

Clostridium butyricum [절대혐기발효세균] 과 *Thiocapsa roseopersicina* [홍색유황세균] 의 수소생산 효소 특성 비교

백진숙, 윤영수, 김미선[†]
한국에너지기술연구원 바이오매스연구센터

Comparison of hydrogenases prepared from *Clostridium butyricum* and *Thiocapsa roseopersicina*

Jin-Sook Baek, Young-Su Yun and Mi-Sun Kim[†]
Biomass research center, Korea Institute of Energy Research, 71-2,
Jang-dong, Yuseong-gu, Daejeon, 305-343 Korea

ABSTRACT

Fermentative strict anaerobic bacterium, *Clostridium butyricum* NCIB 9576 (*Cl. butyricum*) and purple sulfur phototrophic bacterium, *Thiocapsa roseopersicina* NCIB 8347 (*T. roseopersicina*) were compared on their temperature and oxygen stabilities of cytoplasmic hydrogenases. Cell growth phase and the specific activities of evolution H₂ase were related for both strains, exhibiting the highest cytoplasmic H₂ase activities during the logarithmic growth phases which were 4 and 18 hrs after the incubation for *Cl. butyricum* and *T. roseopersicina*, respectively. The optimum temperatures for the growth of *Cl. butyricum* and *T. roseopersicina* were 37°C and 27°C, respectively, while those for H₂ evolution of cytoplasmic hydrogenases prepared from *Cl. butyricum* (C-H₂ase) and *T. roseopersicina* (T-H₂ase) were 45°C and 65°C, respectively. T-H₂ase was more thermo-stable than C-H₂ase. T-H₂ase retained its full activity for 5 hrs at 50°C and retained 90% of its original activity for 5 hrs at 60°C, however, C-H₂ase lost its activity drastically at 50°C. The optimum pHs for H₂ oxidation of C-H₂ase and T-H₂ase were 9.0 and 7.5 respectively. The both enzymes showed maximum H₂ evolution activity at pH 7.0. Under the aerobic condition, 80% of T-H₂ase activity was retained for 10 hrs at 30°C, and 50% of activity was still remained after 6 days at the same experimental conditions. But the C-H₂ase was labile to oxygen and lost its activity immediately after the exposure to air.

주요기술용어: *Clostridium butyricum* NCIB 9576 (절대혐기 발효세균), *Thiocapsa roseopersicina* NCIB 8347 (홍색유황세균), and Hydrogenase (수소화 효소)

[†] Corresponding author :bmmskim@kier.re.kr

1. 서 론

Hydrogenase는 분자상의 수소를 산화하거나, 양성자와 전자로부터 분자상의 수소를 생산하는 다음의 가역반응($H_2 \rightleftharpoons 2H^+ + 2e^-$)을 촉매하는 효소이며, 혐기성 또는 호기성 세균, 일부의 조류, 녹색식물, 원생동물에서도 발견되고 있다.

Hydrogenase(H_2ase)는 촉매작용 중심위치에 존재하는 금속의 종류에 따라 크게 2 개의 family, 즉 NiFe H_2ase ¹⁾와 Fe-only H_2ase ²⁾로 나뉜다. 일부의 NiFe H_2ase 는 selenium을 함유하여 selenocysteine 형태를 갖는 것도 보고되고 있다¹⁾. 두 개의 family는 기능상으로 서로 매우 다르며, NiFe hydrogenase가 주로 수소의 산화 반응에 관여하는 반면 Fe-only hydrogenase는 수소의 생산 반응에 주로 관여한다. 또한 NiFe hydrogenase는 약 $10^{-1} - 10^{-2}$ 배 정도 낮은 활성을 가지며 산소나 일산화탄소에 대한 내성은 더 높은 것으로 알려져 있다³⁾. NiFe- H_2ase 는 Thiocapsa roseopersicina 및 Rhodobacter capsulatus 와 같은 광합성 세균에 존재하며^{4,5)}, Fe H_2ase 는 혐기 발효세균인 Clostridium pasteurianum⁶⁾ 및 Clostridium acetobutyricum⁷⁾에 존재하는 것으로 보고되었다.

H_2ase 가 갖는 구조적인 다양성과는 달리 기능은 단순하여 거의 모든 것이 직접, 간접적으로 세포의 에너지 대사에 관여한다. 즉 호흡, NAD(P)H 형성, 또는 메탄생성과 같은 세포내 에너지 보존에 관련한 수소 산화반응을 하거나, H^+ 을 환원하여 H_2 를 발생함으로써 세포내의 과도한 환원전위를 낮추는 역할을 한다⁷⁾. 거의 모든 Archaea에는 H_2ase 가 존재하며 효모나 하등진핵세포에는 이 유전자가 발견되지 않았지만 세포내의 수소대사는 미생물내의 중요한 역할로 Escherichia coli 나 Methanococcus voltae에는 4 개의 다른 hydrogenase가 발견되었으며, 그 외에도 2 개 이상 존재하는 미생물도 자연계에 다수가 존재한다.

1931년 hydrogenase가 발견된 이후 상당한 연구가 genetic diversity (유전자 다양성), phylogenetic tree (계통 분류), catalytic property (촉매 특성)를 중심으로 축적되어왔으며, 특히 hydrogenase의 구조적인 특징에 관한 연구가 집중적으로 수행되었다⁸⁾.

생물학적인 방법에 의한 수소생산은 수소경제 시대의 중요한 수소제조기술중의 하나로써 선진국에서도 활성화 되고 있다⁹⁾. 특히 H_2ase 는 수소 생산에 관여하는 중요효소로써 연구에 초점이 되고 있으며, 이 효소를 상업적으로 수소생산에 이용하기위한 중요한 관점의 하나는 열, pH, 산소에 대한 즉 외부 환경에서의 안정성이다.

본 연구에서는 절대 혐기발효세균인 Clostridium butyricum에서 분리한 H_2ase (C- H_2ase)와 광합성 유황세균인 Thiocapsa roseopersicina의 H_2ase (T- H_2ase)를 분리하여 그 특성을 비교 연구하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 사용 균주 및 배양 조건

Modified PYG 액체 배지에서 종균배양한 Cl. butyricum NCIB 9576 균체를 동일한 새 액체 배지에 660 nm에서 흡광도가 0.1이 되도록 접종하여 37°C에서 혐기 배양하였다¹⁰⁾. 밀폐된 배양기를 아르곤 가스로 치환하여 혐기 조건을 만들었고 균체농도가 660 nm에서 흡광도 1.6-1.8이 되도록 약 6시간 동안 배양하였다.

Sistrom 합성 배지에서 종균배양한 T. roseopersicina NCIB 8347 균체를 0.05% acetate를 함유한 Pfennig's mineral 액체 배지에 660 nm에서 흡광도가 0.1이 되도록 접종하여 25°C에서 할로겐 등을 8,000 lux의 세기로 조사하며 균체농도가 660 nm에서 흡광도 0.7이 되도록 18 시간 동안 배양하였다¹¹⁾. 배양기에 이산화탄소를 1% 함유한 질소를 100 ml/min 속도로 공급하여 광합성 독립영양 조건으로 배양하였다.

2.2 배양시간에 따른 H₂ase의 활성측정

Cl. butyricum NCIB 9576을 전술한 방법으로 배양하면서, 2시간 간격으로 12 시간 동안 생성된 수소 양, 균체 농도, 배양액 pH 및 H₂ase 활성을 측정하였다. H₂ase 활성 측정을 위해서 배양액을 5,000×g에서 20 분간 원심분리하여 균체를 모은 후, sonicator (Fisher scientific model 550, Biorad)로 5분씩 3번 파쇄 하였다. 파쇄액을 10,000×g 에서 20 분간 원심분리하여 상등액으로부터 cell-free extract를 얻었고, 이를 다시 80,000×g 로 1 시간 동안 초원심분리하여 상등액을 취하여 cytoplasmic 분획을 준비하였다. 균체의 파쇄 및 원심분리는 모두 4℃에서 이루어졌다.

T. roseopersicina NCIB 8347도 전술한 방법으로 배양하면서 배양시간별로 균체를 수확하여 균체농도와 H₂ase 활성을 측정하였다¹²⁾.

2.3 H₂ase 활성 측정

수소생산 활성 (H₂ evolution)은 dithionite로 환원된 methyl viologen을 이용하여 H₂ase에 의해 발생하는 수소 양을 gas chromatograph 14-B (Shimadzu, kyoto, Japan)로 분석하여 측정하였다¹³⁾. 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 H₂ase를 넣어 반응을 시작하였다. 이때 MV는 50mM 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 nmole의 수소가 생산되는 양으로 정하고, 효소 비활성도는 unit/mg-단백질 으로 정하였다.

수소 산화 활성 (H₂ oxidation)은 수소가스로 포화된 methylene blue 염색시약의 H₂ase에 의한 산화 반응에 의한 탈색을 분광광도계 (UV/VIS, Shimadzu, kyoto, Japan) 로 분석하였다¹⁴⁾. 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 반응온도에서 30분간 평형에 이르게 한 후 적당한 비율로 희석된 0.5 ml의 H₂ase를 넣어 반응을 시작하였다. 반응 시작 후 10분 후에 탈색정도를 분광광도계로 측정하였다. 효소 활성 1 unit은 분당 1 nmole의 methylene blue가 산화되는 양으로 정하고, 효소 비활성도는 unit/mg-단백질 으로 정하였다.

단백질 농도는 bovine serum albumin을 표준 시료로 하여 Lowry method (Bio-rad protein assay)를 이용하여 측정하였다.

2.4 H₂ase 활성에 영향을 미치는 요인

온도, pH, 그리고 산소에 따른 효소 활성을 비교하였다. 추출된 효소의 최적온도를 결정하기 위하여 반응 온도를 30℃-80℃로 변화시키면서 수소생산과 산화 활성을 각각 측정하였다. 최대 활성값을 100% 기준으로 하여 상대적 활성을 측정하였다. 효소의 내열성을 관찰하기 위해 40℃-80℃ 온도에서 시간별로 열처리 후 40℃에서 잔존하는 효소 활성을 측정하였다. 효소의 수소생산 활성 최적 pH는 6.0-7.5, 7.5-8.5, 8.5-10구간으로 나누어 측정하였으며, 사용한 buffer는 각각 50 mM PIPES buffer, 50 mM EPPS buffer, 50mM CHES buffer 이었다. 각각의 pH에 해당되는 반응 용액을 사용하여 20분 반응 후 수소생산량을 측정하였다. 효소의 수소산화 활성 최적 pH는 6.0-7.5, 7.5-9.0, 9.0-10.5 구간으로 나누어 측정하였으며, 사용한 buffer는 각각 50mM sodium phosphate buffer, 50 mM Tris-HCl buffer, 50 mM Glycine-NaOH buffer 이었다. 각각의 pH에 해당되는 반응 용액을 사용하여 10분 반응 후 탈색정도를 분광광도계로 측정하였다. 추출된 효소의 산소 안정성은 효소를 공기 및 산소로 1 분간 치환 한 후 30℃에서 시간별로 잔존하는 수소생산 활성을 C-H₂ase는 40℃와 T-H₂ase는 50℃에

서 측정하였다. 공기 및 산소로 치환하지 않았을 때 효소활성을 100% 기준으로 하여 잔존하는 활성을 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 배양시간

중온성 절대 혐기세균인 *Cl. butyricum* NCIB 9576의 균체성장과 배양 중의 수소 발생량 및 H₂ase 활성 변화를 측정하였다. 1% 포도당을 함유하는 합성 배지에서 균체는 약 4 시간동안 대수 성장기가 계속되었으며 이 때 이 균주의 generation time은 20분 이었다. 배양 6 시간 후 0.9 g-건조균체량/L 균체가 생성되었고 이 후에는 pH가 4.5 이하로 저하하면서, 균체는 더 이상 성장하지 않는 정체가이었다. 발효 시간의 경과에 따라 H₂ase의 활성이 다르게 나타났으며, 이와 같은 현상은 균체의 성장도와 연관되어 있었다 (Fig. 1).

*Cl. butyricum*은 혐기배양 12시간 동안 1% 포도당으로부터 1.17 l -H₂/g-건조균체량의 수소를 생성하였다. 배양 초기 2 시간은 성장 유도기로 균체가 성장하지 않았으며, H₂ase 활성도 나타나지 않았지만, 이후에 균체는 대수성장기로 가스 생산과 H₂ase의 비활성 (specific activity)도 급격한 상승을 보였다. 이 후 배양 시간이 경과에 따른 효소의 활성은 급격히 감소하였고 수소 발생 속도도 서서히 감소하는 것으로 나타났다. 즉 성장 정체가에는 균체 양과 효소 활성도가 서로 비례하지 않았다. 배양액 중의 기질이 소모되거나 pH가 낮아지는 등 균체의 성장이 정지한 후에는 배양 시간의 경과에 따라 수소생산도 감소하는데, 이러한 현상은 일반적으로 Clostridium 대사 과정에서 발생하는 현상이며, *Cl. acetobutyricum* 에서도 관찰되었다⁷⁾. Clostridia 속의 절대혐기 세균은 세포질에 2개의 H₂ase가 존재하는 것으로 알려져 있으며 포도당이 함유된 배지에서 배양 시에 일반적으로 이상(Two Phase) 회분 발효를 한다. 즉 포도당을 분해하여 acetate 및 butyrate를 주로

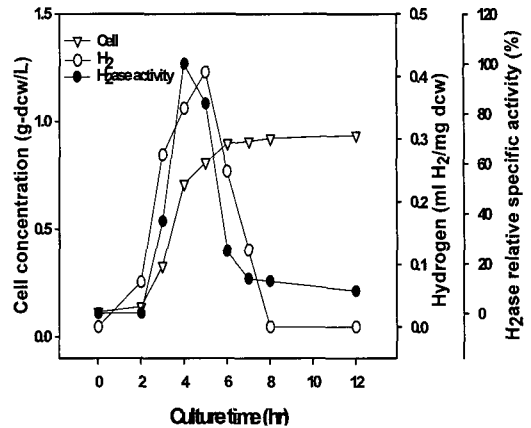


Fig. 1. Cell growth and hydrogenase activity of *Cl. butyricum* NCIB 9576.
 ▽, cell concentration; ○, H₂ produced; ●, hydrogen evolution activity

생산하는 산생성 발효 와 균체가 정체가에 돌입하기 직전 아세트, 부탄올 및 에탄올 생산과정으로 전환하는 용매 생성 발효를 거친다. 산생성 발효 중에는 포도당의 해당과정을 거치며 생성된 과량의 NADH를 산화시키기 위해 전자전달체인 ferredoxin (Fd)이 환원되며 여러 효소의 작용에 의해 NADH가 산화된다. 이 때 환원된 Fd으로부터 전자를 받고 전자수용체인 양성자가 H₂ase 작용에 의해 분자상의 수소를 생산한다. 이 후 용매 생성 발효 중 에탄올과 부탄올 생성 과정은 해당과정에서 생성되는 양보다 많은 양의 NAD(P)H를 필요로 한다. 따라서 NAD(P)H를 생산하기 위해 Fd를 산화하는 반응이 진행되고 이는 H₂ase에 수소를 발생하기에 충분한 H⁺을 공급하지 못하므로 그 결과 수소생산이 감소하는 것으로 알려져 있다¹⁵⁾. 또한 Clostridia 속이 갖는 NAD(H)-dependent Fe-H₂ase는 배양액 중에 수소 분압이 높아지면 그 활성도가 떨어지고, 반면 aldehyde dehydrogenase와 alcohol dehydrogenase활성이 높아지는 것으로 보고되었으며, 이는 배양액 중의 수소 분압이 수소생산과 H₂ase의 조절에도 관여하는 것으로 사료된다.

홍색 유황세균인 *T. roseopersicina* NCIB 8347

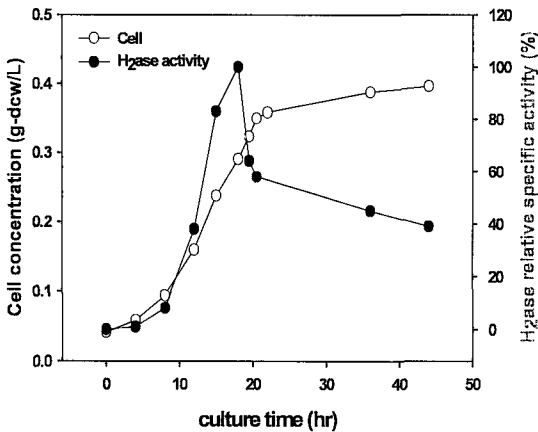


Fig. 2. Cell growth and hydrogenase activity of *T. roseopersicina* NCIB 8347.

○, cell concentration
●, hydrogen evolution activity

의 균체성장 및 H₂ase 활성은 0.05% acetate를 함유하는 modified Pfennig's medium에서 1% CO₂를 함유하는 질소를 공급하면서 광합성 독립영양 조건으로 배양할 때, 초기 4시간 동안은 유도기였으며 이후 20시간까지 균체가 급격히 성장하여, 배양 18시간 동안 0.29 g-건조균체량/L-배양액이었다 (Fig. 2).

균체의 성장에 따라 H₂ase의 비활성은 증가하여 배양 18시간이 경과한 지수성장기 후반에 가장 높은 수소생산 효소 비활성을 보였다.

배양 초기 4 시간은 H₂ase 활성이 나타나지 않았지만, 이후에 균체 대수성장기에는 H₂ase 비활성의 급격한 상승을 보였고, 이 후 배양 시간 경과에 따라 효소의 활성은 급격히 감소하여서, 배양 20시간 후에는 비활성의 60%만이 남아 있었다. 이와 같은 현상은 *T. roseopersicina* NCIB 8347을 lactate와 glutamate를 각각 탄소원 전자공여체 및 질소원으로 공급하는 광합성 종속 영양 조건으로 배양할 때와 상이하였다. 광합성 종속 영양 배양에서는 수소가 균체의 지수성장기 후반부터 생성되어 균체성장이 끝난 후에도 지속되었다. 이와 같은 현상은 수소를 발생하는데 주로

nitrogenase가 관여하기 때문이며, 균체가 최대 성장한 후 질소원이 고갈될 때, nitrogenase가 양성자를 수소로 환원하여 발생한다.

*Cl. butyricum*의 세포 추출액을 초원심분리하여 세포막과 세포질 분획으로 나누어 실험한 결과 세포질에서만 수소생산 및 산화활성을 나타낸 것으로 미루어 이 균주의 H₂ase는 세포질에만 존재하는 것으로 사료된다. 이와 같은 결과는 Adams et al. 이 보고한 *Cl. pastertianum*의 H₂ase에 대한 연구와 일치하는 것으로 이들은 세포질에 2개의 H₂ase가 존재하며, 모두 수소 생산과 소비에 관여하는 것을 보고하였다. 반면 *T. roseopersicina*는 세포막에 2개의 수소산화효소가 존재하며 세포질에도 수소센서 효소와 수소생산 효소가 각각 존재하는데¹⁶⁾ 본 연구에서는 *T. roseopersicina*의 세포막과 세포질 분획에 각각 존재하는 수소 산화와 수소생산 효소 활성 중 세포질에 존재하는 수소생산 효소의 특성을 연구하였으며, 다음 Section에서 결과를 기술하였다.

3.2 온도

C-H₂ase 및 T-H₂ase가 갖는 수소생산과 산화활성의 온도 영향을 30°C-80°C에서 측정하였다. C-H₂ase의 수소생산 활성의 최적온도는 45°C이며, 30°C에서 최대 활성 온도의 30%이었다(Fig. 3).

T-H₂ase의 수소 생산 최적 활성 온도는 65°C이며, 40°C에서는 최대 활성 온도의 20%를 나타내었다(Fig. 4).

*Cl. butyricum*의 최적 배양 온도는 37°C 이지만, 세포질 내의 수소생산 활성 최적 온도는 균체 최적 생장온도에서 약간 상승한 45°C이었다. 반면에 최적 배양 온도가 25°C인 *T. roseopersicina*에서 유래한 T-H₂ase의 수소생산 활성 최적 온도가 65°C로 나타나 C-H₂ase 보다는 내열성이 높았다. 발생된 수소를 양성자와 전자로 산화하는 T-H₂ase와 C-H₂ase의 수소 산화 활성은 서로 유사한 결과를 보여 70°C에서 최대 활성을 보였다.

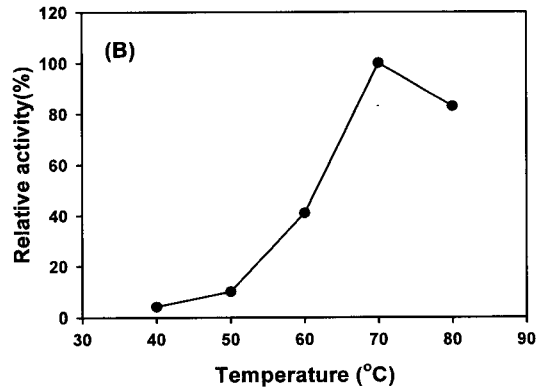
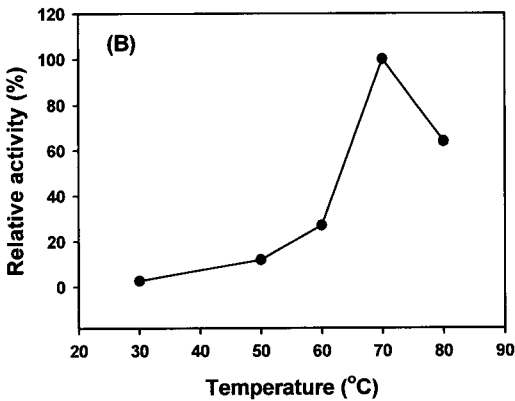
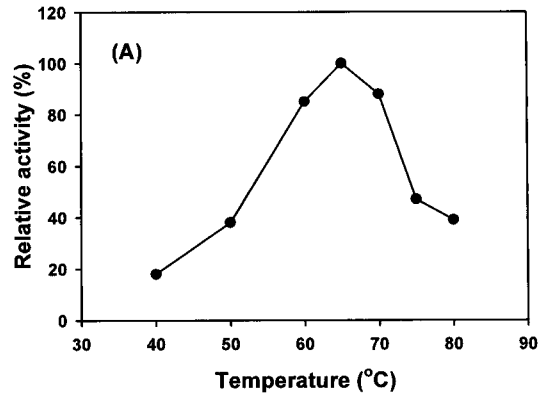
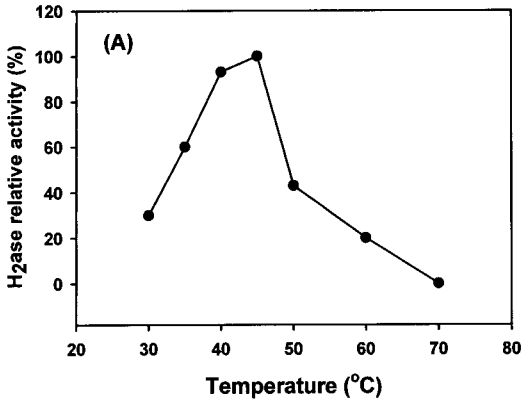


Fig. 3. Temperature profile of *Cl. butyricum* NCIB 9576 hydrogenase activity. H₂-evolution (A) and H₂-oxidation (B)

Fig. 4. Temperature profile *T. roseopersicina* NCIB 8347 hydrogenase activity. H₂-evolution (A) and H₂-oxidation (B)

그러나 50°C에서 최대 활성 온도의 10%를 보였다.

일반적으로 수소 산화 반응의 경우 저온에서 반응 시 lag time이 관찰되었으며 반응 온도가 상승함에 따라 lag time은 감소하여 70°C 이상에서는 효소를 반응용액에 첨가하면 즉시 반응이 일어나 최대 활성을 나타내었다. 이러한 반응 양상은 H₂ase는 H₂ 나 Ar 하에 반응 시 또는 dithionite 등의 환원제와의 반응 시에 active state에 도달하는데 상당한 시간이 걸리나 고온에서 반응하는 경우 효소는 순간적으로 active state에 도달하기 때문에 발생하는 것으로 *Desulfovibrio desulfuricans*, *D. gigas*, 및

*Hydrogenovibrio marinus*¹⁷⁻¹⁹⁾ 에서도 보고되었다. 그러나 본 연구에서 사용한 C-H₂ase와 T-H₂ase의 수소생산 활성 반응의 경우에는 측정된 모든 온도에서 lag time은 관찰되지 않았다.

C-H₂ase의 수소생산 활성도는 30°C에서 5시간 동안 안정한 반면, 40과 45°C에서는 1시간 후에 초기 활성의 95 및 80%를 각각 유지하고 있었다. 그러나 반응시간을 5시간으로 증가할 때 활성도는 각각 75와 45%로 낮아졌다(Fig. 5A). T-H₂ase의 수소생산 활성은 C-H₂ase 보다 온도상승에 안정되어서, 50°C에서 1시간 경과 후에도 초기의 활성을 유지하였으며, 5시간 동안은 10%만이 감소하였다(Fig. 5B). 또한 70°C에서 5시간 열처리 했

Clostridium butyricum [절대혐기발효세균]과 *Thiocapsa roseopersicina* [홍색유황세균]의 수소생산 효소 특성 비교

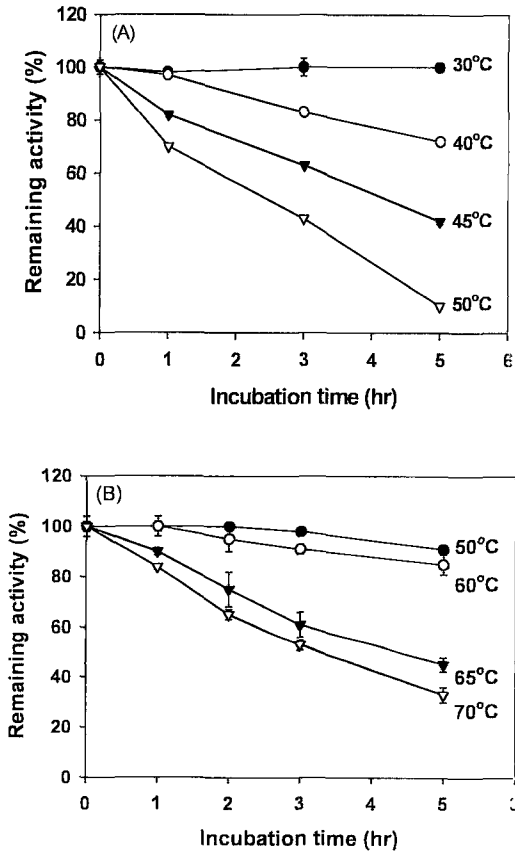


Fig. 5. Thermostability of C-H₂ase (A) and T-H₂ase (B)

을 때도 40%활성을 유지하였다. 이러한 T H₂ase의 높은 내열성은 70°C에서 50분 동안 열처리하여 90%의 활성을 유지하였던 *Hydrogenovibrio marinus*와 유사하였다¹⁷⁾.

3.3 pH

H₂ase의 최적 pH를 알아보기 위하여 pH 6.0-10의 범위에서 수소생산 활성 및 수소산화 활성을 측정하였다. 수소생산 활성 측정을 위해서 PIPES, EPPS, 및 CHES buffer가 사용되었다. 수소생산 활성은 dithionite로 환원된 methyl viologen을 사용하는데 이 때 환원제인 dithionite가 고온에서는 phosphate 및 Tris-HCl buffer 보

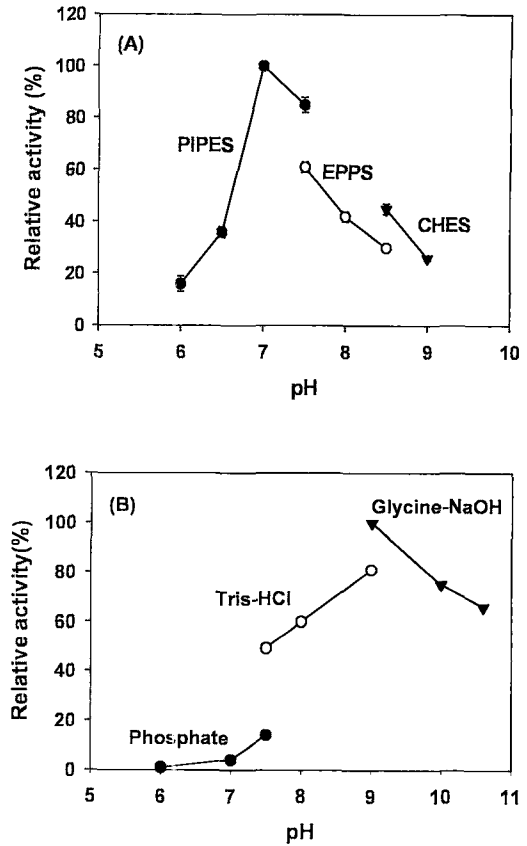


Fig. 6. pH profile of *Cl. butyricum* NCIB 9576 hydrogenase activity. H₂-evolution (A) and H₂-oxidation (B)

다 Good's buffer에 더 안정하기 때문이다¹³⁾.

PIPES 완충액을 사용할 경우 C-H₂ase의 수소생산 최적 pH는 7.0이며, pH 6.0에서는 활성이 거의 나타나지 않았다. 그리고 pH 7.5에서도 최적 pH 7.0에서 활성도의 약 80%가 나타났다. pH 8.0 이상에서는 이 효소의 수소생산 활성은 급격히 감소하는 것으로 확인되었다(Fig. 6A). C-H₂ase의 수소산화 최적 pH는 9.0이며, pH 6.0에서는 활성이 거의 나타나지 않았다(Fig. 6B).

C H₂ase 수소산화 활성은 pH 10 이상에서도 최대 활성의 60-70%를 유지하였다. C-H₂ase의 수소생산 및 최적 pH는 각각 7.0과 9.0이며, 이와

같은 특성은 pH가 H₂ase의 반응의 평형상태를 조절하는 요인의 하나라는 것을 나타낸다¹⁷⁾. 중성 pH에서는 수소생산이 주로 일어나는 반면, 알칼리 pH에서는 수소가 소비되는 산화반응이 선호되었다. T-H₂ase의 수소생산 활성은 C-H₂ase와는 달리 pH 6.0-8.0까지 광범위하였으며, 최적 pH는 7.0이었다. 그러나 pH 8.5 이상에서는 활성이 급격하게 감소하여 pH 9.5에서는 최대 활성의 30%만을 나타내었다(Fig. 7A). T-H₂ase의 수소 산화 활성도 pH 6.0에서는 거의 나타나지 않았고 pH 7.5에서 최적 활성을 나타내었다(Fig. 7B).

3.4 산소

*Cl. butyricum*으로부터 분리한 세포질 C-H₂ase는 산소에 대한 민감성을 보여서(Fig. 8) 공기 중에 노출된 지 3분 만에 전체 활성의 50%를 잃었다. 반면에 T-H₂ase는 비교적 강한 산소 저항성을 나타내었다. 차가운 호수의 생태계에서 분리된 *T. roseopersicina*는 광합성 홍색유황세균으로서 통성 혐기성 배양조건에서 자라며, 이 균주로부터 분리한 T-H₂ase는 고온에서 높은 활성과 내열성을 보임과 동시에 산소에 대한 저항성 또한 뛰어났다. T-H₂ase는 30°C에서 공기 및 산소에 10 시간동안 노출된 후에도 각각 전체 활성

의 80%와 50% 이상이 유지되었다.

T-H₂ase 산소에 대한 안정성을 측정하기 위하여 효소를 각각 4°C와 25°C에서 6 일 동안 공기 중에 보관하며 수소생산 활성을 본 결과 (Fig. 9), 4°C에서는 24시간 후에 80%의 활성을 유지하였고 6일(144시간)후에도 50% 이상 활성을 유지하였다. 25°C에서 24시간동안 공기 중에서 효소활성은 60%가 유지되었고, 6 일 동안 30%의 효소활성이 유지되었다. Nishihara 등은 해수에서 분리된 호기성 수소 산화 세균인 *Hydrogenovibrio marinus*로부터 세포막에 결합된 H₂ase를 세포 추출액 상태 산소 저항성을 측정하였는데, 이 균주에서 유래한 H₂ase는 뛰어난 산소 저항성을 나타내었다¹⁷⁾. 이 효소는 30°C에서 12시간 동안 공기 중에 노출된 후 전체 활성의 87%를 유지하였다.

지금까지 다양한 내열성 H₂ase가 보고되고 있으며 이들은 주로 *Pyrodicticum brockii* 및 *Pyrococcus furiosus*와 같은 최적 성장 온도가 100°C 이상인 초고온성 Archaea로부터 분리된 효소이다^{20,21)}. *Pd. brockii*로부터 분리한 H₂ase는 90°C에서 15분간 열처리 후 전체 활성의 80%를 유지하는 내열성을 보였으나 산소에 대한 극도의 민감성을 나타내며 환원된 methyl viologen을 이용하여 수소를 생산할 수 없었다. *Pc. furiosus*로

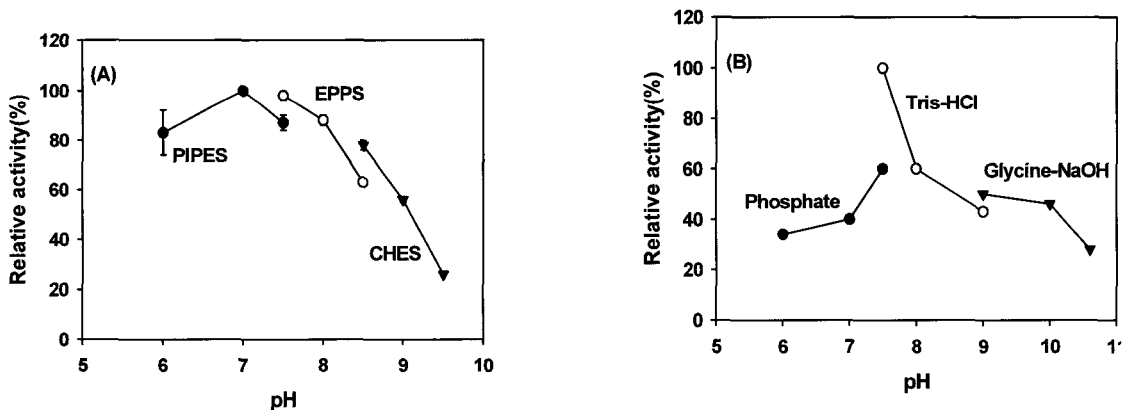


Fig. 7. pH profile of *T. roseopersicina* NCIB8347 hydrogenase activity. H₂- evolution (A) and H₂-oxidation (B)

Clostridium butyricum [절대혐기발효세균]과 *Thiocapsa roseopersicina* [홍색유황세균]의 수소생산 효소 특성 비교

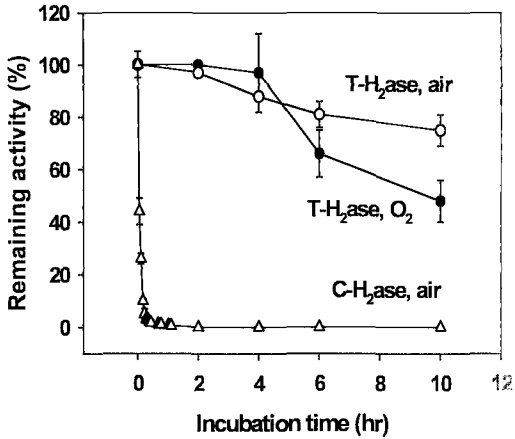


Fig. 8. Oxygen sensitivity of *T. roseopersicina* and *C. butyricum* hydrogenases.
○, T-H₂ase, air; ●, T-H₂ase, O₂
△, C-H₂ase, air

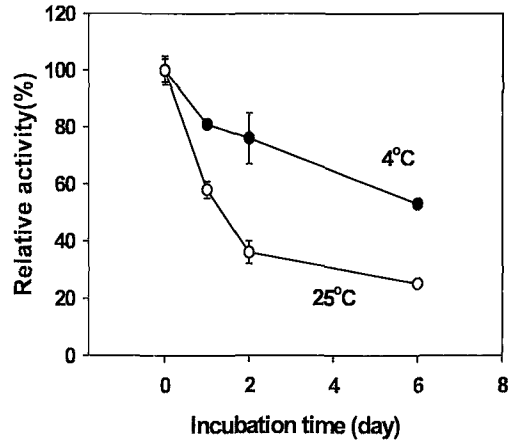


Fig. 9. Prolonged oxygen stability of *T. roseopersicina* hydrogenase on H₂-evolution.
●, 4°C; ○, 25°C

부터 분리한 soluble H₂ase는 수소생산 활성과 수소산화 활성이 모두 95°C 이상으로 혐기상태에서 뛰어난 내열성을 보인다. 그러나 이 효소 또한 산소에 대한 안정성이 낮아 공기 중에 6 시간동안 노출 시 전체 활성의 50%를 잃는다¹³⁾.

T-H₂ase는 중온성 균주에서 유래한 효소이지만 고온성 균주에서 유래한 H₂ase와 유사한 내열성을 가지며, 다른 균체에서 분리된 H₂ase 보다 뛰어난 산소에 대한 안정성을 갖는다. 이러한 T-H₂ase의 특성은 생물학적 수소생산 시스템에 이 효소를 이용함에 있어서 중요한 장점으로 작용할 것으로 사료된다.

후 기

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

참 고 문 헌

- 1) Albracht, S.P. Biochem. Biophys. Acta. Vol.1188, 1994, pp.167-204.
- 2) Adams, M.W., E.I. Stiefel. Curr. Opin. Chem. Biol. vol. 42000, pp. 214-220.
- 3) Adams, M.W. Biochim. Biophys. Acta. Vol. 1020, 1990, pp.115-145.
- 4) Zorin, N.A. 1986. Biochimie., Vol. 68, 1986, pp.97-101.
- 5) Vignais, P.M. and B. Arch. Microbiol. Vol. 161, pp.1-10.
- 6) Adams, M.W., E. Eccleston, and J.B. Howard. Biochem. Vol. 86, 1989, pp. 4932-4936.
- 7) Gorwa, M., C. Croux, and P. Soucaille. J. Bacteriol. Vol.178, No.9, 1996, pp.2668-2675.
- 8) Vignais, P.M. and A. Colbeau. Curr. Issues Mol. Biol. Vol.6, 2004, pp.159-188.
- 9) Mertens, R. and A. Liese. 2004. Curr. Opin. Biotechnol. Vol.15, 2004, pp.343-348.
- 10) Molongoski, J.J. and M.J. Klug. Appl.

- Environ. Microbiol., Vol.31, 1976, pp. 83-90.
- 11) Pfennig, N., H.G. Truper. 1991. The family Chromatiaceae, pp. 3200-3221. In A. Balows, H. G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, and K.H. Schleifer (ed.), The prokaryotes, Springer, Berlin.
 - 12) Rakhely, G., A.T. Kovacs, G. Maroti, B.D. Fodor, G. Csanadi, D. Latinovics, and K.L. Kovacs. Appl. Environ. Microbiol. Vol.70, No.2, 2004, pp. 722-728
 - 13) Bryant, F.O. and M.W. Adams. 1989. J. Biol. Chem. Vol.264, 1989, pp. 5070 -5079.
 - 14) Cammack, R., V.M. Fernandez, and E. C. Hatchikian. Methods in Enzymology. Vol.243, 1994, pp. 43-69.
 - 15) Jones, D.T. and D.R. Woods. Microbiol. Rev. Vol.50, 1986, pp.484-524.
 - 16) Kovacs, K. L., B. Fodor, A.T. Kovacs, G. Csanadi, G. Maroti, J. Balogh, S. Arvani, and G. Rakhely. Int. J. Hydrogen Energy. Vol.27, 2002, pp. 1463-1469.
 - 17) Nishihara, H., Y. Miyashita, K. Aoyama, T. Kodama, Y. Igarachi, and Y. Takamura. Biochem. Biophys. res. commun. Vol.232, 1997, pp. 766-770.
 - 18) Fernandez, V.M., Rao. K.K., Fernandez. M.A. and Cammack, R. Biochimie. Vol.68, 1986, pp. 43-48.
 - 19) Cammack, R., Fernandez, V.M., and Schneider. K. Biochimie. Vol.68 1986, pp. 85-91.
 - 20) Pihl, T.D., R.N. Schicho, R.M. Kelly, and R.J. Maier. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol.86, 1989, pp. 138-141.
 - 21) Pihl, T.D. and R.J. Maier. J. Bacteriol. Vol.173, 1991, pp. 1839-1844.