

碩士學位 請求論文

光合成 細菌 *Rhodospirillum rubrum* 의 生長과
Bacteriochlorophyll, Carotenoids의 形成에
대한 炭素源의 效果

指導教授 吳 德 鐵



濟州大學校 教育大學院

生物教育專攻

宋 承 姬

1993年 8月

光合成細菌 *Rhodospirillum rubrum* 의 生長과
Bacteriochlorophyll, Carotenoids의 形成에
대한 炭素源의 效果

指導教授 吳 德 鐵

이 論文을 教育學 碩士學位 論文으로 提出함

1993年 6月 日

濟州大學校 教育大學院 生物教育 專攻

提出者 宋 承 姬



宋承姬의 碩士學位 論文을 認准함

1993年 7月 日

審査委員長 鄭 忠 德 
審査委員 金 源 澤 
審査委員 吳 德 鐵 

< 초 록 >

광합성 세균 *Rhodospirillum rubrum*의 생장과
Bacteriochlorophyll, Carotenoids의 형성에
대한 탄소원의 효과

송 승 회

제주대학교 교육대학원 생물교육전공

지도교수 오 덕 철

비유황 홍색 세균의 일종인 광합성 세균 *Rhodospirillum rubrum*으로 생장과 색소 형성에 대한 탄소원의 효과를 조사하였다.

사용한 탄소원은 acetate, alanine, glutamate 그리고 malate였으며 단독 또는 혼합하여 사용하였다.

세포 생장은 glutamate배지에서 가장 낮았으며 glutamate-malate 혼합 배지에서 가장 높았다. 반면에 acetate와 glutamate를 혼합했을 때는 두가지를 단독으로 사용했을 때보다 월등히 높은 생장을 나타내었다. 대부분의 경우 탄소원을 단독으로 사용했을 때보다 혼합하였을 때 높은 생장을 보였다.

Acetate-glutamate 혼합 배지에서는 acetate가 glutamate보다 선호적으로 사용되는 것으로 보인다.

색소가 없는 세포로부터의 bacteriochlorophyll과 carotenoid의 형성은 탄소원의 종류에 관계없이 거의 동시에 일어났으며 bacteriochlorophyll비함량은 alanine을 단독으로 사용했을 때와 glutamate-alanine 혼합일때 가장 높았으며, carotenoid 비함량은 malate에서와 malate-alanine 혼합에서 가장 높게 나타나서 두 색소의 비함량 변화는 다소 차이가 났다. 탄소원에 따른 성장량과 색소 함량은 반드시 일치하지는 않았고 색소 합성 능력이나 생장에 있어서의 효과는 탄소원의 종류에 따라 달랐다.

세포내 bacteriochlorophyll에 대한 carotenoid의 비함량비는 다소 변화가 있으나 대개 1:2 수준이었다.

목 차

<초 록>

I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	
1. 균주 및 배양	3
2. 세포 수확 및 생세포의 흡광도 측정	4
3. 색소의 추출 및 비함량 계산	4
4. 탄소원의 정량	5
III. 결과 및 고찰	
1. 탄소원에 따른 세포 성장	6
2. 탄소원의 정량	9
3. 생세포의 흡광도	14
4. 추출 색소의 배양 시간별 흡광도 변화	17
5. 추출 색소의 비함량	20
6. 세포내 색소의 비함량비	25
참 고 문 헌	28
<Abstract>	33



표 목 차

Table 1. Ratios of specific contents of carotenoid to bacteriochlorophyl from <i>Rhodospirillum rubrum</i> cultured on various carbon sources at different culture time -----	26
---	----

그 립 목 차

Fig 1. Growth of <i>Rhodospirillum rubrum</i> on single carbon sources -----	7
Fig 2. Growth of <i>Rhodospirillum rubrum</i> on mixed carbon sources -----	8
Fig 3. Substrate consumption of <i>Rhodospirillum rubrum</i> cultured on alanine -----	10
Fig 4. Substrate consumption of <i>Rhodospirillum rubrum</i> cultured on glutamate -----	11
Fig 5. Substrate consumption of <i>Rhodospirillum rubrum</i> cultured on glutamate-alanine mixture -----	12
Fig 6. Substrate consumption of <i>Rhodospirillum rubrum</i> cultured on acetate-glutamate mixture -----	13
Fig 7. Absorption spectra of intact cells of <i>Rhodospirillum rubrum</i> cultured on glutamate.-----	15
Fig 8. Absorption spectra of intact cells of <i>Rhodospirillum rubrum</i> cultured on acetate-glutamate mixture -----	16
Fig 9. Absorption spectra of photosynthetic pigments from <i>Rhodospirillum rubrum</i> cultured on glutamate -----	18
Fig 10. Absorption spectra of photosynthetic pigments from <i>Rhodospirillum rubrum</i> cultured on acetate-glutamate mixture -----	19

Fig 11. Specific bacteriochlorophyll contents of <i>Rhodospirillum rubrum</i> cultured on single carbon sources -----	21
Fig 12. Specific bacteriochlorophyll contents of <i>Rhodospirillum rubrum</i> cultured on mixed carbon sources -----	22
Fig 13. Specific carotenoids contents of <i>Rhodospirillum rubrum</i> cultured on single carbon sources -----	23
Fig 14. Specific carotenoids contents of <i>Rhodospirillum rubrum</i> cultured on mixed carbon sources -----	24



I. 서 론

비유황 광합성 세균의 일종인 *Rhodospirillum rubrum*은 빛이 있는 조건에서는 혐기적 광합성으로, 빛이 없는 조건에서는 호기적 호흡으로 성장할 수 있고(Elsden and Ormerod, 1956 ; Oelze and Pahlke, 1976 ; Thore et al., 1969 ; van Niel, 1941), 빛이 없고 혐기적인 상태에서도 탄소원에 따라 발효에 의해 성장할 수 있어서(Kohlmiller and Gest, 1951 ; Schultz et al., 1985 ; Schultz and Weaver, 1982 ; Thore et al., 1969 ; Uffen, 1973a ; Uffen and Wolfe, 1970) 생리학적으로 매우 흥미 있는 생물로 취급되어왔다.

*R. rubrum*은 또한 광종속영양 생물로서 탄소원으로 다양한 유기물을 사용할 수 있는 것으로 알려져 있고(Elsden and Ormerod, 1956 ; Knight, 1962 ; Olsen and Merrick, 1968), 광의 조사나 산소 공급 여부 등과 같은 배양조건에 따른 탄소원의 이용과 성장에 대한 효과(Coleman, 1959 ; Uffen, 1973a, b ; Uffen and Wolfe, 1970)나 탄소원을 혼합했을 때의 성장에 미치는 효과 (Gest et al., 1962 ; Solaiman and Uffen, 1982) 등이 보고되어 있다. 또한 질소원으로 이성체 아미노산을 공급했을 때 성장에 미치는 효과가 보고된 바 있다(Coleman, 1959). 그리고 다른 종류의 광합성 세균을 보면 *Rhodobacter capsulatus*에서는 L-형과 D-형 malate에 대한 성장과 포도당을 첨가했을 때의 성장율의 변화(Stahl and Sojka, 1973)가, *Chlorobium thiosulfatophilum*에서는 여러가지 유기물의 첨가에 의한 성장과 대사에 대한 연구가 이루어져 있다(Kelley, 1974).

최근에는 비광합성 세균인 *Hyphomicrobium X*(Brooke and Attwood, 1983), *Eubacterium limosum*(Loubière and Lindley, 1991), *Veillonella parvula*(Janssen, 1992) 등에서 성장에 대한 혼합 탄소원의 효과에 관한 연구가 있으나 광합성 세균을 재료로 한 연구는 보이지 않고 있다.

한편 *R. rubrum*의 bacteriochlorophyll(Bchl)이나 carotenoid등 광합성 색소에 관련된 연구로는 광이나 산소에 의한 색소 형성 조절(Arnheim and Oelze, 1983 ; Cohen-Bazire and Kunisawa, 1960 ; Oelze and Pahlke, 1976), 색소-단백질 복합체의 특성

(Vernon and Garcia, 1967), 색소의 조성비(Picorel *et al.*, 1983), 온도와 산소, pH에 의한 색소 형성 조절(Uffen, 1985), carotenoid의 조성 분석(Schwerzmann and Bachofen, 1989)등이 있다. 다른 광합성 세균에서 광합성 색소에 관련된 연구를 보면 *Rhodobacter capsulatus*의 暗所배양시의 광합성 색소 형성(Madigan *et al.*, 1982) 그리고 탄소원과 색소 형성(Grether-Beck and Oelze, 1987), *Rhodobacter sphaeroides*의 광에 의한 Bchl형성 조절(Oelze, 1988)에 대한 보고등이 있으며, 최근에 특이한 호기성 광합성 세균인 *Roseobacter denitrificans*에서 청색광이 Bchl과 carotenoid의 축적을 저해한다는 보고(Iba and Takamiya, 1989 ; Takamiya, 1992) 등이 있다.

그런데, 탄소원을 단독으로 사용했을 때와 혼합하여 사용했을 때의 *R.rubrum*의 성장효과나 탄소원에 따른 성장과 색소 형성과의 상관성에 관한 연구는 Solaiman 과 Uffen(1982)의 극히 제한적인 보고 외에는 거의 보이지 않고 있다.

본 연구는 이러한 점에 착안하여 *R.rubrum*에 탄소원을 달리 주었을 때, 성장과 색소 형성이 어떻게 나타나는 지와 또 성장과 색소 형성은 어떠한 상관성을 가지고 있는 지를 알아보고자 실시하였다.



II. 재료 및 방법

1. 균주 및 배양

배지 : 사용한 균주는 성균관대학교 미생물 실험실에서 제공받은 *R.rubrum* S1이고, 배지는 기본 무기배지로 탄소원을 뺀 Bose배지(Bose *et al.*, 1962)를 사용하였는데, 그 조성은 KH_2PO_4 , 600mg ; K_2HPO_4 , 900mg ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 200mg ; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 75mg ; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 11.8mg ; 미량원소용액(100mL D.W. ; H_3BO_3 , 280mg ; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 210mg ; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 75mg ; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 24mg ; $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4mg), 1mL ; EDTA, 20mg ; biotin, 15 μg ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.25g ; D.W. 1L 이고, 여기에 여러가지 탄소원을 첨가하고 1N NaOH를 사용하여 pH 7로 조절한 후(Oelze and Pahlke, 1976) 사용하였다. 사용한 탄소원은 sodium acetate(anhydrous), L-glutamic acid, DL-sodium malate, L-alanine의 4가지였으며, 탄소원 단독으로는 0.3%(w/v), 혼합일 때는 각각 0.15%(w/v)씩 첨가하였다.

암배양 : 300mL 삼각 플라스크에 탄소원별(단독 또는 혼합)로 30mL의 배지를 넣어 멸균한 후 명배양한 대수기의 *R.rubrum* 배양액 3mL씩을 넣어 솜마개를 한 후, 윗부분을 제외하고 완전히 알루미늄 foil로 싸서(Horio and Kamen, 1962 ; Uffen and Wolfe, 1970) shaking incubator에서 120rpm, 30°C 조건으로 2일 동안 행하였으며, 계대배양은 암배양된 탄소원별 배양액을 3mL 취하여 각 탄소원별로 접종한 후 동일한 방법으로 2일간 행하였다.

명배양 : 60mL 삼각 플라스크에 배지를 가득 채우고 암배양으로 2차 계대배양시킨 각 탄소원별 배양액을 탄소원별 세포량이 일치하도록 조정하여($A_{680}=0.017$) 접종하고 고무마개를 꼭 막아 혐기적으로 만든 후 백열 전구로써 2000 lux로 광을 조절하고나서 30°C에서 배양하였다.

2. 세포 수확 및 생세포의 흡광도 측정

배양세포는 배양 시간에 따라 일정량의 명배양액을 원심분리(Sorval RC-5C Centrifuge, SS-34 rotor, 5000rpm, 6°C, 20분)시킨 후 동일한 양의 인산완충액을 넣어 같은 조건으로 원심분리하여 세척한 후 수확하였으며, 이 세포에 동일한 양의 60% 설탕용액을 더하여 vortex mixer로 균질화 될 때까지 섞어 680nm에서의 흡광도(Perkin-Elmer Lambda 5 UV/VIS spectrophotometer)로써 성장량을 측정하였다(Cohen-Bazire and Kunisawa, 1960 ; Solaiman and Uffen, 1982).

또한 세포 배양동안에 Bchl과 carotenoid의 세포내 축적을 추적하기 위하여 350nm-900nm까지의 생세포 흡광도를 경시적으로 측정, 비교하였다.

3. 색소의 추출 및 비함량 계산

색소는 배양 시간에 따라 20mL의 명배양액을 세포 수확때와 동일한 방법으로 원심분리시켜 수확한 후, 10mL의 acetone-methanol(7:2,v/v ; Grether-Beck and Oelze, 1987 ; Schwerzmann and Bachofen, 1989)을 넣고 vortex mixer로 균질화 될 때까지 섞어서 20분 정도 방치한 후 원심분리시켜 색소를 추출하였다(Cohen-Bazire and Kunisawa, 1960 ; Uffen, 1985). 같은 과정을 2회 반복하여 색소를 추출, 회수하였으며 추출 과정에서는 가능한한 흡광도의 변화를 방지하기 위해서 광을 차단하였다. 원심분리하여 얻어진 각 탄소원별 색소용액을 분광 광도계를 써서 350nm-900nm범위에서 측정하여 각 탄소원별로 색소 형성정도를 비교하였다(Schultz and Weaver, 1982).

추출 색소용액 중의 Bchl과 carotenoid의 비함량을 계산하기 위해서 먼저 Bchl은 최대 흡수 파장인 772nm에서, carotenoid는 495nm에서 흡광도를 측정하였으며, 흡광계수는 Bchl은 772nm에서 $65.3\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ 로, carotenoid는 495nm에서 $149\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ 로 계산하였다(Jensen and Jensen, 1971).

흡광도와 건조 중량과의 상관 관계는 $A_{680}=0.1$ 일 때 배양액 1mL당 세포의 건조

중량이 0.087mg이라는 Holt 와 Marr(1965)의 자료를 이용하였다. Bchl의 비합량은 mg건조세포를 기준으로 하여 $A_{772} \cdot A_{680}^{-1} \cdot 0.87^{-1} \cdot 65.3^{-1}$ 로써 계산하였고, carotenoid의 비합량은 $A_{495} \cdot A_{680}^{-1} \cdot 0.87^{-1} \cdot 149^{-1}$ 로써 계산하였다.

4. 탄소원의 정량

L-glutamate와 L-alanine의 정량은 배양 시간별로 배양액을 세포 수확때와 동일한 방법으로 원심분리하여 세포를 제거한 후 상정액으로 하였다(Uffen, 1985).

Glutamate의 정량은 glutamate dehydrogenase를 이용한 Bernt와 Bergmeyer(1974)의 방법으로 하였고, alanine의 정량은 alanine dehydrogenase를 이용한 Williamson (1974)의 방법으로 행하였다. 탄소원 정량에 사용한 시약 중 NAD, ATP, ADP, 효소들은 시그마 시약(Sigma chemicals, St.Louis, Mo., USA.)을 사용하였고 나머지 시약들은 시중에서 구입한 특급 시약을 사용하였다.



Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 탄소원에 따른 세포 성장

Fig.1은 단일 탄소원을 공급했을 때의 성장곡선을 나타낸 것이고, Fig.2는 탄소원을 혼합했을 때의 성장곡선을 나타낸 것이다.

Fig.1에서보면 단일 탄소원을 사용했을 때의 *R.rubrum*의 생장은 탄소원의 종류에 관계없이 초기에는 거의 비슷하다가 92시간과 114시간 사이에 malate에서 급격한 성장을 나타내었으며, 162시간에서 보면 malate에서의 생장이 가장 두드러지게 높게 나타나고 있었는데, 이는 malate는 주로 광합성 세균 성장에 사용되는 탄소원으로 높은 성장을 나타낸다는 Grether-Beck과 Oelze(1987)의 보고와 일치하고 있다.

Acetate, glutamate, alanine에서는 낮은 성장을 나타내고 있으나, 138시간 이후 조금씩 증가하여 Fig.1에는 나타나지 않았으나, glutamate에서는 282시간(O.D. 0.474), alanine에서는 282시간(O.D. 0.423), acetate에서는 306시간(O.D. 0.337) 배양에 이르러서는 비교적 높은 성장을 보이고 있었다. 이렇게 malate이외의 세가지 탄소원에서 상당히 긴 유도기간이 필요한 것은 이들 탄소원들의 대사에 관련된 효소의 활성이 배양 초기에는 매우 낮다가 배양 시간이 상당히 경과된 후에 활성이 높아지기 때문이라 생각된다.

Fig.2에서보면 탄소원을 혼합시켰을 때의 성장량은 glutamate-malate 혼합에서 가장 높고, glutamate-alanine 혼합에서 가장 낮게 나타났으며, 탄소원별로 비교해 봤을 때 초기에는 비슷한 성장을 나타내고 있으나 92시간 이후 각각의 탄소원을 단독으로 사용했을 때보다 혼합하여 사용했을 때의 생장이 매우 높게 나타나고 있었다.

예외적으로 malate에서는 단독일 때나 혼합일 때에 성장에 큰 차이가 없게 나타났으며 malate-alanine 혼합의 경우는 오히려 malate 단독일 때에 비해 생장이 저조하게 나타나고 있었다. 이는 alanine과 혼합한 다른 탄소원들의 혼합 배양에서도 다소 느린 성장을 나타내고 있는 것으로 보아 alanine에 의한 malate의 성장저하에서 오는 현상이라 사료된다.

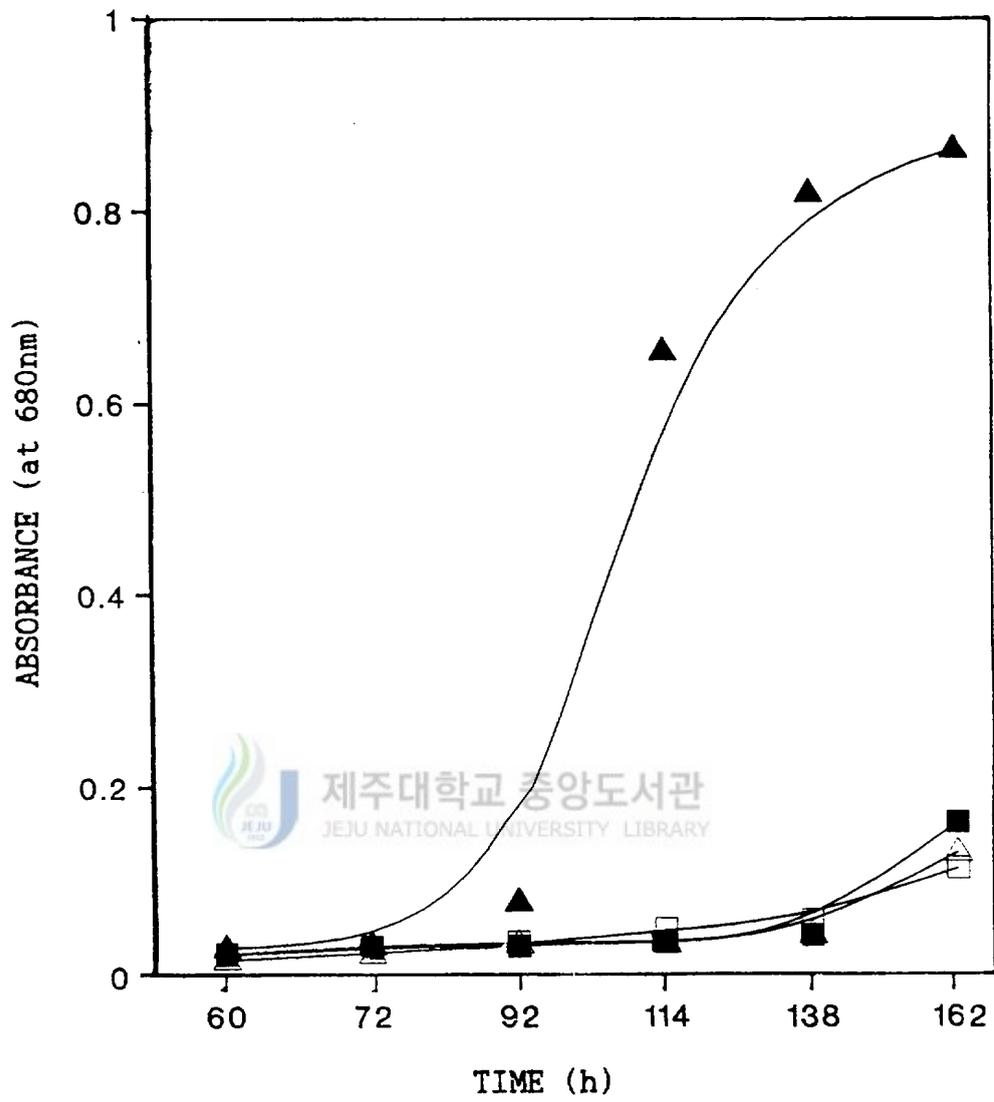


Fig.1. Growth of *Rhodospirillum rubrum* on single carbon sources.

■ ,acetate ; □ ,glutamate ; ▲ ,malate ; △ ,alanine

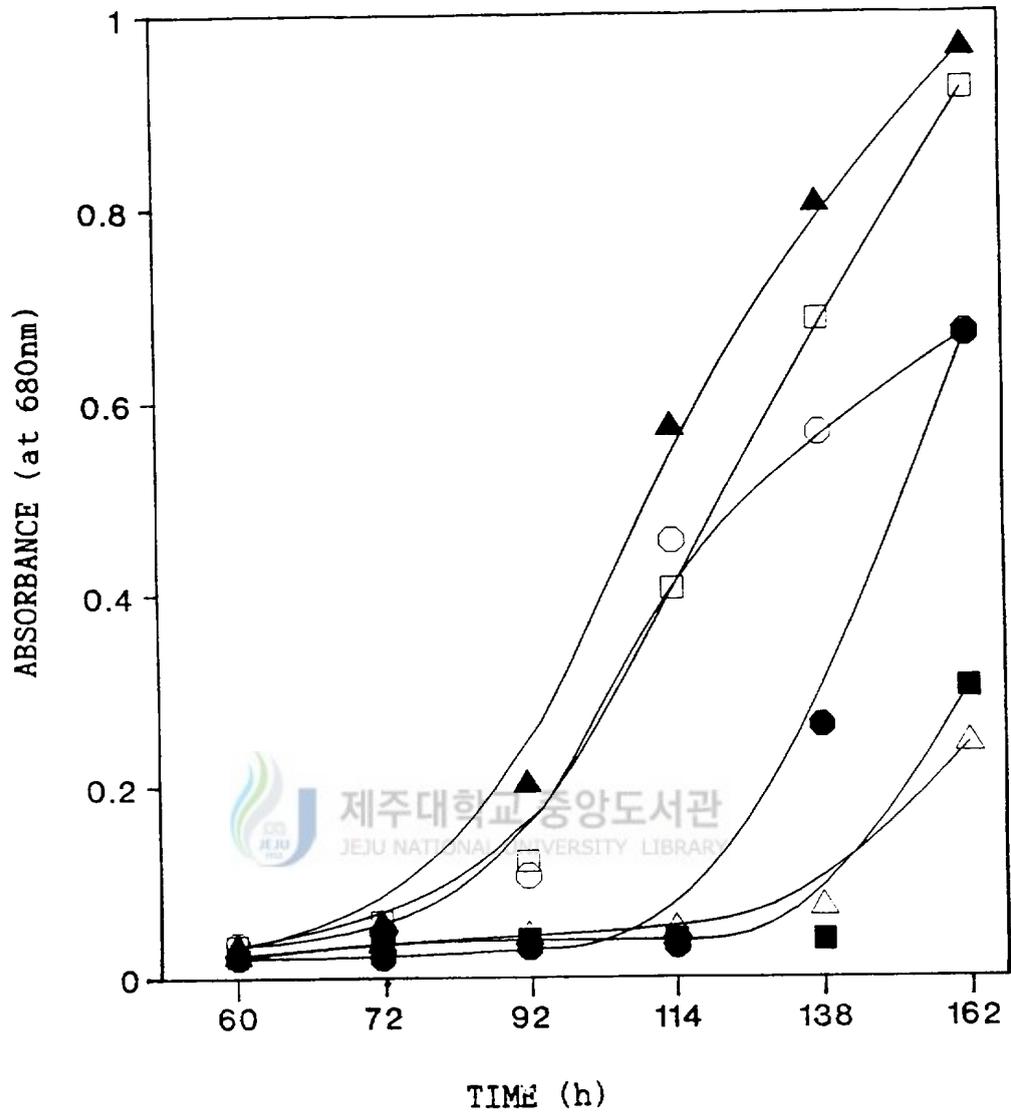


Fig.2. Growth of *Rhodospirillum rubrum* on mixed carbon sources.

○ , acetate-glutamate ; □ , acetate-malate ;
 ■ , acetate-alanine ; ▲ , glutamate-malate ;
 △ , glutamate-alanine ; ● , malate-alanine

특이한 점은 acetate와 glutamate를 혼합한 경우였다. acetate와 glutamate에서는 각각을 단독으로 배양했을 때보다 혼합했을 때가 92시간 이후 급격히 생장이 증가하여 S자형 성장곡선을 그리고 있는데, 162시간 배양했을 때는 acetate에서보다 4배, glutamate에서보다 6배의 성장 증가 현상을 나타내었다.

Fig.1과 2에서 볼 때 세포 생장은 대부분의 경우 탄소원을 단독으로 사용했을 때보다 두 종류를 혼합했을 때가 높게 나타나고 있는데 이는 pyruvate와 malate를 사용한 Solaiman과 Uffen(1982)의 결과와 일치하였고, acetate는 단독으로 사용했을 때보다 각각의 succinate, fumarate, malate와 혼합해 배양했을 때의 생장이 크게 상승된다는 Elsdon과 Ormerod(1956)의 결과와도 일치하였다. 또한 이러한 혼합 탄소원의 생장에 대한 상승효과는 비광합성 세균인 *Eubacterium limosum*(Loubière and Lindley, 1991 ; Loubière *et al.*, 1992a), *Veillonella parvula*(Janssen, 1992), *Leuconostoc oenos*(Loubière *et al.*, 1992b) 등에서도 보고되고 있어 많은 경우에 탄소원을 혼합하면 생장에 대하여 상승효과를 나타내는 것으로 보인다.

2. 탄소원의 정량

대부분의 경우 탄소원을 혼합하여 사용한 경우 생장에 상승효과를 나타내었는데 (Fig.2), 그 중 비교적 상승효과가 높지않은 glutamate-alanine 혼합 배양구와 비교적 높은 acetate-glutamate 혼합 배양구를 골라 배지중 잔여 탄소원을 효소로 정량 (Bernt and Bergmeyer, 1974 ; Williamson, 1974)하여 생장에 있어 배양 시간별 탄소원 소비 경향을 분석하였다.

Fig.3-5는 glutamate와 alanine에서의 생장에 따른 탄소원의 소비경향을 나타낸 것으로 Fig.3과 5에서 볼 때 alanine은 단독일 경우는 60시간에서 162시간 사이에 비교적 빠른 소비를 보이고 있었고, glutamate와 혼합한 경우는 전체적으로 비교적 완만한 소비 경향을 나타내고 있었다. glutamate에서는 단독이나 혼합 배양시 감소 경향이 뚜렷하게 나타나고 있지 않았는데, Fig.5를 볼 때 glutamate에 비해 alanine이 약간 더 사용되어 생장을 다소 높게 한 것이라 생각된다.

Fig.4, 6은 acetate-glutamate 혼합 배양에서의 생장에 따른 탄소원 소비경향을

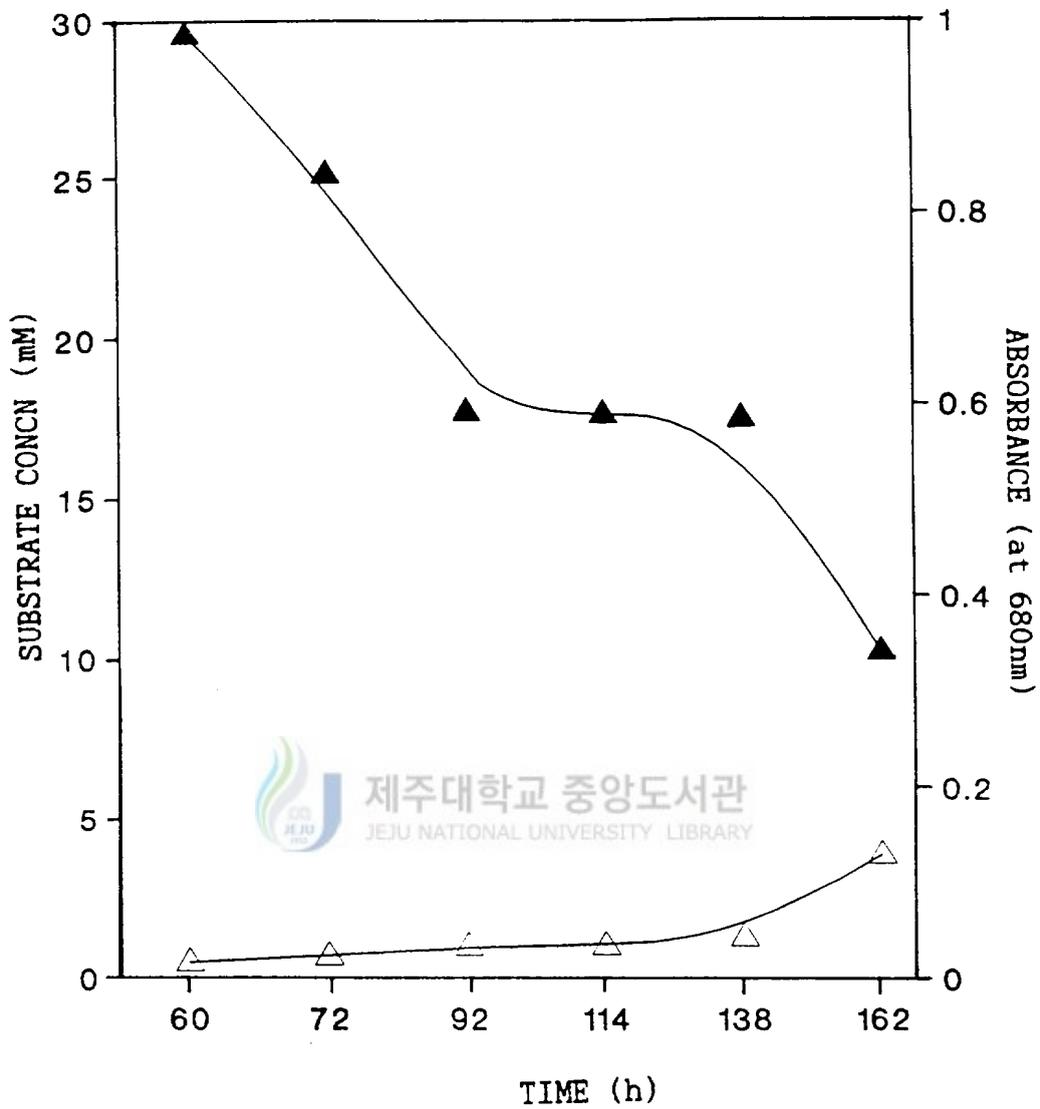


Fig.3. Substrate consumption of *Rhodospirillum rubrum* cultured on alanine.

▲ , alanine concentration ; △ , A₆₈₀

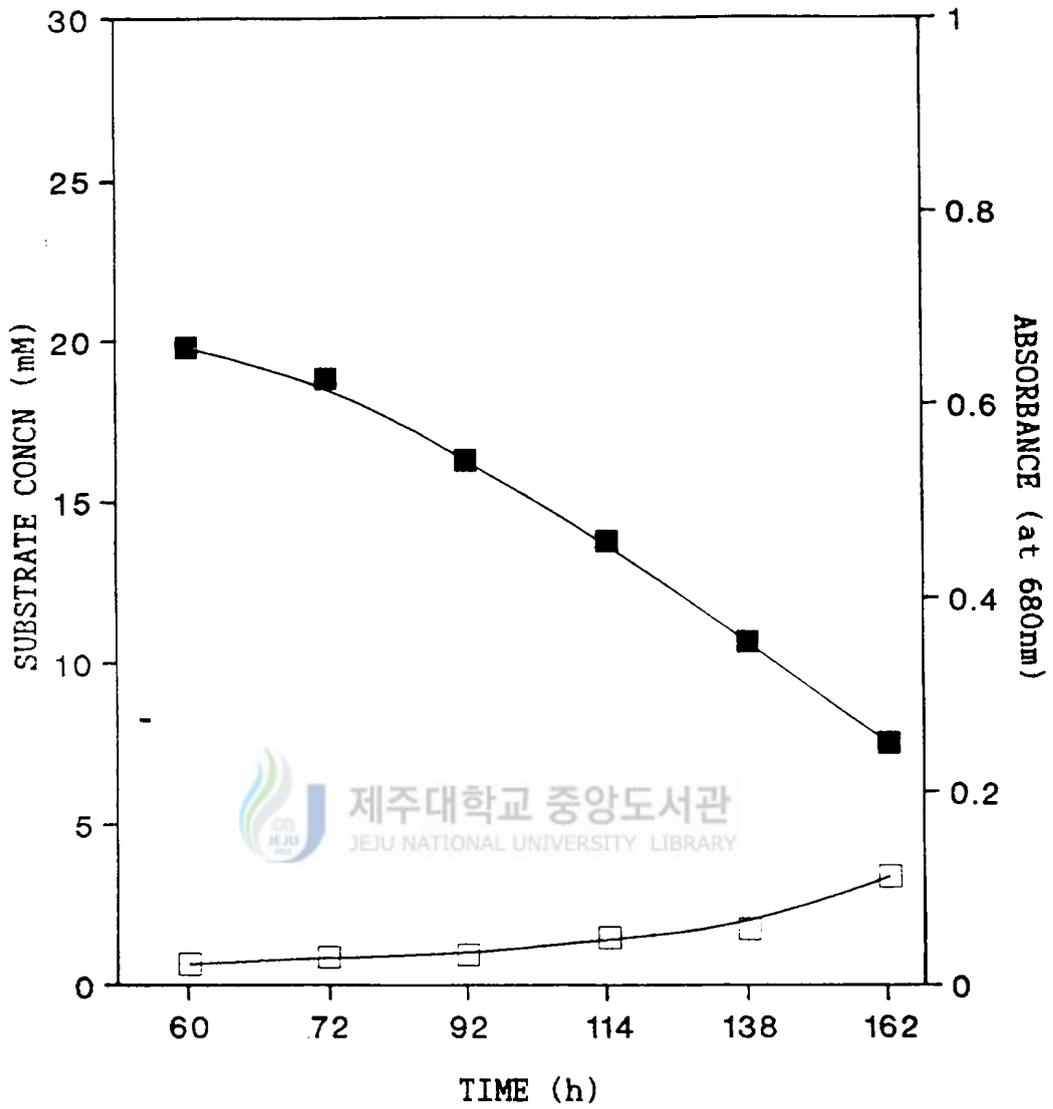


Fig.4. Substrate consumption of *Rhodospirillum rubrum* cultured on glutamate.

■ ,glutamate concentration ; □ ,A₆₈₀

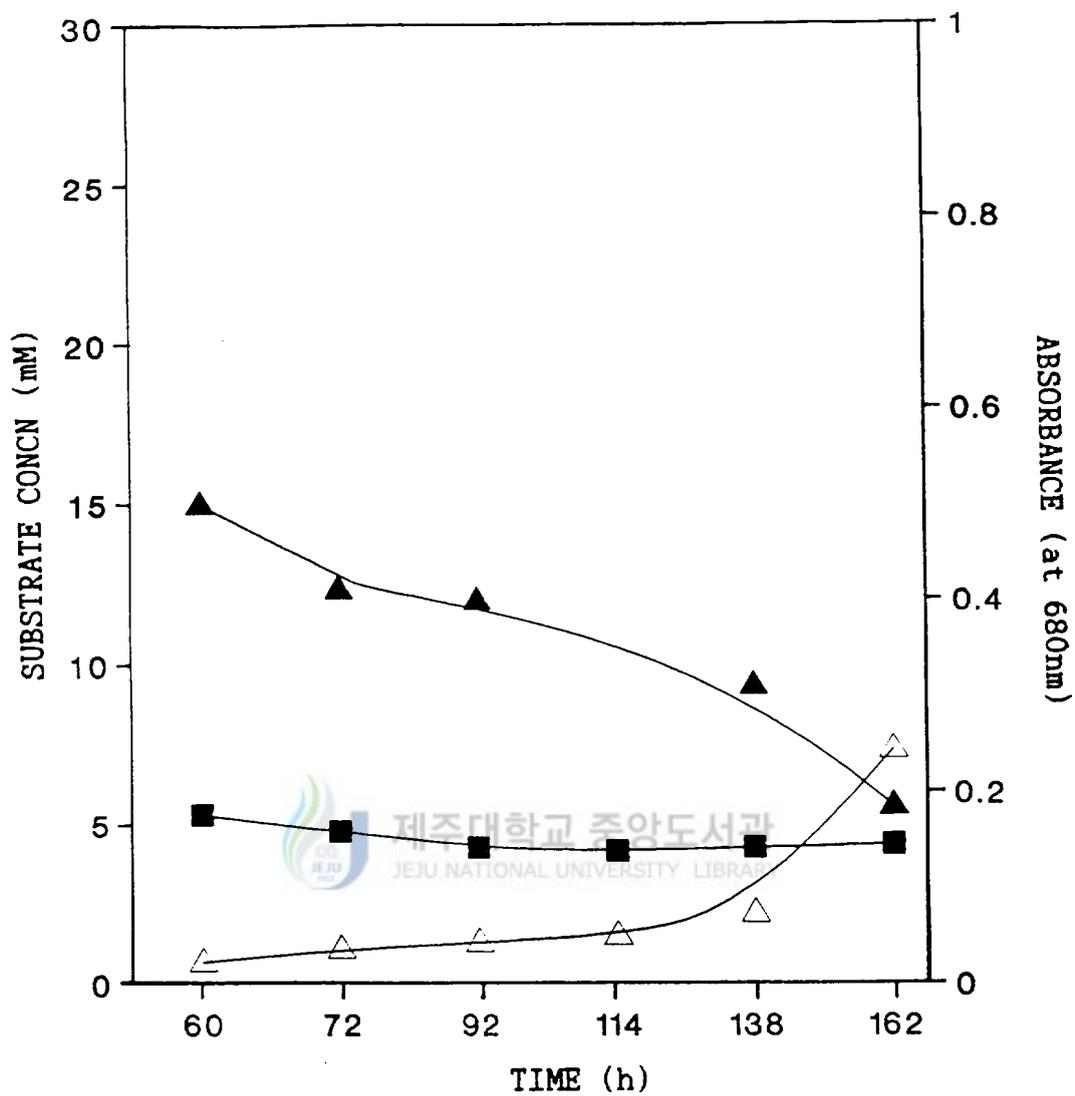


Fig.5. Substrate consumption of *Rhodospirillum rubrum* cultured on glutamate-alanine mixture.

■ ,glutamate concentration ; △ ,A₆₈₀ ;
 ▲ ,alanine concentration

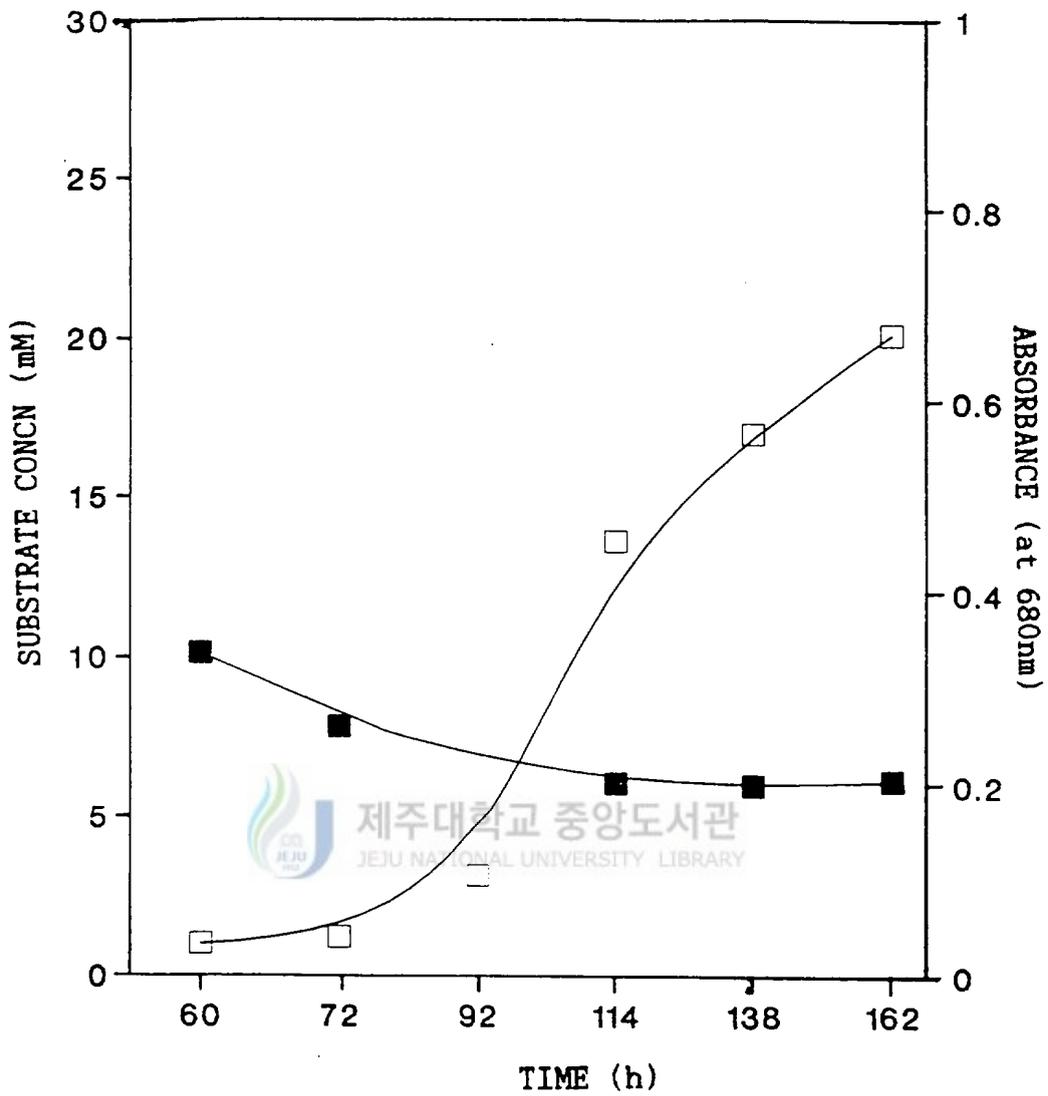


Fig.6. Substrate consumption of *Rhodospirillum rubrum* cultured on acetate-glutamate mixture.

■ , glutamate concentration ; □ , A₆₈₀

나타낸 것으로 glutamate를 단독으로 사용한 경우의 시간별 glutamate소비경향 (Fig.4)보다 acetate와 혼합한 경우(Fig.6) glutamate가 비교적 서서히 감소되었음을 알 수 있었다. 이것으로 미루어 보아 acetate와 glutamate를 혼합한 경우 나타나는 급격한 생장의 상승효과는 *R.rubrum*이 glutamate보다 acetate를 선호하여 acetate의 급격한 사용에 의해 생장이 큰 폭으로 증가하는 것으로 사료되며 glutamate가 acetate 이용을 촉진하는 어떤 효과가 있는 것으로 보인다.

3. 생세포의 흡광도

Fig.7과 8은 단독 탄소원중 가장 낮은 생장을 보인 glutamate와 혼합 탄소원중 가장 높은 성장 상승효과를 보인 acetate-glutamate 혼합배양에서 생세포의 경시적 흡광도 변화를 나타낸 것이다.

Fig.7은 glutamate를 단독으로 사용하여 배양한 경우로 138시간이 되어서야 광파장 883nm에서 Bchl의 peak가 나타나기 시작했고 500nm부근의 carotenoid의 peak는 162시간이 되어서야 조금씩 나타남으로써 생세포의 흡광도로는 배양후 상당한 시간이 지난 후에야 색소 형성정도를 알 수 있었다.

Fig.8은 acetate와 glutamate를 혼합한 경우를 나타낸 것으로 72시간에서 Bchl의 peak가 극히 조금 나타나기 시작하여 92시간에서는 뚜렷한 peak를 볼 수 있었으며, 이때 carotenoid의 peak가 서서히 나타나기 시작하여 114시간 이후 그 peak가 더욱 뚜렷해졌다.

나머지 data는 제시하지 않았으나 malate 단독, glutamate-malate 혼합, acetate-malate, acetate-glutamate, malate-alanine 혼합에서와 같은 탄소원의 경우는 Fig.8과 비슷한 유형을 나타내었고, 비교적 생장이 저조한 단독 탄소원인 acetate, glutamate, alanine과 acetate-alanine 혼합, glutamate-alanine 혼합 탄소원에서는 Fig.7과 비슷한 유형을 나타내었다. 또한 탄소원에 관계없이 항상 Bchl의 peak는 아주 초기부터 carotenoid의 peak보다 비교적 먼저 뚜렷하게 나타나는 것을 볼 수 있었지만 초기배양시 생세포의 흡광도로는 carotenoid가 전혀 합성되지 않아서 peak가 나타나지 않은 것인지, peak가 나타나지 않을 정도로 소량 형성되어서인지 확실히

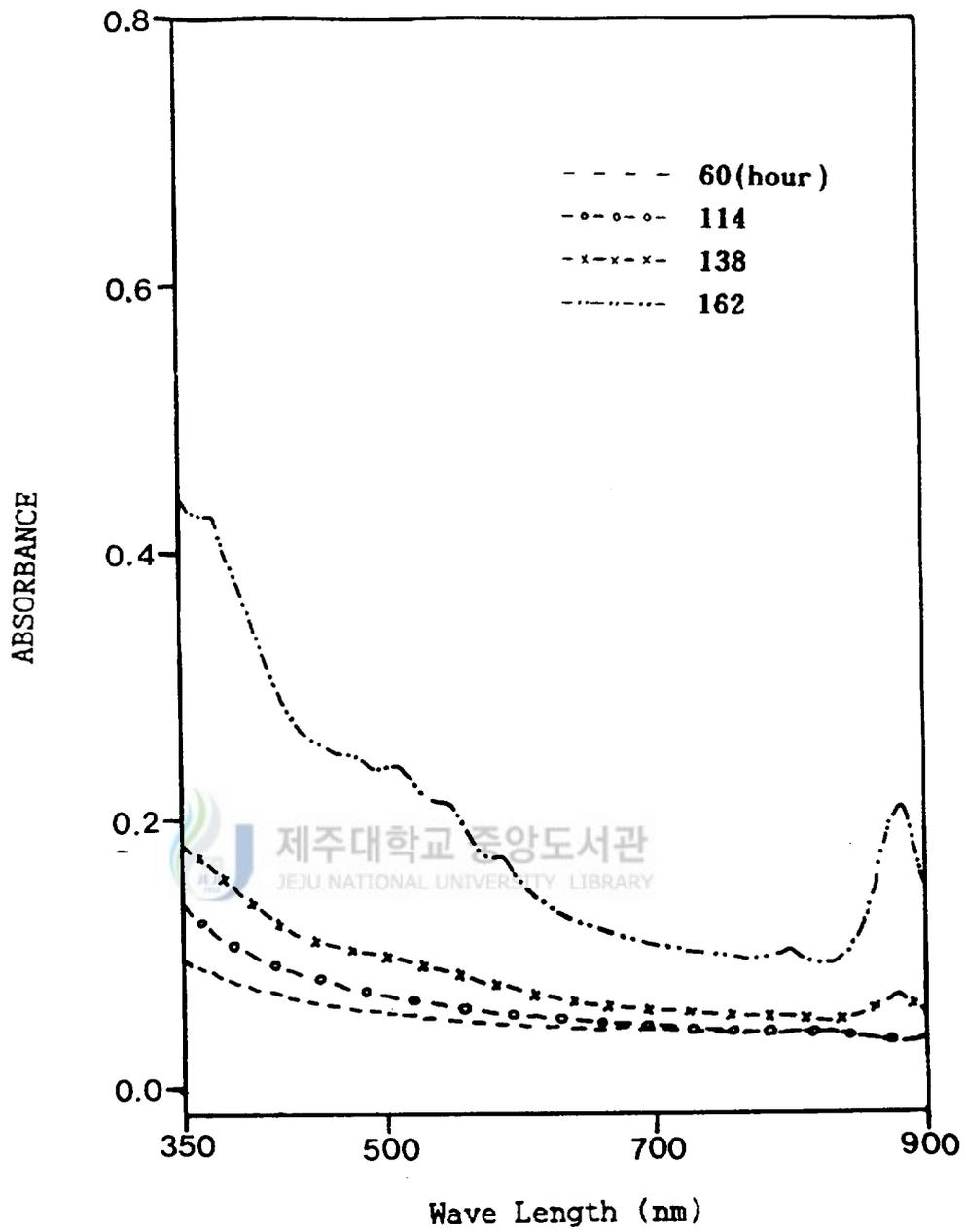


Fig.7. Absorption spectra of intact cells of *Rhodospirillum rubrum* cultured on glutamate.

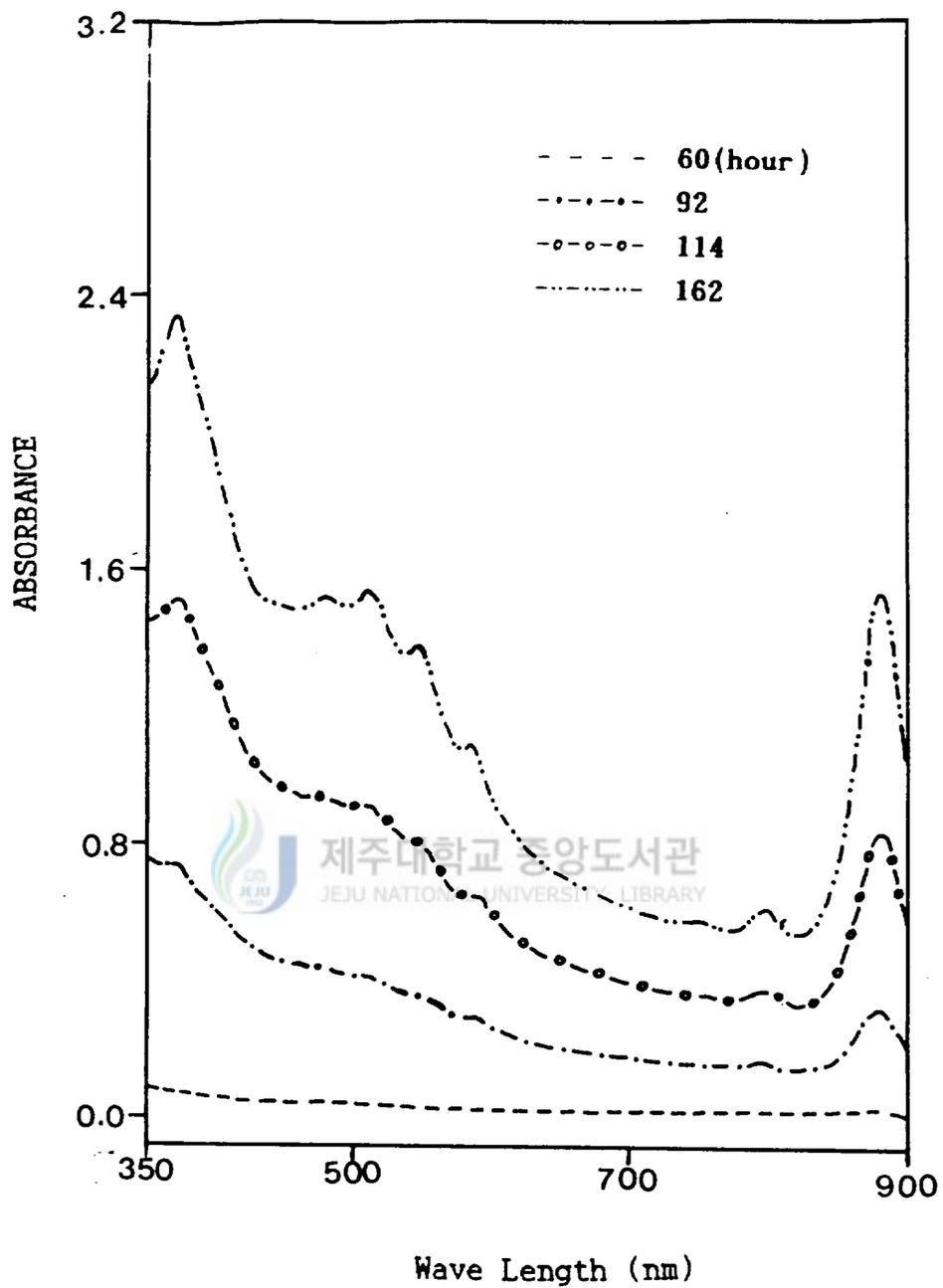


Fig.8. Absorption spectra of intact cells of *Rhodospirillum rubrum* cultured on acetate-glutamate mixture.

알 수 없고, carotenoid와 Bchl형성에 있어 그 시간 관계가 어떤지 명확하게 구분하기 어려웠다.

4. 추출 색소의 배양 시간별 흡광도 변화

Fig.9는 glutamate에서 배양한 세포에서 추출한 색소의 흡광도, Fig.10은 acetate와 glutamate를 혼합하여 배양한 세포에서 추출한 색소 흡광도를 나타낸 것이다. acetate, glutamate, alanine에서는 Fig.9와 비슷한 유형을 나타냈고, malate배지와 혼합 탄소원배지에서는 Fig.10과 비슷한 유형을 나타내었으며 탄소원에 따라 각 파장에서의 흡광 정도나 색소 형성 시간은 다소 차이가 있었다. 대부분의 경우 색소를 추출했을 때는 생세포에서와는 달리 Bchl과 carotenoid의 peak가 거의 동시에 나타났으며 색소 형성 역시 탄소원을 혼합했을 때가 단독으로 사용했을 때보다 더욱 크게 이루어지고 있어 생장과 색소형성 증가는 비례적이라는 Cohen-Bazire와 Kunisawa(1960)의 보고와 다소 일치하고 있다.

Fig.9에서 볼 때 glutamate에서는 138시간에 Bchl과 carotenoid의 흡광파장에 약간의 peak가 나타나기 시작하여 162시간에 와서야 772nm와 495nm에서 뚜렷한 peak가 나타나고 있었고 carotenoid의 peak가 Bchl의 peak보다 약간 높게 나타나고 있었다.

Fig.10에서 볼 때, acetate-glutamate 혼합에서는 92시간과 114시간 사이에서 색소 형성이 많이 이루어지고 있었고, 초기에는 772, 600, 450-550nm에서 Bchl, bacteriopheophytin, spirilloxantin에 의한 peak(van der Rest and Gingras, 1974)가 나타나고 있었는데 시간이 경과될수록 450-550nm에서의 peak가 772nm에서 나타나는 peak보다 상대적으로 높게 나타나고 있어 Cohen-Bazire *et al.*(1957)의 보고와 일치하고 있다.

본 결과에서보면 Bchl의 최대 peak는 772nm에서, carotenoid의 최대 peak는 495nm에서 나타나고 있는데 이는 Vernone과 Garcia(1967)의 결과와는 유사하지만 carotenoid의 최대 peak는 474nm에서 나타난다는 보고(Uffen, 1985 ; Schwerzmann and Bachofen, 1989)와는 다소 차이를 보이고 있었다. 이런 차이는 색소 추출후 흡광도를 측정하

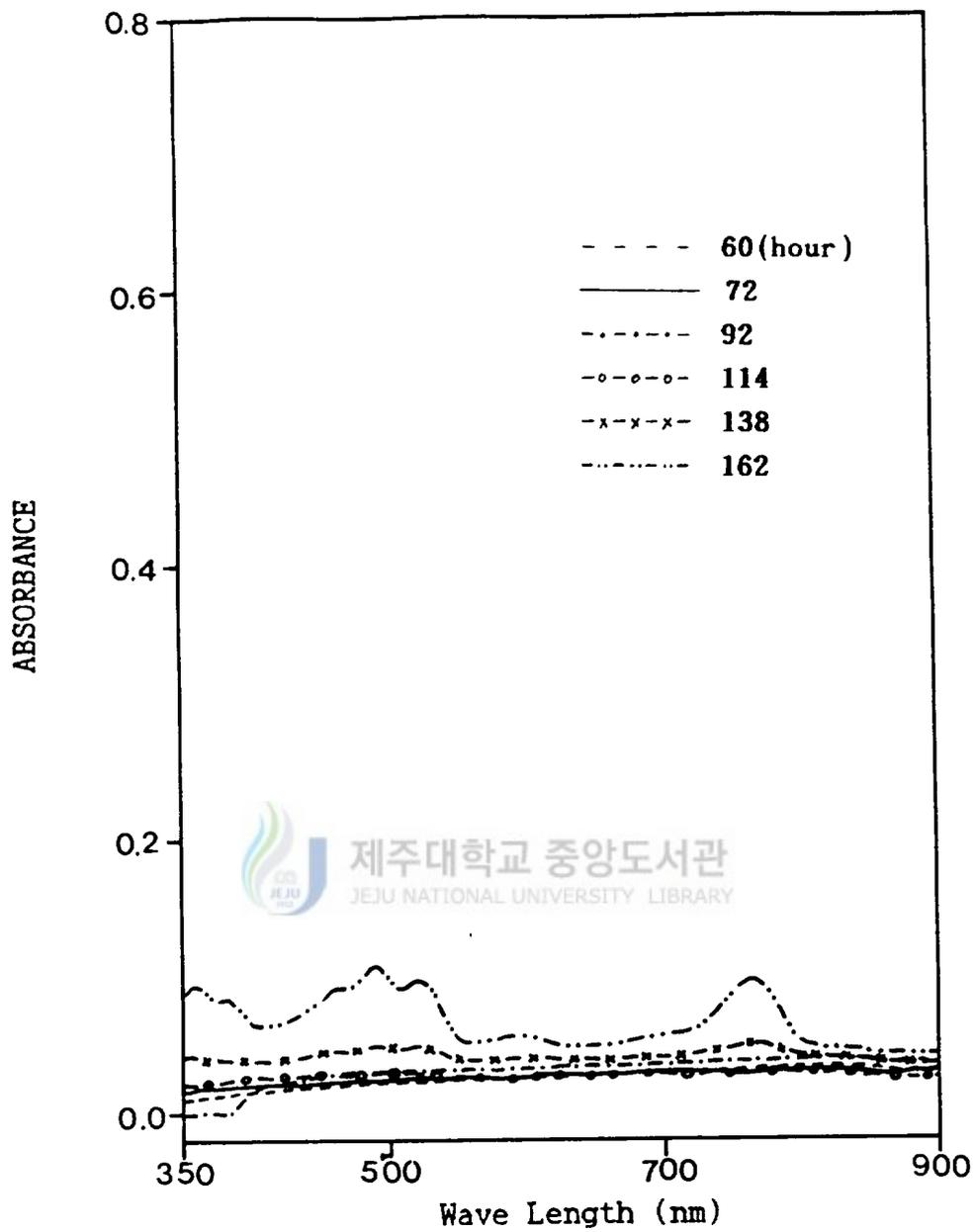


Fig.9. Absorption spectra of photosynthetic pigments from *Rhodospirillum rubrum* cultured on glutamate. (Solvent ; acetone: methanol= 7:2, v/v)

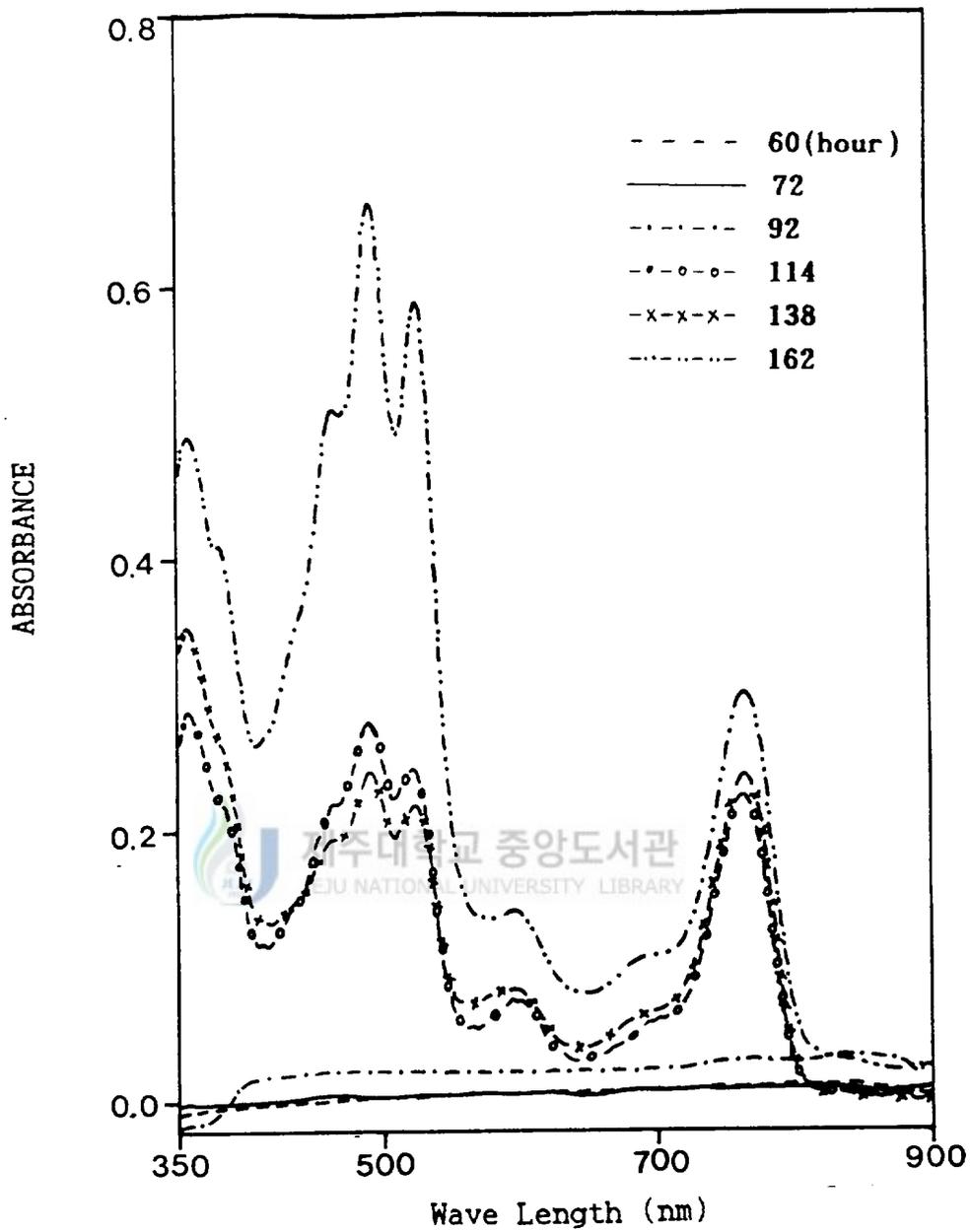


Fig.10. Absorption spectra of photosynthetic pigments from *Rhodospirillum rubrum* cultured on acetate-glutamate mixture. (Solvent ; acetone: methanol = 7:2, v/v)

는 과정에서 측정 시간을 지체했을 때 빛에 노출된 시간에 의해 짧은 파장쪽으로 peak의 이동이 생겼기 때문이라 생각된다.

5. 추출 색소의 비함량

탄소원에 따른 Bchl과 carotenoid의 비함량은 Fig.11-14와 같다.

Fig.11과 12는 흡광도 772nm에서의 탄소원에 따른 Bchl 비함량을 나타낸 것이다. Fig.11은 단독 탄소원배양에서의 Bchl 비함량을 비교한 것으로 탄소원별로 큰 차이는 없으나 alanine에서의 비함량이 비교적 높고 malate에서 낮게 나타났는데, 이처럼 malate에서보다 생장률이 낮은 alanine에서 Bchl 비함량이 오히려 아주 높게 나타나고 있는 것은 특이한 점이었다.

Fig.12는 혼합하여 사용한 탄소원에서의 Bchl 비함량을 비교한 것으로 탄소원별로 큰 차이는 없으나 glutamate-alanine 혼합에서 비교적 높고, acetate-glutamate 혼합에서는 낮은 비함량을 나타내었는데 acetate-glutamate, acetate-malate, glutamate-malate 혼합에서는 단독으로 사용했을 때보다 낮은 값을 나타내고 있었고, 나머지 혼합에서는 높은 값을 나타내고 있었다. 혼합 탄소원에서의 생장과 비교했을 때 낮은 생장을 보였던 glutamate-alanine, acetate-alanine, malate-alanine 혼합에서의 Bchl 비함량이 높게 나타났고, 단독일 때보다 혼합했을 때 생장이 상당히 증가했던 acetate-glutamate 혼합에서 Bchl 비함량이 가장 낮게 나타나고 있다는 것은 특이한 점이라 할 수 있겠다.

이상의 결과를 가지고 볼 때 alanine이 들어갔을 때는 단독 또는 혼합 탄소원 모두에서 Bchl 비함량이 높게 나타나는 경향을 볼 수 있었고, 탄소원을 단독으로 사용한 경우에 비해 혼합했을 때 뚜렷한 생장의 상승효과를 보인 것과는 달리 Bchl 비함량은 혼합했을 때 뚜렷한 상승효과를 보이고 있지 않아 세포 성장량과 색소 함량이 꼭 일치하지는 않는 것으로 보인다. 이는 세포 성장량과 색소 함량이 일치하지는 않는다는 Solaiman 과 Uffen(1982)의 결과와 일치되며, 세포의 Bchl 비함량은 일정한 Bchl을 함유하는 세포 내막의 많고 적음에 의존한다는 보고(Holt and Marr, 1965)에 비추어 볼 때 alanine에서 자란 세포에는 Bchl을 함유하는 세포 내막

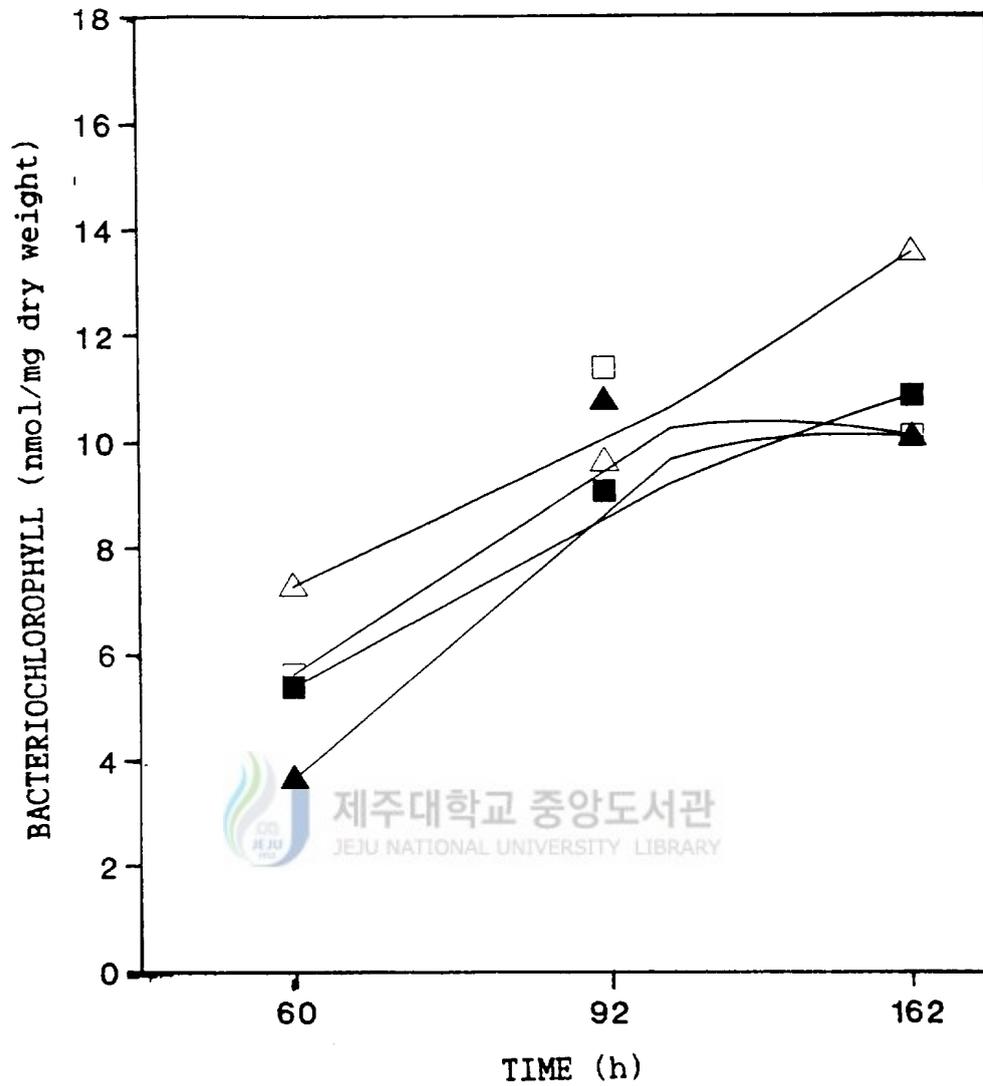


Fig.11. Specific bacteriochlorophyll contents of *Rhodospirillum rubrum* cultured on single carbon sources.

■ ,acetate ; □ ,glutamate ; ▲ ,malate ; △ ,alanine

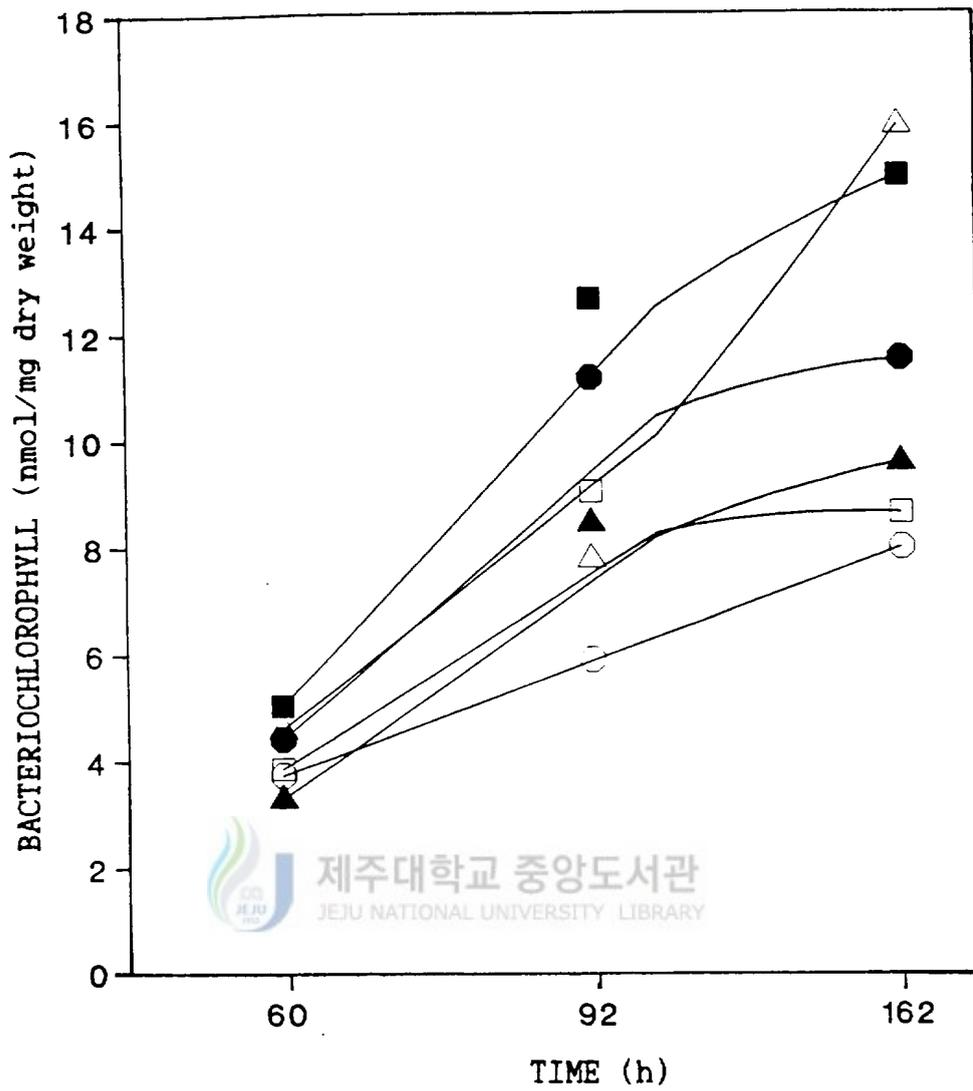


Fig.12. Specific bacteriochlorophyll contents of *Rhodospirillum rubrum* cultured on mixed carbon sources.

- , acetate-glutamate ; □ , acetate-malate
- , acetate-alanine ; ▲ , glutamate-malate
- △ , glutamate-alanine ; ● , malate-alanine

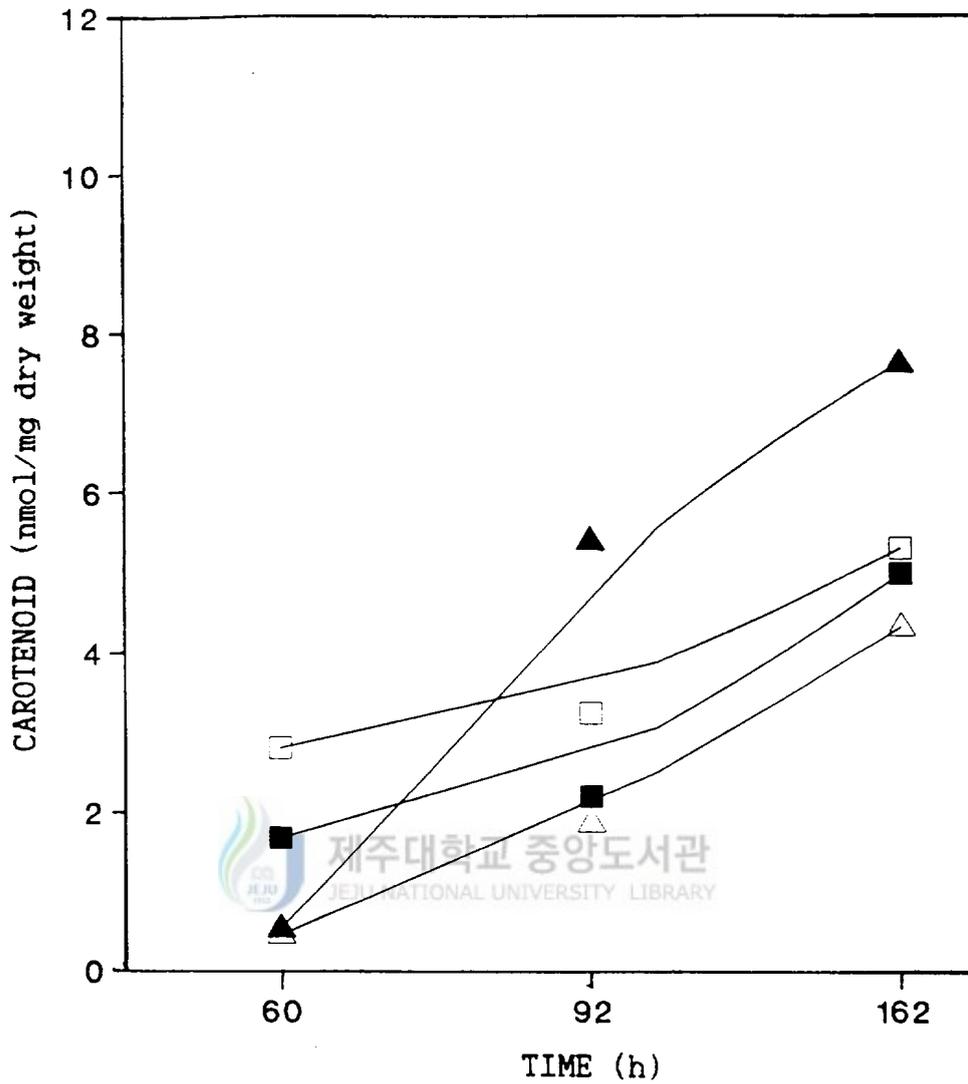


Fig.13. Specific carotenoids contents of *Rhodospirillum rubrum* cultured on single carbon sources.

■ ,acetate ; □ ,glutamate ; ▲ ,malate ; △ ,alanine

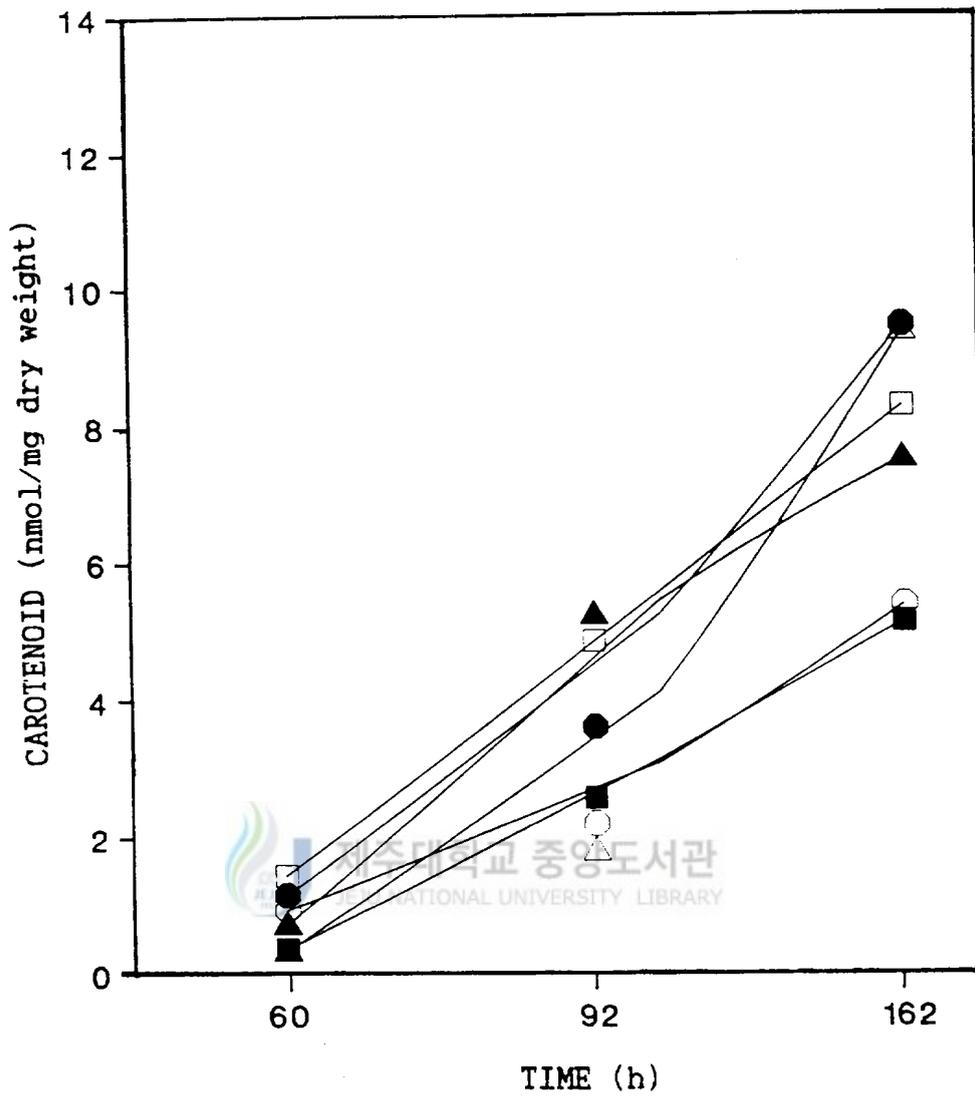


Fig.14. Specific carotenoids contents of *Rhodospirillum rubrum* cultured on mixed carbon sources.
 ○ , acetate-glutamate ; □ , acetate-malate
 ■ , acetate-alanine ; ▲ , glutamate-malate
 △ , glutamate-alanine ; ● , malate-alanine

이 malate에서 자란 세포에서 보다 더 많아진 것이 아닌가 생각된다.

Fig.13과 14는 광파장 495nm에서의 탄소원에 따른 carotenoid의 비합량을 나타낸 것이다. Fig.13은 단독 탄소원에서의 carotenoid 비합량을 비교한 것으로 malate에서 가장 높고 alanine에서 가장 낮게 나타나고 있어 Bchl 비합량과는 다소 다른 양상을 보이고 있었으며, 배양초기에는 대단히 낮은 비합량을 보이다가 시간이 경과할수록 많은 증가를 보이고 있었는데 생장률이 높은 malate에서는 carotenoid 비합량도 높게 나타나고 있어서 Bchl 비합량에서의 결과와는 차이를 나타내고 있었다.

Fig.14는 혼합하여 사용한 탄소원에서의 carotenoid 비합량을 비교한 것으로 malate-alanine, glutamate-alanine 혼합에서 높고 acetate-glutamate, acetate-alanine 혼합에서 낮게 나타나고 있어 Bchl 비합량 비교와는 다소 유사하긴 하나 다른 양상을 보이고 있으며, acetate-glutamate, acetate-alanine 혼합에서는 단독으로 사용했을 때의 malate값보다 낮게 나타났고 나머지 혼합에서는 모두 상승효과가 있었다. 혼합 탄소원에서의 생장과 비교해 봤을 때 carotenoid 비합량은 탄소원에 따른 생장과도 다소 다른 양상을 보이고 있으나 탄소원을 혼합했을 때가 단독일 때에 비해 더 큰 상승효과를 볼 수 있었다는 점에서는 유사했다.

이상의 결과로부터 같은 시간의 배양에서 carotenoid 비합량은 Bchl 비합량보다 낮다는 것을 알 수 있는데 이는 Nordlund *et al.*(1985)의 보고와 일치하고 있다. 또한 색소 형성은 생장시간과 탄소원에 따라 다르며 탄소원을 혼합했을 때 생장과 색소 형성에 미치는 효과는 다소 차이가 있으며, 세포 생장량과 색소 함량은 서로 일치하고 있지 않는 것으로 생각된다.

6. 세포내 색소의 비합량비

Table 1은 탄소원별로 Bchl에 대한 carotenoid의 비합량비를 나타낸 것이다.

탄소원을 단독으로 사용했을 때의 비합량비는 초기에는 glutamate에서 가장 높고, alanine에서 가장 낮았으나 시간이 경과할수록 malate에서 가장 높고 alanine에

서 가장 낮았으며, 탄소원을 혼합하여 사용했을 때의 비합량비는 acetate-malate 혼합에서 가장 높고, acetate-alanine 혼합에서 가장 낮았다.

특이한 것은 단독 탄소원이든 혼합 탄소원이든 alanine이 포함된 배지에서의 비율이 대체적으로 낮은 경향을 보인 반면에 malate가 포함된 배지에서는 비교적 높은 비율을 나타낸 것이었다.

전체적으로 볼 때 초기에는 carotenoid의 비합량이 Bchl에 비해 50% 이하였으나 배양 시간이 경과함에 따라 대부분 carotenoid의 비율이 높아져서 92시간 배양의 경우 대개 20-62%정도 되었고,

[Table 1] Ratios of specific contents of carotenoid to Bchl from *Rhodospirillum rubrum* cultured on various carbon sources at different culture time.

Carbon source	Ratios (%)		
	60	92	162(h)
Acetate	31	24	46
Glutamate	50	29	53
Malate	15	50	76
Alanine	6	19	32
Acetate-Glutamate	25	37	67
Acetate-Malate	37	54	96
Acetate-Alanine	7	20	34
Glutamate-Malate	22	62	78
Glutamate-Alanine	7	23	59
Malate-Alanine	26	32	82

162시간이 되면 낮게는 alanine배지에서의 32%로부터 높게는 acetate-malate배지에서와 같이 96%까지 되었다. 이런 비합량비의 변화는 Bchl에 대한 carotenoid의 비율은 모든 생장기간 동안 변하지 않는다는 보고(Schwerzmann and Bachofen, 1989.)와는 일치하지 않았다.

그러나 변화의 폭이 다소 크기는 하지만 162시간 배양의 경우 탄소원의 종류에 관계없이 대체적으로 비율이 50%가까이 나타나고 있어 보통 세포에서 Bchl에 대한 carotenoid의 함량비가 1:2라는 보고(Schwerzmann and Bachofen,1989 ; Picorel *et al.*, 1983)와 어느 정도 일치한다고 생각된다.



참 고 문 헌

- Arnheim, K. and J.Oelze(1983), "Differences in the control of bacteriochlorophyll formation by light and oxygen", *Arch.Microbiol*, Vol.135. pp.299-304.
- Bernt,E.B. and Bergmeyer,H.U.(1974), "L-glutamate, UV-assay with glutamate dehydrogenase and NAD", In Bergmeyer, H.U.(Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*, vol.4. pp.1704-1708.
- Bose,S.K., Gest,H., Ormerod,J.G.(1962), "Light-activated hydrogenase activity in photosynthetic bacterium:A permeability phenomenon", *J.Biol.Chem*, Vol. 236, No.3. pp.13-14.
- Brooke,A.G. and M.M.Attwood(1983), "Regulation of enzyme synthesis during the growth of *hypomicrobium* X on mixtures of methylamine and ethanol", Vol.129. pp.2399-2404.
- Cohen-Bazire,G. and R.Kunisawa(1960), "Some observations on the synthesis function of the photosynthetic apparatus in *Rhodospirillum rubrum*", P.N.A.S., Vol.46. pp. 1543-1553.
- Cohen-Bazire,G., W.R.Sistrom and R.Y.Stanier(1957), "Kinetic studies of pigment synthesis by non-sulfer purple bacteria", *J.Cell. Comp. Physiol*, Vol.49. pp.25-68.
- Coleman,G.S.(1959), "The effect of D,L-glutamic acid on the growth of *Rhodospirillum rubrum*", *Biochim. Biophys. Acta*.59, Vol.31. pp.55-65.
- Elsden,S.R. and J.G.Ormerod(1956), "The effect of monofluoroacetate on the metabolism of *Rhodospirillum rubrum*". *Biochem*, Vol.63. pp.691-701.
- Gest,H., J.G.Ormerod, and K.S.Ormerod(1962), "Photometabolism of *Rhodospirillum rubrum* : Light-dependent dissimilation of organic compounds to carbon dioxide and molecular hydrogen by an anaerobic citric acid cycle", *Arch. Biochim. Biophys*, vol.97. pp.21-33.

- Grether-Beck, S. and J. Oelze (1987), "The development of the photosynthetic apparatus and energy transduction in malate-limited phototrophic cultures of *Rhodobacter capsulatus*", *Arch. Microbiol.*, Vol. 149. pp. 70-75.
- Holt, S.C. and A.G. Marr (1965), "Effect of light intensity on the formation of intracytoplasmic membrane in *Rhodospirillum rubrum*". *J. Bacteriol.*, Vol. 89, No. 5, May. pp. 1421-1429.
- Horio, T. and Kamen, A.G. (1962), "Observations on the respiratory system of *Rhodospirillum rubrum*", *Biochem.*, Vol. 1, No. 6. pp. 1141-1157.
- Iba, K. and K. Takamiya (1989), "Action spectra for inhibition by light of accumulation of bacteriochlorophyll and carotenoid during aerobic growth of photosynthetic bacteria", *Plant Cell Physiol.*, Vol. 30, No. 4. pp. 471-477.
- Janssen, P.H. (1992), "Growth yield increase and ATP formation linked to succinate decarboxylation in *Veillonella parvula*", *Arch. Microbiol.*, Vol. 157, pp. 442-445.
- Jensen, S.L. and A. Jensen (1971), "Quantitative determination of carotenoids in photosynthetic tissues", *Methods Enzymol.*, Vol. 23. pp. 586-602.
- Kelley, D.P. (1974), "Growth and metabolism of the obligate photolithotroph *Chlorobium thiosulfatophilum* in the presence of added organic nutrients," *Arch. Microbiol.* 100. pp. 163-178.
- Knight, M. (1962), "The photometabolism of propionate by *Rhodospirillum rubrum*", *Biochem. J.*, vol. 84. pp. 170-185.
- Kohlmiller, E.F. Jr., and H. Gest (1951), "A comparative study of the light and dark fermentations of organic acids by *Rhodospirillum rubrum*", *J. Bacteriol.*, Vol. 61. pp. 269-282.
- Loubière, P., E. Gros, V. Paquet and N.D. Lindley (1992a), "Kinetics and physiological implications of the growth behavior of *Eubacterium limosum* on glucose/methanol mixtures", *Journal of General Microbiology*, Vol. 138, pp. 979-985.

- Loubière,P. and N.D.Lindley(1991), "The use of acetate as an additional co-substrate improves methylotrophic growth of the acetogenic anaerobe *Eubacterium limosum* when CO₂ fixation is rate-limiting", *Journal of General Microbiology*, Vol.137. pp.2247-2251.
- Loubière,P., P.Salou, M.J.Leroy, N.D.Lindley and A.Pareilleux(1992b), "Electrogenic malate uptake and improved growth energetics of the malolactic bacterium *Leuconostoc oenos* grown on glucose-malate mixtures", *J.Bacteriol*, Vol.174, pp.5302-5308.
- Madigan,M., J.C.Cox and H.Gest(1982), "Photopigments in *Rhodopseudomonas capsulata* cells grown anaerobically in darkness", *J.Bacteriol*, Vol.150, June. pp.1422-1429.
- Nordlund,S., R.H.Kanemoto, S.A.Murrell and P.W.Ludden(1985), "Properties and regulation of glutamine synthetase from *Rhodospirillum rubrum*", *J.Bacteriol*, Vol.161, No.1, January. pp.13-17.
- Oelze,J.(1988), "Regulation of tetrapyrrole synthesis by light in chemostat cultures of *Rhodobacter sphaeroides*", *J.Bacteriol*, Vol.170. pp. 4652-4657.
- Olsen,I. and J.M.Merrick(1968), "Identification of propionate as endogenous CO₂ acceptor in *Rhodospirillum rubrum* and properties of purified propionyl coenzyme a carboxylase," *J.Bacteriol*, Vol.95, No.4, May. pp.1774-1778.
- Oelze,J.and W.Pahlke(1976), "The Early Formation of the photosynthetic apparatus in *Rhodospirillum rubrum*", *Arch.Microbiol*, Vol.108. pp.281-285.
- Picorel,R., G.Bélanger and G.Gingras(1983), "Antenna holochrome E880 of *Rhodospirillum rubrum* S1. pigment, phospholipid,and polypeptide composition", *Biochemistry*, Vol.22, pp.2491-2497.
- Schultz,J.E., J.W.Gotto, P.F.Weaver and D.C.Yoch(1985), "Regulation of nitrogen fixation in *Rhodospirillum rubrum* grown under dark, fermentative conditions", *J.Bacteriol*, Vol.162, No.3, June. pp.1322-1324.

- Schultz, J.E. and P.F. Weaver (1982), "Fermentation and anaerobic respiration by *Rhodospirillum rubrum* and *Rhodopseudomonas capsulata*", *J. Bacteriol*, Vol. 149, No.1, January. pp.181-191.
- Schwerzmann, R.U. and R. Bachofen (1989), "Carotenoid profiles in pigment-protein complexes of *Rhodospirillum rubrum*", *Plant cell physiol*, Vol.30, No.4. pp.497-504.
- Solaiman, D. and R.L. Uffen (1982), "Pyruvate-dependent diauxic growth of *Rhodospirillum rubrum* in light", *J. Bacteriol*, Vol.152, No.3, December. pp.1175-1187.
- Stahl, C.L. and G.A. Sojka (1973), "Growth of *Rhodopseudomonas capsulata* on L-AND, D-malic acid", *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol.297. pp.241-245.
- Takamiya, K., Y. Shioi, H. Shimada and H. Arata (1992), "Inhibition of accumulation of bacteriochlorophyll and carotenoids blue light in anaerobic photosynthetic bacterium, *Roseobacter denitrificans*, during anaerobic respiration", *Plant Cell Physiol*, Vol.33, No.8. pp.1171-1174.
- Thore, A., D.L. Keister and A.S. Pietro (1969), "Studies on the respiratory system of aerobically (dark) and anaerobically (light) growth *Rhodospirillum rubrum*", *Arch. Microbiol*, Vol.67, pp.378-396.
- Uffen, R.L. (1973a), "Growth properties of *Rhodospirillum rubrum* mutants and fermentation of pyruvate in anaerobic, dark conditions", *J. Bacteriol*, Vol.116. pp.874-884.
- Uffen, R.L. (1973b), "Effect of low-intensity light on growth response and bacteriochlorophyll concentration on *Rhodospirillum rubrum* mutant C", *J. Bacteriol*, Vol.116. pp.1086-1088.
- Uffen, R.L. (1985), "Influence of pH, O₂ and temperature on the absorption properties of the secondary light-harvesting antenna in members of the family *Rhodospirillaceae*", *J. Bacteriol*, Vol.163, No.3, September. pp.943-950.
- Uffen, R.L. and R.S. Wolfe (1970), "Anaerobic growth of purple nonsulfur bacteria under dark conditions", *J. Bacteriol*, Vol.104. pp.462-472.

- Van der Rest, M. and G. Gingras (1974), "The pigment complement of the photosynthetic reaction center isolated from *Rhodospirillum rubrum*", *J. Bacteriol. Chemist*, Vol. 249, No. 20, October. pp. 6446-6453.
- Van Niel, C. B. (1941), "The bacterial photosynthesis and their importance for the general problem of photosynthesis", *Adv. Enzymol*, Vol. 1. pp. 263-328.
- Vernon, L. P. and A. F. Garcia (1967), "Pigment-protein complexes derived from *Rhodospirillum rubrum* chromatophores by enzymatic digestion", *Biochim. Biophys. Acta*, Vol. 143. pp. 144-153.
- Williamson, D. H. (1974), "L-Alanine, determination with alanine dehydrogenase", In Bergmeyer, H. U. (Ed), *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. 4. pp. 1679-1682.



<Abstract>

The Effects of Carbon Sources on the Growth, Formation of
Bacteriochlorophyll and Carotenoids in a Photosynthetic
Bacterium, *Rhodospirillum rubrum*

Song, Seung - Heui

Biology Education Major

Graduate School of Education, Cheju National University

Cheju, Korea

Supervised by Professor Oh, Duck - Chul

The effects of organic compounds, acetate, alanine, glutamate and malate, on the growth and formation of photosynthetic pigments as sole and mixed carbon sources were tested in a photosynthetic bacterium, *Rhodospirillum rubrum*.

The cell yield of *R. rubrum* cultured on glutamate-malate mixture exhibited highest value and showed lowest one by using glutamate as sole carbon source.

The cell yields of cultures on mixed carbon sources were higher than those on single carbon source. Especially, the cell yield of cultures on acetate-glutamate as mixed carbon source were much higher than those on single

* A thesis submitted to the Committee of the Graduate School of Education, Cheju National University in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Education in August, 1993.

carbon source separately.

It looks like that *R.rubrum* uses acetate preferentially than glutamate as carbon source in the acetate-glutamate mixture.

The formation of Bchl and carotenoids was initiated simultaneously regardless of the kind of carbon source.

Generally, the formation of photosynthetic pigments was more stimulated by mixed carbon sources than single carbon source.

The effects of carbon sources on the growth and formation of photosynthetic pigments were not coincided.

The ratios of specific contents of carotenoids to bacteriochlorophyll were about 1:2 with some variations according to carbon sources.

