate grown cells: Red filter (3,200 Lx), Blue filter (440 Lx), Yellow filter (1,000 Lx), Green filter (1,800 Lx).

따라서 이러한 결과를 종합하여 볼 때 본 균주에서 nitrogenase에 의해 매개되는 수소발생은 전자공여체의 종류, 암모니아 농도, 빛의 유무, 기체의 종류, ATP나 NADPH의 농도 등에 의해 영향을 받고 있음을 알 수 있었다.

### 참 고 문 헌

1. Arp D.J. and W.G. Zumft, 1983. L-methionine-SR-sulfoximine as a probe for the role of glutamine synthetase in nitrogenase switch-off ammonia and glutamine in *Rhodospseudomonas palustris*. *Arch. Microbiol.* **134**, 1722-1725.
2. Colbeau A., B.C. Kelley and P.M. Vignais, 1980. Hydrogenase activity in *Rhodospseudomonas capsulata*: relationship with nitrogenase activity. *J. Bacteriol.* **144**, 141-148.
3. Hallenbeck P.C., 1987. Molecular aspects of nitrogen fixation by photosynthetic prokaryotes. *CRC Rev.* **14**, 1-48.
4. Pfennig, N. and H.G. Trüper, 1984. Anoxygenic photosynthetic bacteria. 1635-1709, In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (J.T. Staley et al., ed), Vol. 3., Williams and Wilkins, Baltimore.
5. Heda G.D. and M.T. Madigan, 1986. Aspects of nitrogen fixation in *Chlorobium*. *Arch. Microbiol.* **143**, 330-336.

6. Hillmer P. and K. Fahlbush, 1979. Evidence for an involvement of glutamine synthetase in regulation of nitrogenase activity. *Arch. Microbiol.* **122**, 213-218.
7. Hillmer P. and H. Gest, 1977. Hydrogen metabolism in the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas sphaeroides*: production and utilization of hydrogen by resting cells. *J. Bacteriol.* **129**, 724-731.
8. Khanna S. and D.J.D. Nicholas, 1983. Some properties of glutamine synthetase and glutamate synthase from *Chlorobium vibrioform f. thiosulfatophilum*. *Arch. Microbiol.* **134**, 98-103.
9. Ormerod J.G., K.S. Ormerod and H. Gest, 1961. Light-dependent utilization of organic compounds and photoproduction of molecular hydrogen by photosynthetic bacteria; relationships with nitrogen metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* **94**, 449-463.
10. Rao K.K., L. Rosa and D.O. Hall, 1976. Prolonged production of hydrogen gas by a chloroplast biocatalytic system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **68**, 21-28.
11. Sweet W.J. and R.H. Burris, 1982. Effects of in vivo treatments on the activity of nitrogenase isolated from *Rhodospirillum rubrum*. *Biochem. Biophys. Acta.* **680**, 17-20.
12. Vignais P.M., J. Meyer and P.C. Hallenbeck, 1981. Photoproduction of hydrogen by photosynthetic bacteria: hydrogenase-nitrogenase interrelationship. 141-161, In: *Proceedings of Symposium on Biochemical basis of solar energy utilization (XVII Meeting of Polish Biochemical Society, 1980)*.
13. Vignais P.M. and A. Colbeau, 1985. Hydrogenase, nitrogenase and hydrogen metabolism in the photosynthetic bacteria. *Adv. Microbial Physiol.* **26**, 156-234.
14. Weare N.M. and K.T. Shanmugam, 1976. Photoproduction of ammonia ion from nitrogen in *Rhodospirillum rubrum*. *Arch. Microbiol.* **110**, 207-213.
15. Wilson J.C., Y. Jouanneau, A. Colbeau and P.M. Vignais, 1983. Hydrogen metabolism in photosynthetic bacteria and relationship to nitrogen fixation. *Ann. microbiol.* **134**, 115-135.
16. Zumft W.G. and F. Castillo, 1978. Regulatory properties of the nitrogenase from *Rhodospseudomonas palustris*. *Arch. Microbiol.* **117**, 53-60.

(Received December 3, 1992)

(Accepted December 18, 1992)

---

**ABSTRACT: Factors Affecting Hydrogen Evolution in *Chlorobium limicola f. thiosulfatophilum* NCIB 8327**

**Na, Jong-Uk and Sa-Ouk Kang** (Department of Microbiology, College of Natural Sciences, and Research Center for Molecular Microbiology, Seoul National University)

Hydrogen produced by cells of grown *Chlorobium limicola f. thiosulfatophilum* NCIB 8327 on modified Pfennig's medium containing glutamate as a major nitrogen source, was measured by amperometric method. In this system, oxygen, light, ammonia, methionine sulfoximine, NADPH, ATP, methyl viologen and benzyl viologen are affected. The production of hydrogen in intact cells depends on light intensity. It is also inhibited by adding ammonium ions, but restores immediately by adding methionine sulfoximine. Considering these results, the production of hydrogen in this strain can be mediated by nitrogenase.