

일산화탄소를 이용하는 혐기성 세균 *Eubacterium limosum* KIST612의 분리 및 동정

장인섭 · 김도희 · 김병홍* · 신평균 · 윤정훈¹ · 이정숙¹ · 박용하¹
한국과학기술연구원 환경연구센터, ¹한국과학기술연구원 생명공학연구소
유전자원센터 유전자은행 생물정보

Isolation and Identification of Carbon Monoxide Utilizing Anaerobe, *Eubacterium limosum* KIST612. In-Seop Chang, Do Hee Kim, Byung Hong Kim*, Pyong Kyun Shin, Jung Hoon Yoon¹, Jung Sook Lee¹ and Yong Ha Park¹. Environment Research Center, Korea Institute of Science and Technology, Seoul, 136-791, Korea. ¹Laboratory of Bioinformation and Systematics/Korean Collection for Type Cultures, Korea Institute of Bioscience and Biotechnology, KIST, Taejeon, 305-600, Korea - Carbon monoxide (CO)-utilizing acetogens were enriched and KIST612 isolated from anaerobic digester fluid was selected for its abilities to tolerate high CO and acetate concentration. The isolate KIST612 was identified as *Eubacterium limosum* based on the morphological and biochemical characteristics, G+C content of DNA and 16S rRNA sequence analysis. *E. limosum* KIST612 produced acetate and butyrate from CO. The optimum temperature and pH for the growth and acids formations were 37°C and 7.0, respectively. The growth rate and acids productivity of *E. limosum* KIST612 were higher than those of any other known acetogens when CO was used as the sole energy and carbon source.

일산화탄소(CO)는 일반적으로 화석연료의 불완전 연소에 의해 생산되는 유독성 가스로 인식되고 있으나 자연계에서도 광합성 부산물 등으로 연간 약 10억 톤 이상이 생산되고 있음이 알려져 있다. 그러나 이들 자연발생적인 CO는 광화학 반응이나 미생물의 기질로 거의 모두 소모되어 일반적으로 대기중의 농도는 0.1 ppm 이하로 유지된다. 반면 산업활동이 활발한 지역의 대기에서는 100 ppm 이상의 CO 농도가 측정되기도 한다. 포항제철의 CO 생산량이 연간 $5.3 \times 10^9 \text{ Nm}^3$ 을 넘고 있으며(1, 2), 이를 2차 연소하여 에너지원으로 사용하는 방법은 CO 함량이 20~60%로 낮기 때문에 비효율적이며 나아가 연소되면서 생산되는 이산화탄소는 온실 효과의 주범으로서 이 가스의 배출 규제를 골자로 하는 국제 기후변화협약이 발효되면 불이익을 받게 될 것이다. 또한 CO는 산업 폐가스 뿐 아니라 biomass와 석탄의 기화로 생산되는 syn-gas의 주성분이다(3). 생산량이 막대한 biomass와 가격이 매우 낮은 coal을 원료로 하여 생산되기 때문에 syn-gas는 석유의 가장 적절한 대체 연료로 판단되고 있다(4). 이러한 이유로 CO로부터 석유화학공업 원료로 전환시키는 공정에 대한 많은 연구가 진행되고 있다. 촉매를 이용하여 syn-gas를 다탄소화합물로 전환시키는 Fis-

cher Tropsch 공정이나, CO/H₂로 부터 methanol을 합성하는 화학공정이 연구되고 있으나 이들은 반응시 높은 온도와 압력을 필요로 하며 촉매의 선택이 산물의 종류를 제한하고 고순도의 CO를 사용해야 효율이 높다는 단점을 갖고 있다. 또한 사용되는 촉매가 원료가스에 함유된 유황화합물에 의해 쉽게 불활성화 되는 어려움도 있다(4-7).

CO를 이용하여 성장할 수 있는 것으로 알려진 미생물은 호기성, 혐기성 생태계에 걸쳐 다양하게 분포한다. 산소를 이용하여 CO를 CO₂로 산화하는 carboxydobacteria가 호기성 균주로 알려지고 있으며, 4 분자의 CO를 이용하여 한 분자의 메탄(CH₄)과 3 분자의 CO₂를 생산하는 메탄생산세균(methanogen), 황산염을 전자수용체로 이용하면서 CO를 산화하는 황산염 환원세균(sulfate reducing bacteria, SRB), 그리고 CO₂를 전자수용체로 이용하여 아세트산(CH₃COOH)을 주산물로 생산하는 아세트산 생산세균(acetogen) 등이 CO를 이용하는 혐기성 미생물로 알려져 있다(8).

Acetogen은 methanol, CO, CO₂ 등 일탄소 화합물을 탄소원으로 이용할 수 있는 acetyl-CoA 경로 (또는 Wood/Ljungdahl 경로)를 가지고 있음이 밝혀진 바 있다(9). Carbon monoxide dehydrogenase (CODH) 경로라고도 알려진 이 대사의 중심적 역할을 담당하는 CODH, 그리고 이 대사 경로에서 이루어지는 에너지 보전에 관한 생화학적 연구와 생태학적인 의의를 규명하기 위한

*Corresponding author
Tel. 82-2-958-5831, Fax. 82-2-958-5805
E-mail: bhkim@kistmail.kist.re.kr
Key words: Acetogen, *Eubacterium limosum*, CO utilizing anaerobe

연구 등 기초 분야의 연구(10-12)와 더불어 acetogen을 이용하여 syn-gas로 부터 acetate, ethanol, butyrate, butanol 등 석유화학 원료를 생산하기 위한 응용 연구도 활발히 진행되고 있다(4, 13-15).

본 연구에서는 혐기성 생태계에서 높은 농도의 CO를 이용하여 성장하는 여러 종류의 혐기성 미생물을 분리하고 이 중에서 CO 이용성과 산물 생산성이 보다 우수한 acetogen을 선별하여 이를 동정하였다.

재료 및 방법

표준 균주

Acetobacterium woodii (ATCC 29683), *Butyribacterium methylotrophicum* (ATCC 33266), *Clostridium aceticum* (ATCC 35044), *Clostridium thermoaceticum* (ATCC 35608) 및 *Eubacterium limosum* (ATCC 10825) 등을 표준 균주로 사용하였으며, autotrophic methanogen인 *Methanobacterium formicicum* MF(OCM 55)을 혼합 배양 실험에 사용하였다.

배지 조성

인산완충기본배지(phosphate-buffered basal medium, PBBM)를 혐기적인 방법으로 제조하여 표준 균주의 배양과 분리균의 농화 배양에 사용하였다. 모든 배지는 trace mineral을 포함한 기본배지를 제조, 살균한 다음 따로 제조, 멸균한 인산완충용액, vitamin 용액 그리고 환원제인 Na_2S 를 균주 접종 직전에 적량 첨가하며 준비하였다. 기본배지는 NaCl 0.9 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, NH_4Cl 1.0 g, trace mineral 10 ml, yeast extract (Difco) 2.0 g 및 redox indicator (resazurin solution, 0.2% w/v) 1.0 ml을 증류수 950 ml에 용해하여 최종 pH는 7.2로 조절하였다. Trace mineral은 chelating agent인 nitrilo-triacetic acid(NTA) 1.5 g/L을 포함하여 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/L, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/L, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.17 g/L, ZnCl_2 0.1 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/L, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.02 g/L, H_3BO_3 0.01 g/L, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g/L, Na_2SeO_3 0.017 g/L, $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.026 g/L 및 NaCl 1.0 g/L을 함유하는 수용액이다. 기본배지를 혐기적인 방법으로 serum vial(50 ml 또는 160 ml, Wheaton, Millville, NJ, USA) 또는 pressure tube (18×150 mm, Bellco Glass Inc., Vineland, NJ, USA)에 배지와 head space의 비가 각각 1:4로 되도록 분주하여 121°C에서 20분간 멸균한다. Filter 제공한 vitamin 용액과 인산완충용액(1 M, pH 7.2)을 기본 배지에 대해 각 1%, 환원제인 Na_2S (2.5%)는 2.5%의 부피 비로 첨가하여 PBBM으로 사용하였다. Vitamin 용액은 biotin 2.0 mg/L, folic acid 2.0 mg/L, lipoic acid 5.0

mg/L, pyridoxine HCl 10.0 mg/L, thiamine HCl 5.0 mg/L, riboflavin 5.0 mg/L, nicotinic acid 5.0 mg/L, pantothenic acid 5.0 mg/L, cyanocobalamine 0.1 mg/L, 및 ρ -aminobenzoic acid 5.0 mg/L로 조성되었다(16). 특별한 언급이 없는 한 기질로 사용한 일산화탄소(99.5%, 울산종합가스)는 vial과 tube 각각의 head space에 분압 1기압으로 무균충진하여 일산화탄소를 기질로 하는 인산완충기본배지(phosphate-buffered basal medium with CO, PBBM/CO)를 준비하였다. Autotrophic methanogen과 혼합배양시 사용한 배지는 PBBM에 phosphate buffer를 제외하고 NaHCO_3 (2.1 g/L)을 첨가한 배지를 serum vial(160 ml)에 40 ml 분주하여 head space에 N_2/CO_2 (80/20)혼합가스를 1기압 무균충진한 탄산완충기본 배지(carbonate-buffered basal medium, CBBM)을 사용하였다. 이때 KH_2PO_4 (1 M)를 PBBM제조시와 동량 첨가함으로써 인산염을 보충하였으며 acetate는 CH_3COONa (50 mM, 4.1 g/L)을 기본 배지에 첨가하였다.

시료채취 및 농화배양

분리용 시료로는 혐기성 소화조 내용물(18점), 토양(17점), 퇴비(4점) 및 폐수(3점)를 사용하였다. 액체시료는 1회용 주사기(녹십자 의료공업)를 이용하여 미리 혐기적인 상태로 유지한 시험관에 옮겼으며, 고체시료는 산소와의 접촉을 차단하여 실험실로 운반하였다. 혐기적으로 제조한 생리 식염수 10 ml에 고체 시료 1 g을 현탁하여 만든 상등액 또는 액체시료 1 ml을 PBBM/CO 10 ml이 들어있는 pressure tube 또는 serum vial(50 ml)에 접종하여 37°C와 50°C water bath에서 정지 배양하였다. 이러한 작업을 3회 반복하여 CO를 이용하는 혐기성 세균을 농화배양 하였다. CO를 이용하는 혐기성 세균 중에서 메탄생산세균과 황산염환원세균을 배제하고 아세트산 생산세균을 선택적으로 분리하기 위해 roll tube 법을 이용하였다(17). 이때 tube에는 2%(w/v) agar를 첨가한 PBBM를 넣고 head space에 CO를 채워 사용하였으며, 산 생산 지시약으로 bromocresol green(BCG)을 0.1 g/L 첨가하였다. 균의 성장에 따라 생산되는 산에 의해 주위의 색이 무색으로 변한 colony는 anaerobic glove box(Coy Lab. Products, Inc., Grass Lake, MI, USA)에서 분리하여 PBBM/CO serum vial에 접종하였다. 분리균은 성장정도와 유기산 생산성을 기준으로 최종 선별하였다.

배 양

최종 선별된 균주의 CO 소비에 따른 성장특성을 파악하기 위한 실험과 *Methanobacterium formicicum* MF와 혼합배양은 shaking water bath(37°C, 150 rpm)에서 배양하였다.

균체량의 측정 및 유기산 분석

균체량은 spectrophotometer(JASCO UVIDEK-610, Tokyo, Japan)로 660 nm에서 흡광도를 측정하여 검량 곡선과 비교하여 측정하였다. 아세트산, 부티르산 등 유기산은 flame ionization detector(FID)가 장착된 gas chromatography(GC, Varian 3400, Sunnyvale, CA, USA)로 분석하였다. Injector와 detector의 온도는 각기 230, 250°C이며 Super Q(Alltech, Deerfield, IL, U.S. A.)를 충전한 glass column(1/4"×6 ft)을 써서 oven 온도를 programming(from 180°C to 230°C at a gradient of 5°C/min) 하여 사용하였다. 유기산 분석을 위한 시료에는 배양상등액 1 ml에 10 M phosphoric acid 0.1 ml 첨가하여 acidifying하고 적량의 propionic acid를 내부 표준물질로 첨가하였다. CO와 CO₂는 thermal conductivity detector(TCD)가 장착된 GC(Varian 3300, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 분석하였다. Carbo-sphere(Alltech, Deerfield, IL, USA)를 충전한 stainless column(1/8"×6 ft)을 사용하였으며, injector와 detector 온도는 90°C, oven 온도는 60°C에서 5분간 유지한 후 180°C까지 분당 30°C씩 증가시켰다. 기체의 분석에는 내부 표준물질을 사용하지 않았으며, 표준 gas (multi-component gas mixtures, Cat No., 19791, Alltech, Deerfield, IL, USA)와 시료의 면적 비를 통하여 계산하였다.

형태학적 특성 분석

광학현미경(Zeiss Jenalumar, Oberkochen, Germany)을 써서 분리균의 Gram염색성을 관찰하였다. 형태학적 관찰을 위하여 2% glutaraldehyde와 1% OsO₄로 고정하여 주사전자현미경(scanning electron microscope, SEM, S-4200 FE-SEM, Hitachi, Japan)과 투과 전자현미경(transmission electron microscope, TEM, JEM 100cx-II, Tokyo, Japan)을 사용하였다(18).

G+C Content와 16S rDNA 분석

분리균의 chromosomal DNA는 Yoon 등(19)의 방법으로 분리하였다. 분리한 chromosomal DNA는 G+C content를 분석하기 위해 Tamaoka 등(20)의 방법을 사용하였다. 열처리로 변성된 DNA는 nucleoside로 가수분해하기 위해 nuclease P1(0.1 mg/ml, Boehringer Mannheim GmbH, Germany)으로 50°C에서 1시간 반응시킨 후 bacterial alkaline phosphatase(Boehringer Mannheim GmbH, Germany)를 첨가하여 다시 37°C에서 1시간 처리하였다. Nucleoside는 YMC-Pack ODS-AM(4.6×150 mm, YMC Co., Ltd, Japan)를 장착한 HPLC(Waters 510, Millipore, Waters Chromatography Div., Milfore, MA, USA)를 이용하여 270 nm에서

분석하였다.

분리된 DNA로부터 polymerase chain reaction(Perkin-Elmer 480, The perkin-Elmer Corp., Norwalk, CT, USA)을 이용하여 16S rRNA gene을 증폭하기 위해 Kim 등(21)의 방법을 따랐으며 이때 사용한 universal primer들은 5'-GAGTT TGATC CTGGC-3'(in *E. coli*, 16S rRNA numbering positions 9 to 27)과 5'-AGAAA GGAGG TGATC CAGCC-3'(in *E. coli*, 16S rRNA numbering positions 1542 to 1525)이다. 증폭된 16S rDNA의 cloning과 sequencing 역시 Kim 등(21)의 방법을 사용하였다.

분석된 16S rDNA의 sequence는 표준 균주를 포함하여 현재까지 알려진 대표적인 acetogen의 16S rRNA의 sequence들과 비교하였으며 K_{mut} value를 구하여 evolutionary distances를 계산하였다(22). 이를 바탕으로 'the neighbor-joining method'로 phylogenetic tree를 구성하였다(23). 분석된 16S rDNA의 sequence는 Gen-Bank의 database(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에 등록되었으며 이의 검색에 필요한 accession number는 U67159이다.

생리 및 생화학적 특성 조사

분리균의 당 이용성을 실험하기 위해 glucose, ribose, trehalose, xylose, starch, sucrose, raffinose, mannitol, maltose, lactose, esculin, cellobiose, arabionose, amygdaline, fructose 및 rhamnose 등 16종의 당이 사용되었다. 이때 PBBM에 0.02%의 yeast extract를 첨가한 배지를 사용하였다. 각각의 당은 최종 농도 0.5%가 되게 첨가하였으며 대조균으로 당을 첨가하지 않은 배지를 사용하였다. 접종 이후 3일간 배양하여 흡광도와 pH를 측정하고 대조균의 그것과 비교, 판단하였다.

기타 생화학적 특성은 표준 방법에 따라 측정하였다(24).

결과 및 고찰

Acetogen의 농화배양과 분리

CO를 유일한 탄소원으로 시행한 일차 농화배양에서 pH의 변화가 적었으며 아세트산 농도도 5 mM 미만으로 낮게 측정되었다. 이는 시료 중에 있던 methanogen이 초기 농화배양에서 acetogen에 의해 생산되는 아세트산을 소비하기 때문으로 판단된다. 그러나 농화배양을 진행함에 따라 유기산의 농도가 증가하여 초기 pH가 7.2에서 6.5이하로 감소됨이 관찰되었으며 계대가 계속됨에 따라 성장속도가 낮은 methanogen이 점차 희석되기 때문에 최종적으로는 acetogen이 우세하였다. 37°C에서 농화배양한 대부분의 시료에 acetogen이 10⁶~10⁸ CFU/

Table 1. Acetate production from CO by selected isolates and type cultures

Strain	Acetate
<i>Acetobacterium woodii</i> ATCC 29683	6.45
<i>Butyribacterium methylotrophicum</i> ATCC 33266	5.22*
<i>Clostridium aceticum</i> ATCC 35044	10.83
<i>Clostridium thermoaceticum</i> ATCC 3560	9.27
<i>Eubacterium limosum</i> ATCC 10825	8.37*
Isolate 7	6.07
Isolate 61	8.65
Isolate 103	15.25
Isolate 311	4.14
Isolate 362	10.85
Isolate 604	6.07
Isolate 612	13.84*
Isolate 642	16.49
Isolate 653	11.32

*Another fermentation product, butyrate was included.

m/의 농도로 존재함이 BCG를 함유한 roll tube 배양으로 확인되었다. 하지만 50°C에서 농화배양한 시료에서는 최소 희석배수로 설정한 10⁴에서도 colony를 확인할 수 없었다. 이러한 BCG 함유 roll tube를 통해 유기산을 생산하는 것으로 확인된 분리균 300 주는 다시 유기산 생산성이 보다 우수한 균주를 선별하기 위해 사용하였다.

Acetogen의 유기산 생산성에 따른 최종 선별

유기산 생산이 확인된 300 주의 분리균을 다시 serum vial(PBBM/CO)에서 배양하여 유기산 생산성을 기준으로 92주를 1차 선별하였다. 이들을 다시 같은 방법으로 배양하여 CO이용성과 유기산 생산성을 기준으로 2차 선별하였다. 이때 유기산 생산성의 기준은 동일한 방법으로 vial(PBBM/CO)을 써서 배양한 표준 균주의 산 생산성으로 하였다. Table 1에서 보는 바와 같이 선별된 대부분의 분리균이 표준 균주들보다 산 생산성이 우수한 것으로 나타났으며 이 중에서 아세트산 이외에도 butyrate를 생산하며 성장속도가 비교적 빠른 분리균 612를 최종 선별하여 KIST612로 명명하였다.

분리균 KIST612의 형태학적, 생리학적 특성 및 동정

분리균 선별 조건을 지속하면서 배양된 분리균 KIST 612는 주사전자현미경을 통하여 균주의 모양과 크기를 확인 할 수 있었다(Fig. 1(A)). 균주의 형태는 간균이었으며 약 0.5×1.5 μm의 크기로 관찰되었다. 균의 특징적인 형태로는 한쪽에 내생포자와 유사한 둥근 모양이 관찰되는 것인데 이는 배양 말기에 보다 빈번히 관찰되었다. 그러나 광학현미경을 사용한 위상차 관찰 결과와 전자현미경 관찰 결과로부터 이것이 내생포자가 아님을 밝혔다. 같은 방법으로 배양한 균주는 다시 투과전자현미

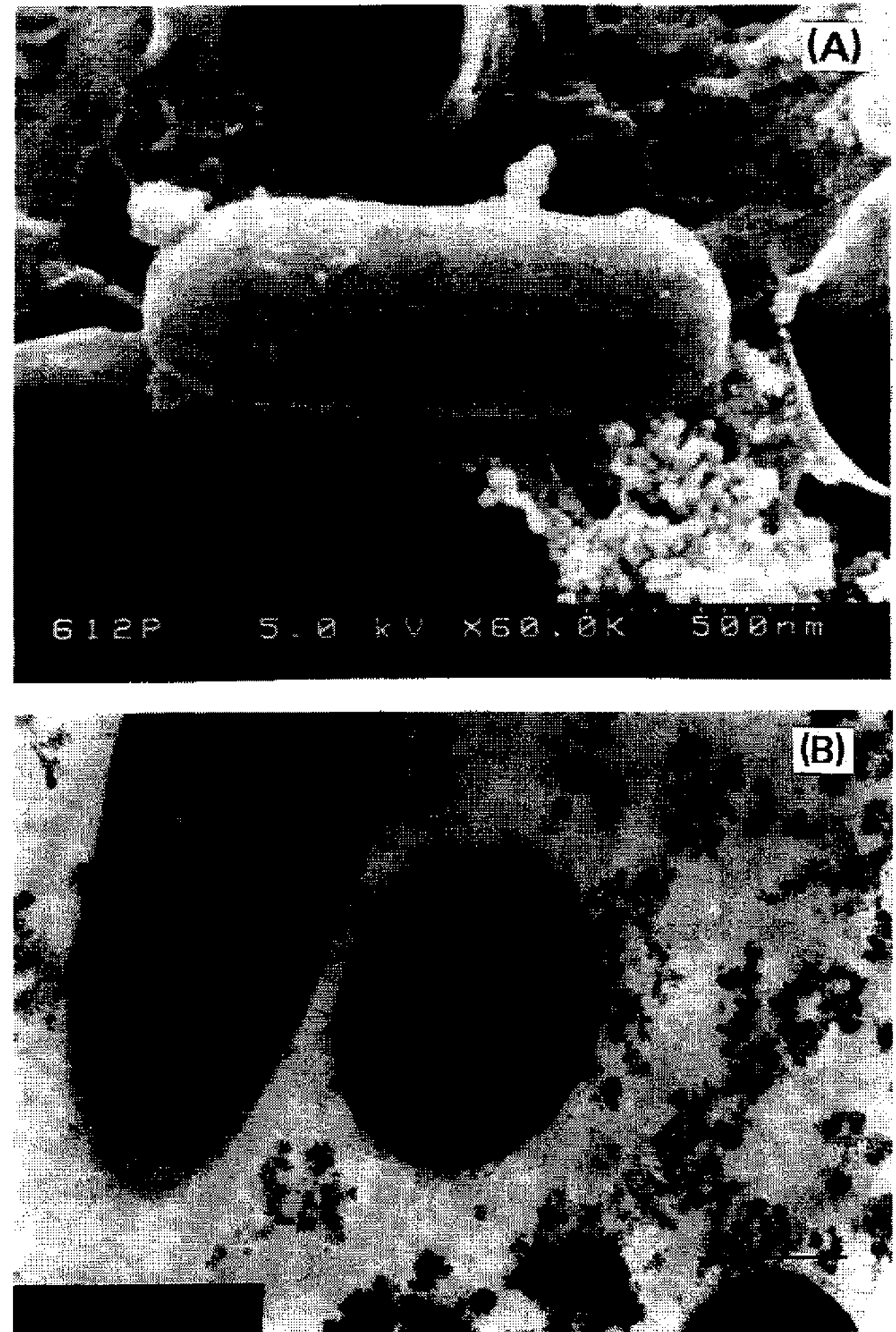


Fig. 1. Scanning(A) and transmission(B) electron micrograph of isolate KIST612.

The scale bar of TEM indicates 0.25 μm.

경으로 관찰한 결과 outer-membrain이 없는 gram 양성 세균의 전형적인 세포벽 형태를 나타내었다(Fig. 1(B)). 이는 Gram 염색 결과와 일치하는 결과이다. 또한 세포벽 외부에서 slime layer와 같은 점질물을 관찰할 수 없었으며, flagella는 관찰되지 않았다.

분리균의 당 이용성을 조사한 결과 조사된 16가지 당 중에서 glucose, fructose, mannitol, ribose 등을 이용할 수 있었다. 하지만 cellobiose, maltose, sucrose 및 lactose와 같은 이당류를 비롯하여 trehalose, xylose, raffinose, arabinose, rhamnose 및 starch는 단일 탄소원으로 이용할 수 없었다. 요오드 반응으로 측정된 결과 starch를 분해하였으나, 산 생산에는 이용할 수 없는 것으로 나타났다. 이러한 성질은 maltose 등 starch의 분해 산물을 이용하지 못하기 때문으로 생각된다.

Maltose 등 분해 산물을 이용하는 능력이 없는 분리균에서 starch를 분해하는 능력이 도태되지 않은 것은 생태계에서 다른 미생물과 공생 관계를 가질 가능성을 시사한다.

Table 2. Physiological and biological characteristics of isolate KIST 612 and *Eubacterium limosum*

Strain	Isolate KIST612	<i>Eubacterium limosum</i> ^a
Gram stain	+	+
Morphology	rod	rod
Glucose	+	A
Ribose	+	Aw
Trehalose	-	-
Xylose	-	-
Starch	-	-
Sucrose	-	-
Raffinose	-	-
Mannitol	+	A-
Maltose	-	-W
Lactose	-	-
Esculin	-	-
Cellobiose	-	-
Arabionose	-	-
Amygdaline	-	-A
Fructose	+	A
Rhamnose	-	-
Starch hydrolysis	+	-+
Esculin hydrolysis	+	+
Indole test	-	-
Nitrate test	-	-
Mol % G+C in	47.4%	46~48%

^aThe symbols of *Eubacterium limosum* were cited Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol 2. Symbols: -, negative reaction for 90~100%; +, positive reaction for 90~100%; A, acid(pH below 5.5); w. weak reaction(pH 5.5~5.9, sugars). When two reactions are given, the usual reaction is listed first.

Esculin도 분해되었으나 질산염을 전자수용체로 이용하지 않았으며, indole을 생산하지 않았다(Table 2).

분리균의 G+C 함량은 47.4%로 측정되었으며 16S rRNA sequence분석에 의한 상동성 비교 결과, 분리균 KIST612는 분자계통학적으로 acetogen의 한 종류인 *Eubacterium limosum*과 가장 유사한 균주인 것으로 밝혀졌다(Table 2, Fig. 2).

분리균의 성장최적 조건

많은 acetogen이 약 37°C가 성장 최적온도인 mesophile이나 *C. thermoaceticum* 등과 같이 55°C에서 최적 성장을 보이는 thermophile도 있다. KIST612는 37°C에서 진행된 농화배양에서 분리되었으며 따라서 37°C가 성장최적 온도인 mesophile일 것으로 생각되었다. 이는 각각 다른 온도에서 pressure tube를 사용한 배양을 통해 확인할 수 있었다(Fig. 3). 분리균의 성장에 적합한 pH를 확인하기 위해서 pH 4.34와 5.15는 10 mM acetate buffer를 6.20과 6.98은 10 mM phosphate buffer를, 그리고 pH 8.00은 10 mM glycine·NaOH buffer를 사용하

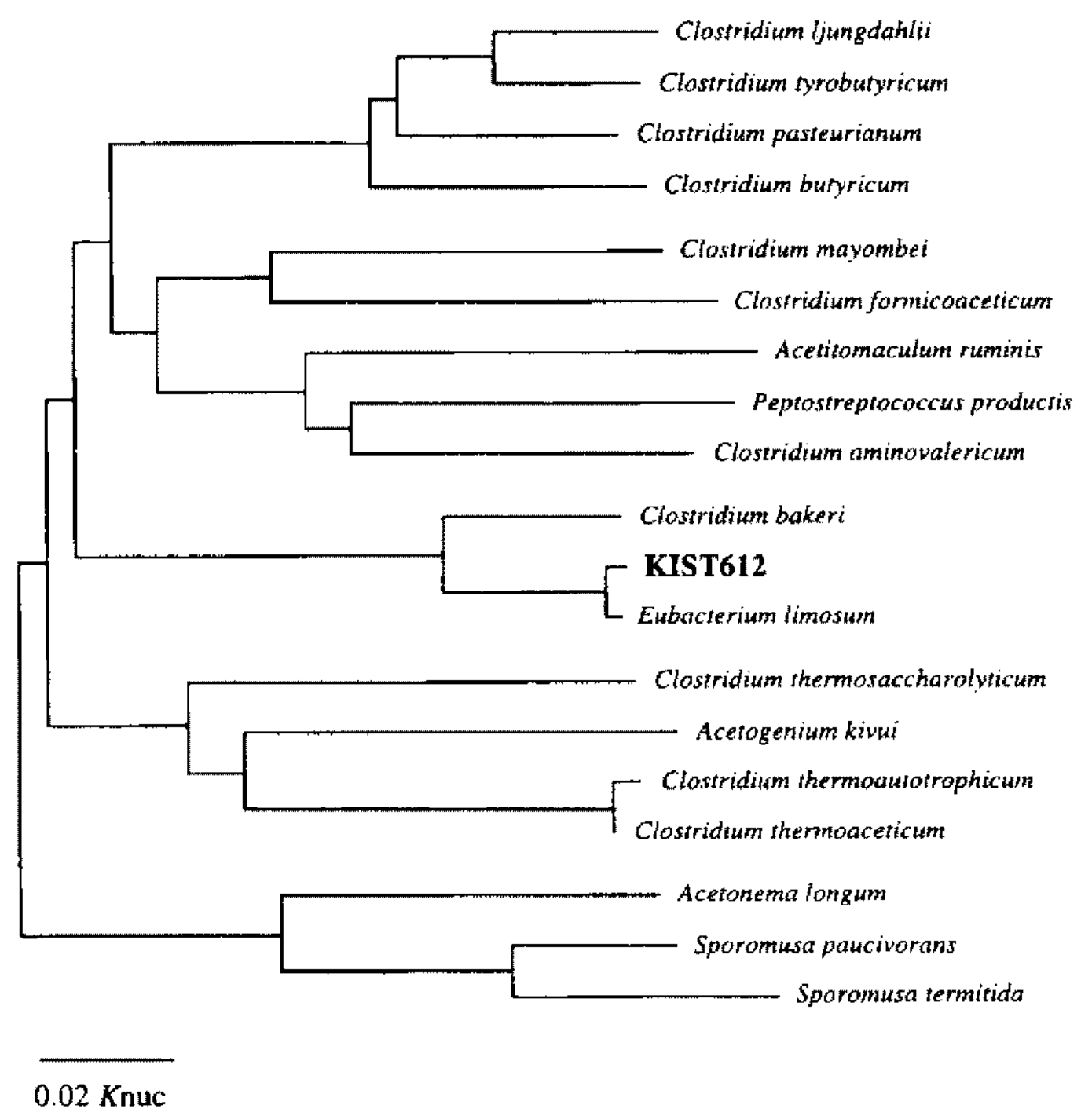


Fig. 2. Phylogenetic relationship of the acetogens including isolate KIST612, as determined from 16S rRNA sequence analysis.

The scale bar indicates a distance corresponding to a 0.02 K_{nuc} .

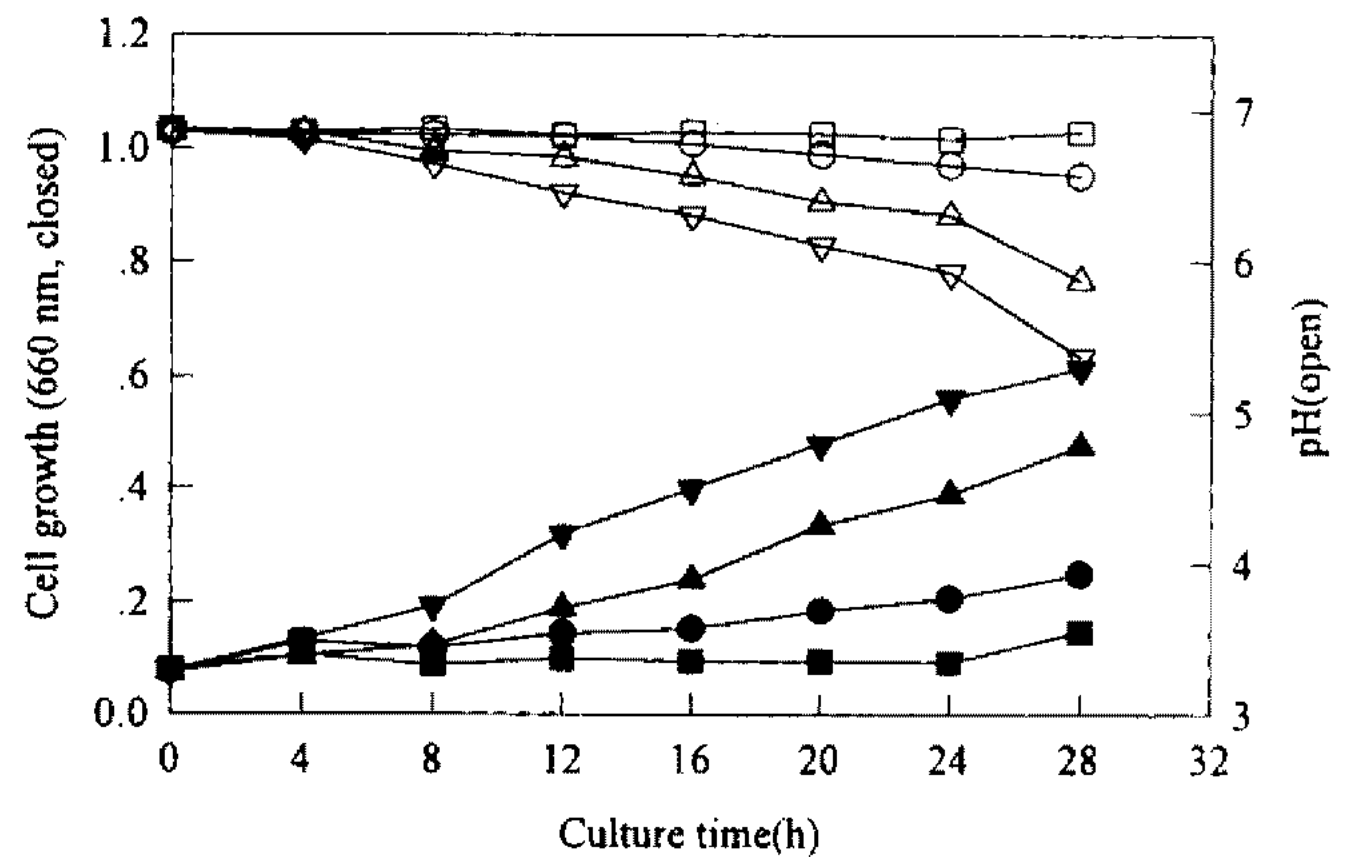


Fig. 3. The effect of temperature on the growth of isolate KIST612 on the PBBM with a gas phase containing CO as the energy source.

The total of 50% CO and N₂ were added by pressurizing tubes to 2 atm. The tubes were contained 10 ml of PBBM and inoculated 5%(v/v)of concentrations. The cultures were cultivated at 25(○, ●), 30(△, ▲), 37(▽, ▼) and 50°C(□, ■), respectively. Each point is the mean value of triplicate cultures.

였으며 모든 배지의 인산염 농도는 동일하도록 조절하였다. 그 결과 배양 최적 pH는 중성 부근인 것으로 판단되나 6.2와 6.98 역시 성장에 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 4).

분리균 KIST612의 CO 이용성

Butyribacterium methylotrophicum CO strain은 100%

의 1기압 CO에서 생장이 가능하고 acetate 이외에도 butyrate를 생산하지만 mass doubling time이 12시간 이상으로 그 생장이 느리며(25), KIST612와 생리학적으로 유사한 *Eubacterium limosum* RF strain 역시 낮은 CO 농도(분압 0.75 기압 이하)에서 생장이 가능하며 이때의 mass doubling time이 약 7시간으로 알려져 있다(26). 그러나 분리균 KIST612는 CO농도가 각각 1 atm(101.3 kPa, 50%)과 2 atm(202.6 kPa, 100%)인 경우에도 mass doubling time이 3~4 시간인 것으로 측정되었다(Table 3). 또한 CO를 유일한 기질로 공급하는 조건에서 지속적으로 계대 배양한 결과 성장 초기에 나타나는 유도기가 거의 존재하지 않게 되었다(Fig. 5). 표준 균주로 사용한 *Peptostreptococcus productus* U-1 strain은 성장 속도 면에서는 분리균 KIST612와 유사하거나 그 이상인 것으로 보이나, acetate 이외의 유기산은 생산하지 못하며 배양 초기의 CO 분압이 1기압 이상이면 성장 유도기

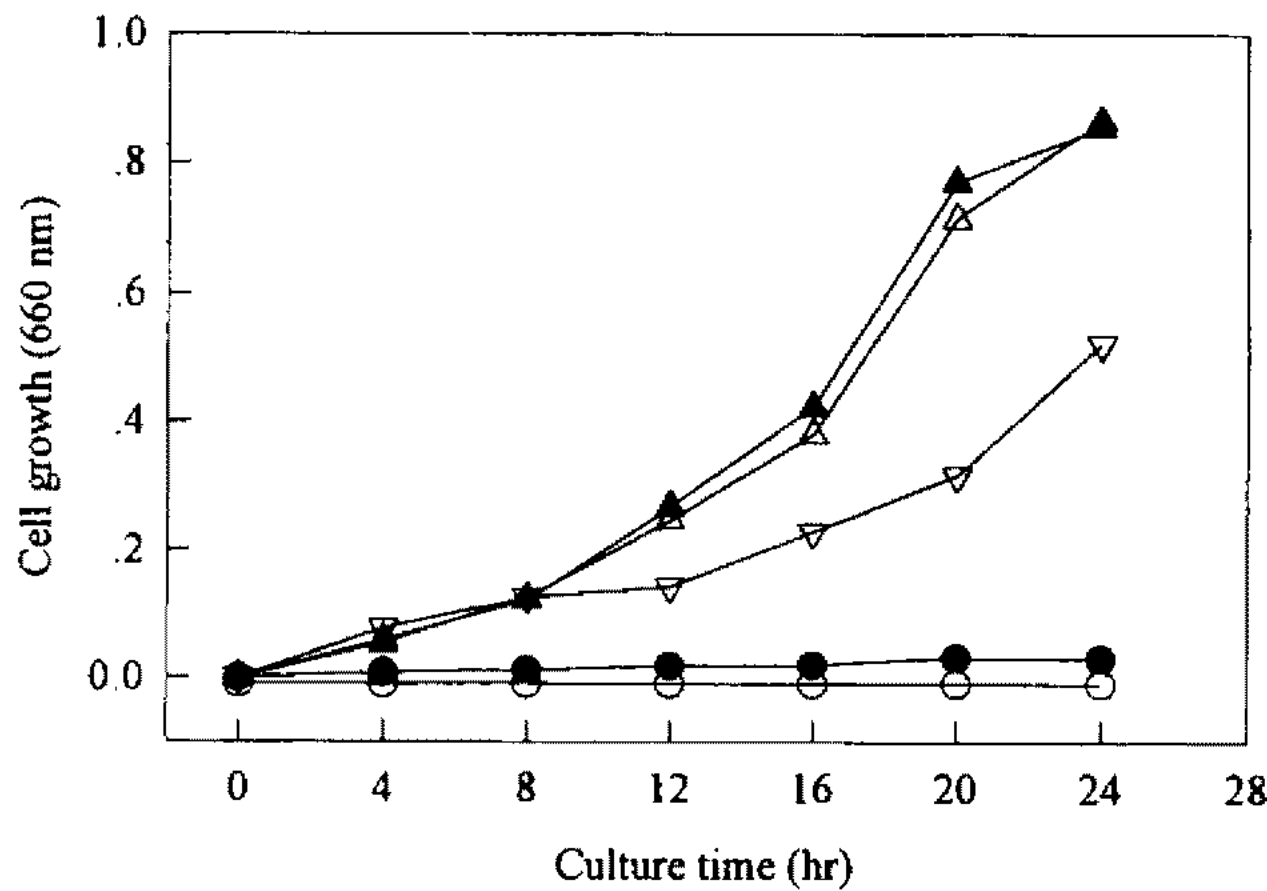


Fig. 4. The effect of initial pH on the growth of isolate KIST612 in basal medium(BM) with a gas phase containing CO as the energy source.

The total of 50% CO and N₂ were added by pressurizing tubes to 2 atm. The tubes were contained 10 ml of BM and acetate buffer(10 mM, pH 4.34, ○, 5.15, ●), phosphate buffer(10 mM, pH 6.20, △, pH 6.98, ▲) and glycine NaOH buffer(10 mM, pH 8.00, ▽). The cultures were inoculated 0.5 ml of PBBM/CO adapted culture grown to late log phase. Each point is the mean value of triplicate cultures.

간이 길게 요구되는 점 등이 보고되었다(27-29).

이상의 결과로부터 분리균 KIST612는 비교된 표준 균주에 비해 CO에 대한 내성이 우수하며 동시에 유기산 생산성이 우수함을 알 수 있었다.

Autotrophic Methanogen과의 혼합 배양

혐기 생태계에서 유기물은 일차적으로 발효되어 유기산, 알코올 등 수용성 산물과 H₂, CO₂ 등 기체로 전환된다. H₂와 CO₂는 chemolithotrophic한 혐기성 세균의 에너지 및 탄소원으로 이용된다. 이들 중 sulfate-reducing bacteria(SRB)는 methanogen과 acetogen에 비해 열역학적으로 우세하다. 따라서 황산염이 풍부한 혐기 생태계에서는 SRB가, 황산염 농도가 낮은 조건에서는 methanogen이 H₂와 CO₂를 소비하는 것으로 알려져 있다(8, 30).

SRB, methanogen과 더불어 acetogen도 모든 혐기 생태계에서 분리되고 있으나 혐기 생태계에서 acetogen의 정확한 역할과 중요성은 아직도 규명되고 있지 않다. 그 주된 이유의 하나는 주산물인 acetate가 생태계에서 쉽

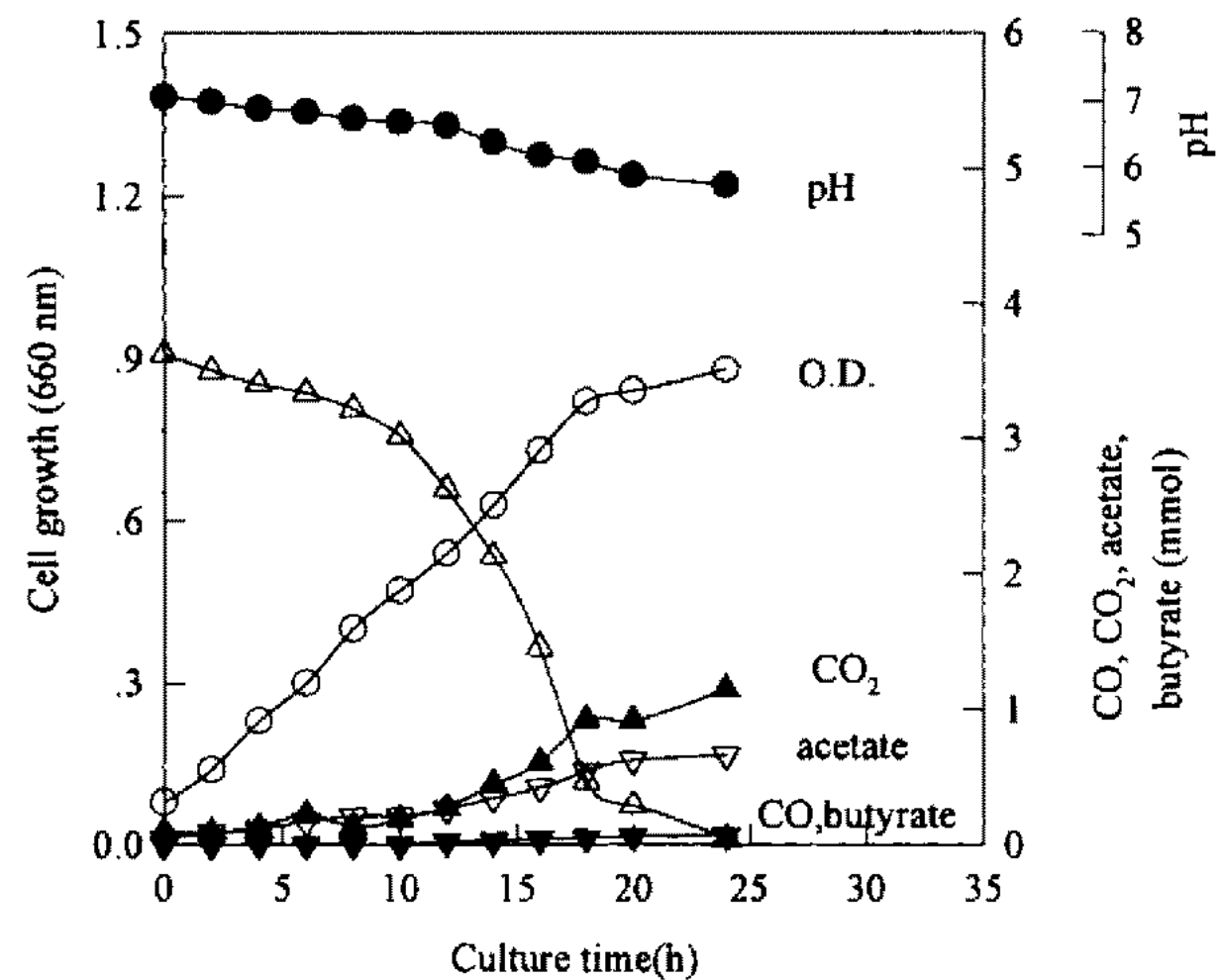


Fig. 5. The growth of isolate KIST612 on the PBBM with CO.

The total of 50% CO and N₂ were added by pressurizing serum vial to 2 atm. Vials were contained 80 ml of PBBM and inoculated 5%(v/v) of concentrations.

Table 3. CO-dependent cultural characteristics of isolate KIST612 and several acetogens

Strain	Isolated place	Gas composition (N ₂ : CO ₂ : CO)	Pressure (total, kPa)	Media	Culture condition	Doubling time(h)	Ref.
<i>E. limosum</i> RF	Rumen fluid	30 : 20 : 50	202.6	5% R.F. ^a	n.m. ^b	7	(25)
<i>B. methylotrophicum</i> CO	Marburg strain	0 : 0 : 100	101.3	0.05% Y.E. ^c	shaking	13.9	(26)
<i>P. productus</i> U-1	Sewage digest	30 : 20 : 50	202.6	0.2% Y.E.	shaking	1.5	(27, 28)
<i>P. productus</i> U-1	Sewage digest	variable ^d	202.6	0.01-0.4% Y.E.	shaking	3.3	(29)
Isolate KIST612	Anaerobic digest	50 : 0 : 50	202.6	0.2% Y.E.	shaking	2.5~3.0	
Isolate KIST612	Anaerobic digest	0 : 0 : 100	202.6	0.2% Y.E.	shaking	4.0~4.2	

^aR.F., rumen fluid, ^bn.m., not mentioned, ^cY.E., yeast extract, ^dInitial CO partial pressures were 22, 28, 80, 148 and 172 kPa with 20% of CO₂.

Table 4. Methane production and acetate consumption in the pure and coculture of *Eubacterium limosum* KIST612 and *Methanobacterium formicicum* MF

Culture	Time (day)	Gas phase ^a	CH ₄ production (mmol)	Acetate consumption (mmol)
<i>M. formicicum</i> MF	3	H ₂ /CO ₂	5.8	n.d. ^b
<i>M. formicicum</i> MF	30	N ₂ /CO ₂	n.d.	n.d.
<i>E. limosum</i> KIST612	30	N ₂ /CO ₂	n.d.	n.d.
<i>M. formicicum</i> MF with <i>E. limosum</i> KIST612	30	N ₂ /CO ₂	<0.05	<0.04

^aThe composition of gas phases(H₂/CO₂ and N₂/CO₂)were 80/20, respectively. ^bn.d.: not detected.

게 전환되기 때문이다. 이러한 현상은 본 실험의 CO 이 용균 탐색을 위한 농화배양에서도 관찰되었다. 실제로 혐기성 생태계에서 산물로 가장 많이 생산되는 methane의 약 75%가 acetate의 분해로 생성되는 것으로 보고되었다(9). 그러나 실제 혐기 생태계에는 autotrophic methanogen이 aceticlastic methanogen보다 우세하다(9, 30).

Lee 등(31)은 chemolithotrophic methanogen과의 혼합에서 10⁻⁴ bar(10 Pa)이하의 수소분압이 유지되어 acetate를 산화하며 성장할 수 있는 세균(Acetate Oxidizing Rod, AOR)을 분리, 보고한 바 있다. AOR은 수소분압이 높은 상태에서는 이산화탄소를 아세트산으로 환원하면서 성장하는 acetogen의 일종이다. 이러한 대사적 특성 때문에 reversibacterium이라고 불리기도 하는데 다른 acetogen에도 이러한 유연한 생리적 특성이 있는지는 밝혀지지 않고 있다. 분리균 *E. limosum* KIST612도 chemolithotrophic methanogen인 *Methanobacterium formicicum* MF과 혼합 배양한 결과 아세트산의 소비와 methane의 생산이 관찰되지 않았다(Table 4).

분리균의 응용 전망

분리균 *E. limosum* KIST612는 기존에 알려진 어떠한 균주보다도 CO에 대한 내성이 크며 이를 유일한 탄소 및 에너지원으로 이용하여 활발히 성장하면서 아세트산 및 butyrate 등의 유용한 유기산을 생산하는 균주로 조사되었다. 이는 산업 폐가스 등에 함유된 다량의 CO 및 CO₂를 활용, 처리하는 보다 경제적이며 환경친화적인 새로운 미생물학적 방법의 개발을 위한 필수 요건이다. 또한 제철 폐가스에 함유된 다량의 유황화합물은 다양한 화학 촉매를 불활성화시킴으로써 안정적 운용이 문제시되고 있는데 반하여 분리균과 같은 혐기성 미생물을 이용하는 생물학적 공정이 가능하다면 오히려 일정량의 황화합물이 혐기적 조건의 유지에 도움이 될 수 있는 장점이 있다.

요 약

일산화탄소를 이용하는 acetate 생산세균을 농화배양하여 고농도의 일산화탄소에 내성이 있으며 acetate 생

산성이 높은 KIST612를 혐기성 소화조 오니에서 분리하였다. 분리균 KIST612는 형태학적 특성과 DNA중의 G+C 함량, 16S rRNA 염기 서열 분석 등의 생화학적 특성을 바탕으로 *Eubacterium limosum*으로 동정되었다. *E. limosum* KIST612는 일산화탄소로 부터 acetate와 butyrate를 생산하였고 성장 및 산생산의 최적 온도와 pH는 각각 37°C, 7.0이었다. 일산화탄소를 유일한 에너지원 및 탄소원으로 사용할 경우 *E. limosum* KIST612의 성장속도와 산생산성은 기존에 알려진 어느 아세트산 생산세균보다 우수하였다.

감사의 말

본 연구는 과학기술처의 특정연구개발사업의 일부로 수행되었다.

참고문헌

1. 김병홍. 1993. 무공해신공정개발, 일산화탄소발효. 생물화공. 7: 66-72.
2. 에너지기술편람. 1996. 포항제철
3. Datta, R. and J. G. Zeikus. 1983. Anaerobic bioconversion of one-carbon compounds. *Dev. ind. Microbiol.* 24: 131-140.
4. Chatterjee, S., A. J. Grethlein, R. M. Worden, and M. K. Jain. 1996. Evaluation of support matrices for an immobilized cell gas lift reactor for fermentation of coal derived synthesis gas. *J. Ferment. Bioeng.* 81: 158-162.
5. Anderson, R. B., H. K. Ibel, and M. Ralek. 1984. *The Fischer-Tropsch synthesis*, Pp 229-264. 1st ed. Academic Press Inc., Orlando, Florida.
6. Bridger, G. W. and M. S. Spencer. 1989. Methanol synthesis, Pp 441-468. In M. V. Twigg(ed.), *Catalyst handbook*, Wolfe Publishing Ltd, Torrington Place, London.
7. Nega, J. L., K. T. Klasson, D. E. Kimmel, E. C. Clausen, and J. L. Gaddy. 1990. Sulfur gas tolerance and toxicity of CO-utilizing and methanogenic bacteria. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 24/25: 329-340.
8. 김병홍. 1995. 미생물 생리학, Pp 313-318. 2th ed. 아카데미서적, 서울.
9. Drake, H. L. 1994. Acetogenesis, acetogenic bacteria, and

- the acetyl-CoA "Wood/Ljungdahl" and current perspectives, Pp 3-60. In H. L. Drake(ed.), *Acetogenesis*, Chapman & Hall, New York.
10. Ljungdahl, L. G. 1986. The autotrophic pathway of acetate synthesis in acetogenic bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **40**: 415-450.
 11. Diekert, G. and G. Wohlfarth. 1994. Energetics of acetogenesis from C1 units, Pp 157-179. In H. L. Drake (ed.), *Acetogenesis*, Chapman & Hall, New York.
 12. Davidova, M. N., N. B. Tarasova, F. K. Mukhitova, and I. U. Karpilova. 1994. Carbon monoxide in metabolism of anaerobic bacteria. *Can. J. Microbiol.* **40**: 417-425.
 13. Worden, R. M., A. J. Grethlein, M. K. Jain, and R. Datta. 1991. Production of butanol and ethanol from synthesis gas via fermentation. *Fuel.* **70**: 615-619.
 14. Worden, R. M., A. J. Grethlein, J. G. Zeikus, and R. Datta. 1989. Butyrate production from carbon monoxide by *Butyribacterium methylotrophicum*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **30/31**: 587-698.
 15. Grethlein, A. J., R. M. Worden, M. K. Jain, and R. Datta. 1991. Evidence for production of n-butanol from carbon monoxide by *Butyribacterium methylotrophicum*. *J. Ferment. Bioeng.* **72**: 58-60.
 16. Diekert, G. 1991. The acetogenic bacteria. Pp 517-533. In A. Balows, H. G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, K.-H. Schleifer(eds.), *The Prokaryotes*, Vol. 1, Springer-Verlag, New York.
 17. Hungate, R. E. 1969. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. Pp 117-132 In J. R. Norris, D. E. Ribbons(eds.), *Methods in Microbiology*, Vol. 3B, Academic press, New York.
 18. Beveridge, T. J., T. J. Popkin, and R. M. Cole. 1994. Electron microscopy. Pp 42-71. In P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood, n. R. Krieg (eds.), *Methods for General and Molecular Bacteriology*, American Society for Microbiology, Washington, D. C.
 19. Yoon, J. H., H. I. Kim, S. B. Kim, H. J. Kim, W. Y. Kim, S. T. Lee, M. Goodfellow, and Y. H. Park. 1996. Identification of *Saccharomonospora* strains by the use of genomic DNA fragments and rRNA gene probes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**: 502-506.
 20. Tamaoka, J. and K. Komagata. 1984. Determination of DNA base composition by reversed phase high-performance liquid chromatography. *FEMS. Microbiol.* **25**: 125-128.
 21. Kim, S. B., J. H. Yoon, H. I. Kim, S. T. Lee, Y. H. Park, and M. Goodfellow. 1995. A phylogenetic analysis of the genus *Saccharomonospora* conducted with 16S rRNA sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**: 351-356.
 22. Kimura, M 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* **16**: 111-120.
 23. Satiou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.
 24. Simbert, R. M. and N. R. Krieg. 1994. Phenotypic characterization, Pp 607-654. In P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood, N. R. Krieg (eds.), *Methods for General and Molecular Bacteriology*, American Society for Microbiology, Washington, D. C.
 25. Genthner, B. R. S. and M. P. Bryant. 1982. Growth of *Eubacterium limosum* with carbon monoxide as the energy source. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**: 70-74.
 26. Lynd, L., R. Keeby, and J. G. Zeikus. 1982. Carbon monoxide metabolism of the methylotrophic acidogen *Butyribacterium methylotrophicum*. *J. Bacteriol.* **149**: 255-263.
 27. Lorowitz, W. H. and M. P. Bryant. 1984. *Peptostreptococcus productus* strain that grows rapidly with CO as the energy source. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 961-964.
 28. Geerilngs, G., H. A. Aldrich, W. Hander, and G. Diekert. 1987. Isolation and characterization of a carbon monoxide utilizing strain of the acetogen, *Peptostreptococcus productus*. *Arch Microbiol.* **148**: 305-313.
 29. Vega, J. L., V. L. Holmberg, E. C. Calausen, and J. L. Gaddy. 1989. Fermentation parameters of *Peptostreptococcus productus* on gaseous substrates (CO, H₂/CO₂) *Arch. Microbiol.* **151**: 65-70.
 30. Schink, B. 1994. Diversity, ecology, and isolation of acetogenic bacteria. Pp 197-235. In H. L. Drake(ed.), *Acetogenesis*. Chapman & Hall, New York.
 31. Lee, M. J. and S. H. Zinder. 1988. Isolation and characterization of a thermophilic bacterium which oxidizes acetate in syntrophic association with a methanogen and which grows acetogenically on H₂-CO₂. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 124-129.

(Received 9 September 1996)