

光合成細菌에 대한 研究

I. 野生型 *Rhodospirillum rubrum* 에 의한 水溶性 色素의 生産

吳德鐵 · 李賢順*

Studies on the Photosynthetic Bacteria II. The Production of Water-Soluble Pigments by wild type of *Rhodospirillum rubrum*

Duck-Chul Oh · Hyun-Soon Lee

Summary

1. Korean strain of wild type of *Rhodospirillum rubrum* excretes water-soluble pigments into the medium when grown anaerobically under light.
2. The absorption spectrum of the supernatant medium shows peaks at 392.5 (main peak), 500, 535 m μ together with shoulders at 370, 555 m μ .
3. Water-soluble pigments show pinkish-orange fluorescence under short-wave ultraviolet light.
4. The optical density of the supernatant medium increases markedly with time when aerated under dark, room temperature.
5. The culture of *R. rubrum* shows no distinct differences in the excretion of water-soluble pigments when cultured in orthophosphate or pyrophosphate medium as inorganic phosphate source.
6. It is postulated that the water-soluble pigments excreted by the wild type of *R. rubrum* are mixture of a few kinds of porphyrins.

緒 言

오래전에 Van Niel(1944)은 그의 綜說에서 *Rhodospseudomonas* 屬의 數種이 嫌氣狀態의 明培養에서 粉紅 및 赤色の 水溶性 色素를 形成한다고 報告하였고, 이 色素는 그 후에 Porphyrin 化合物이라는 것이 Lascelles(1962)에 의해서 밝혀졌다.

또한, Cohen-Bazire 등(1957)은 野生型 *R.sphaeroides* 가 赤褐色의 水溶性 色素를 形成하며 405 m μ 에서 날카로운 Soret peak 를 나타낸다고 하였다.

Sistrom 등은(1956 a, b) *R.sphaeroides* 突然變異株가 綠色의 水溶性 色素를 分泌하며 이를 여러가지 溶媒系를 使用하여 分離한 結果 靑豆, 藍, 綠, 粉紅色 등의 여러가지 色素들로 混合되어 있으며 대체로 Porp-

hyrin 化合物로서 推定하였다.

Lascelles(1966)은 *R.sphaeroides* 突然變異株가 Coproporphyrin(ogen), Iron protoporphyrin Mg protoporphyrin monomethylester, 2-devinyl-2-hydroxyethyl-chlorophyllide a 등 多様な porphyrin 化合物을 形成하는 것으로 밝혔으며 Jones(1963, 1964), Cooper(1963), Pradel and Clement(1975) Drews et al(1971), Richards and Lascelles(1969), Pudek and Richard(1975) 등 많은 사람들이 주로 *R.sphaeroides* 나 *R.capsulata* 의 野生 혹은 變異株로 실험한 결과 많은 種類의 Bacteriochlorophyll 生合成 過程의 中間 產物들이 分비됨을 밝혀내었고, 이런 연구들은 Bacteriochlorophyll 生合成의 經路를 밝혀내는데 크게 기여하고 있다. (Jones, 1978)

그러나 *Rhodospirillum* 屬의 光合成細菌들의 水溶性

* 成均館大學校 理科大學 生物學科

色素分泌는 아직 보고되어 있지 않고 특히 *R. rubrum*의 경우에는 水溶性 色素를 形成하지 않는다고 하였다. (Cohen Bazire *et al* 1975)

著者は 韓國産 野生型 *R. rubrum*이 嫌氣狀態, 明培養에서 明確한 水溶性 色素를 分비함을 發見하고 그 色素의 特徵을 주로 吸收스펙트럼을 中心으로 추적하여 약간의 예비적 결론을 얻었기에 보고하는 바이다.

材料 및 方法

菌株, 培地, 培養方法, 모두 Oh and Lee(1983)의 것 과 同一하다. 共試菌株는 韓國의 壤에서 分離한 野生型 *R. rubrum*이다. (Lee and Lee, 1982)

好氣狀態, 暗培養에서는 色素가 形成되지 않기 때문에 明培養한 것을 실험에 使用하였다.

上澄液의 分離 및 吸光度測定.

3日, 7日 및 10日 배양된 것을 Sorval High Speed Refrigerated Centrifuge 로 약 40,000×에서 30분간 遠心分離하여 細胞가 없는 맑은 上澄液을 얻고 이것을 그대로 Shimadzu uv/vis Recording spectrophotometer(Model uv-240)로써 吸光度를 測定하였다.

아울러 uv 에 의한 螢光發生 試驗은 短波長 紫外線燈 아래서 行하였다.

結果 및 考察

各 培養別 上澄液의 吸收스펙트럼은 그림 1-5와 같다.

그림 1은 3日 배양된 것으로 곧 對數期에 들어갈 것이며 培養液全體는 肉眼으로 볼 때 연한 粉紅色을 띤다.

遠心分離한 후의 上澄液은 아주 약한 色을 나타내었는데 Pi 源으로서 Orthophosphate가 첨가된 배지는 약간 노란색이 섞인 붉은색이며, Pyrophosphate가 첨가된 배지는 노란색이 더 강하게 보였다. 두 가지 다 392.5 mμ에서 약하게 Soret peak를 보이며 500 mμ에 흔적 정도의 약한 peak가 나타났다.

이 時期의 細胞들은 아직 배지속으로 극히 小量의 色素만을 分비한 것으로 보이나 野生型 *R. sphaeroides*의

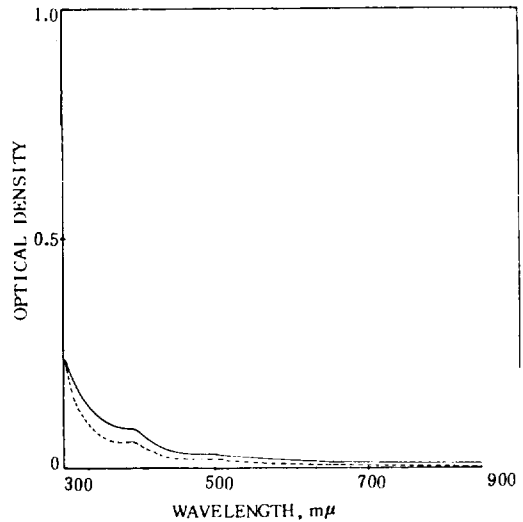


Fig. 1. Absorption Spectra of the Supernatant medium, from 3 days old cultures. 30 min. after Centrifuge.
— Ortho P medium
..... Pyro P medium

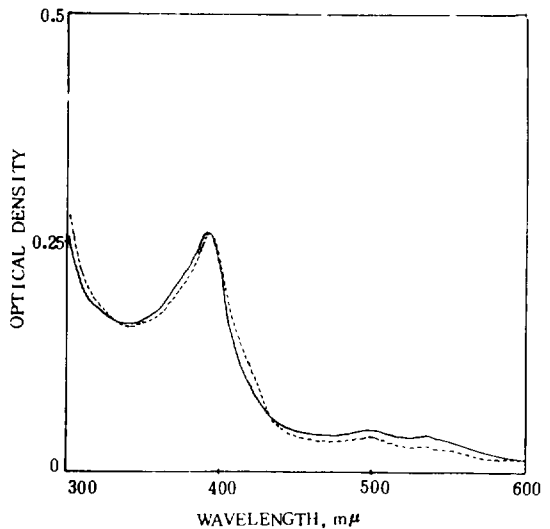


Fig. 2. Absorption Spectra of the Supernatant medium, from 7 days old Cultures. 60 min. after Centrifuge.
— Ortho P medium
..... Pyro P medium

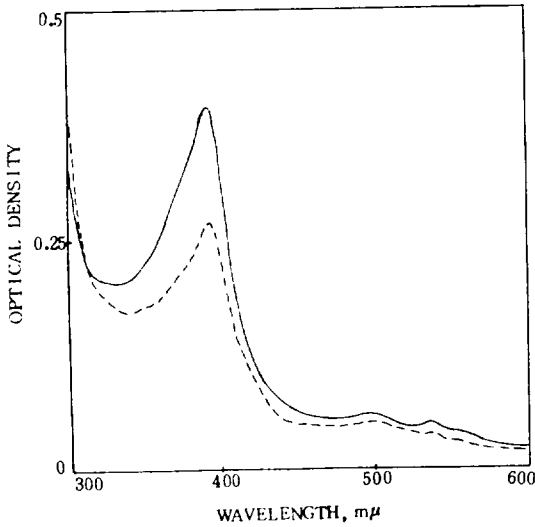


Fig. 3. Absorption Spectra of the Supernatant medium, from 10 days old Cultures. 20 min. after Centrifuge.

— Ortho P medium
 - - - Pyro P medium

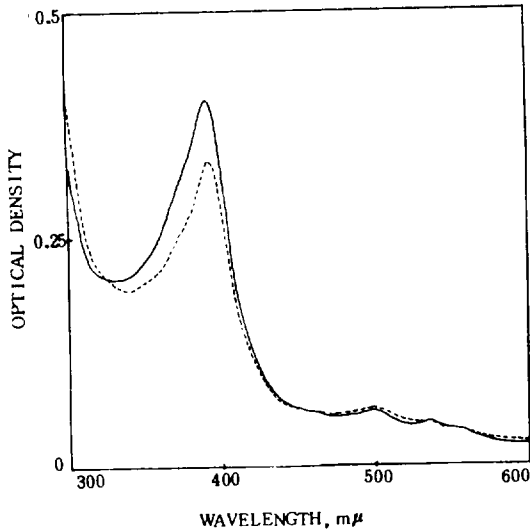


Fig. 4. Same as Fig.3 but 110 min. after Centrifuge.

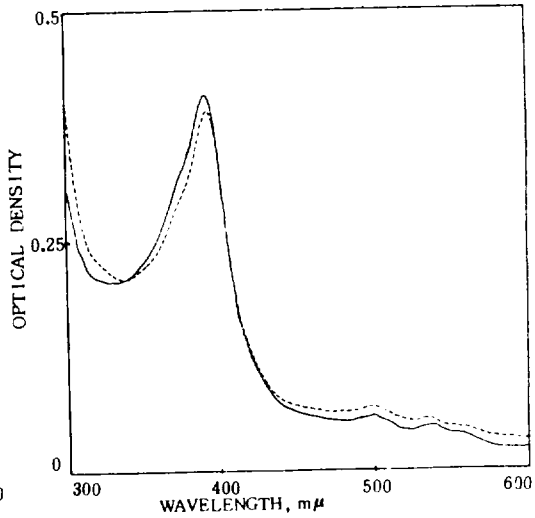


Fig. 5. Same as Fig.3 but 230 min. after Centrifuge.

경우 活潑히 增殖하는 細胞는 分비하지 않고, 더구나 *R. rubrum*의 경우 어떤 경우에도 水溶性 色素를 分비하지 않는다는 Cohen-Bazire *et al* (1957)의 報告와는 완전히 다르지만 Siström *et al* (1956 a, b)의 보고와 같이 *R. sphaeroides* 突然變異株에서는, 활발히 增殖하는 對數期에서도 色素를 分비한다는 것과는 어느정도 일치한다.

또한 肉眼으로 觀察된 上澄液의 색깔은 서로 다르지만 Soret peak가 395 mμ으로 비슷하고, 500 mμ의 peak는 완전히 一致하고 있다. 7日 배양 上澄液의 吸收스펙트럼은 그림 2와 같은데 3日의 것과 비교해서 월등히 많은 量이 分비되었음을 알 수 있고, P₂원에 따른 量的, 質的인 差異는 거의 없다. 또 3日 배양에서는 보이지 않았던 535 mμ에서의 peak가 새로 나타났으며 370 mμ에서 약하게 어깨 (Shoulder)가 나타났는데, 535 mμ은 van Niel (1944)의 野生型 *R. sphaeroides*에서도 보고되었다.

그림 3-5는 10日 배양으로서 늦은 靜止期에 該當되는데 7日 배양에서는 잘 보이지 않던 555 mμ에서의 어깨 ปรากฏ이 새로이 나타났다. 그림 3은 원심분리후 20분 에 測定한 것이며 그림 4는 暗處, 室溫에서 1시간 50

분 후에 또 그림 5는 同一條件으로 3시간 50분 후에 測定한 결과이다. 그림 3에서 보면 靜止期의 末期에는 定量的으로 Orthophosphate배지에서 색소분비가 pyrophosphate배지에서 보다 상당히 많음을 알 수 있고 그림 4, 5와 서로 비교하면 經時的인 吸光變化가 아주 크며 또한 Pyrophosphate배지의 것이 Orthophosphate배지의 것보다 훨씬 빨리 變化함을 알 수 있는데 이의 理由는 아직 不明이다.

經時的 吸光度의 증가는 野生型 *R.sphaeroides*의 경우 (Cohen-Bazire *et al.* 1957)와 완전히 一致하며 또한 모든 배양의 상징액은 短波長의 紫外線下에서 Pinkish-orange색의 형광을 발하는 것도 一致하였다. 10일까지의 모든 배양의 상징액에서 *R.rubrum*은 550 m μ 이상의 長波長에서 吸光 Peak를 나타내지 않았는데 이는 *R.sphaeroides*의 경우 610, 635, 636, 680, 780 m μ 등에서 Peak를 形成하는 것과는 아주 다른 특징이라 하겠다. (van Niel, 1944; Pradel, J and Cimet, 1975; Siström *et al.* 1956 a, b)

그러나 Soret Peak가 400 m μ 부근에 있다는 것은 대체적으로 *R.rubrum*에 의해서 形成된 水溶性 色素가 Porphyrin化合物이라는 것을 나타내는 것으로 보인다. (Siström *et al.* 1956)

吸光曲線이 比較的 單純한 것으로 미루어 많은 種類의 色素가 混合된 것으로 생각되지 않으나 배양액 그대로의 上澄液에서는 Peak가 나타나지 않는 波長에서 2. 分劃過程을 거쳐 어느정도 精製된 色素들은 吸光 Peak를 나타내는 경우가 있기 때문에 上澄液 그대로의 吸光스펙트럼만으로 몇가지의 色素가 包含되어 있는지를 推定한다는 것은 어려운 點이 있다. (Siström *et al.* 1956 a, b)

배지에 包含된 鐵鹽의 濃度라든가, glycine, succinate, ALA의 유무에 따라 Porphyrin化合物의 生産의 增減이 나타나고 (Lascelles, 1956) 어떤 Porphyrin化合物의 生成이 左右된다는 (Lascelles, 1966) 보고가 있으나 Orthophosphate나 Pyrophosphate로서 P_i源을 달리하는 데는 水溶性 色素形成에는 큰 差異가 없는 것 같다.

以上的 內容을 綜合해 볼 때 本實驗에서 使用된 野生型 *R.rubrum*이 培地中으로 분비하는 水溶性 色素는 吸光 Peak나 螢光性, 吸光度의 經時變化 등으로 미루어 볼 때 Porphyrin化合物로 推定되며, 分劃등의 過程을 거쳐 色素의 種類나 性質이 밝혀지면 *R.rubrum*의 Bacteriochlorophyll 및 Porphyrin化合物 등의 生成 經路를 밝히는데 큰 도움을 줄 것으로 생각된다.

摘 要

1. 韓國産 野生型 *R.rubrum*은 光下 嫌氣狀態에서 배양할 때 水溶性 色素를 培地 속으로 分泌한다.
2. 培地 上澄液의 吸光 스펙트럼은 392.5 m μ 에서 主 Peak를 나타내며, 500, 535 m μ 에서 작은 Peak를 또 370, 555 m μ 에서 어깨 (shoulder)를 나타낸다.
3. 水溶性 色素는 紫外線 아래서 pinkish-orange 색의 螢光을 낸다.
4. 培地 上澄液의 吸光度는 暗處 室溫에서 空氣와 接觸했을 때 經時的으로 빨리 增加한다.
5. 無機磷酸源으로서 Orthophosphate나 Pyrophosphate를 使用할 때 水溶性 色素 形成에는 別 差異가 없다.
6. *R.rubrum*이 分泌한 水溶性 色素는 몇가지 Porphyrin化合物로 推定된다.

参 考 文 献

- Cohen-Bazire, Germaine., W. R. Sistrom and R. Y. Stanier., 1957, Kinetic Studies of pigment synthesis by non-sulfur purple bacteria. *J. Cell. Comp. physiol.*, 49:25.
- Cooper, R., 1963, Biosynthesis of coproporphyrinogen, magnesium protoporphyrin monomethyl ester and bacterio-chlorophyll by *Rhodospseudomonas capsulata*. *Biochem. J.*, 89:100.
- Drews, G., Leutiger, I., and Ladwig, R., 1971, Production of protochlorophyll, protophaeophytin and bacteriochlorophyll by the mutant A 1 of *Rhodospseudomonas capsulata*. *Arch. Microbiol.*, 76:349.
- Jones, O. T. G., 1963, The production of magnesium protoporphyrin monomethyl ester by *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *Biochem. J.*, 86:429.
- _____, 1964, Studies on the structure of a pigment related to chlorophyll a by *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *ibid.* 91:572.
- _____, 1978, Biosynthesis of porphyrins, hemes, and chlorophylls. P.751. in *The photosynthetic bacteria* (R. K. Clayton and W.R. Sistrom Ed.) Plenum press. New York.
- Lascelles, J., 1956, The synthesis of Porphyrins and Bacterio-Chlorophyll by cell suspensions of *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *Biochem. J.*, 62:78.
- _____, 1962, Tetrapyrrole synthesis in microorganisms. P. 335 in *The Bacteria* (I. C. Gunsalus and R. Y. Stanier, ed.) Vol. 3. Academic Press Inc., New York.
- _____, 1966, The regulation of synthesis of iron and magnesium tetrapyrroles. Observations with mutant strains of *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *Biochem. J.*, 100:184.
- Lee, H. S. and Lee, K.M., 1982, Isolation and Identification of *Rhodospirillum rubrum* in Korea. *J. of Sung Kyun Kwan Univ.*, 32:57.
- Oh, D. C. and H. S. Lee, 1983, Studies on the Photosynthetic bacteria. I. The differences on Polyphosphate Biosynthesis by the phosphate Source in *Rhodospirillum rubrum*. *Cheju Univ. J.*, 16:247.
- Pradel, J., and Clement-Metral, J. D., 1975, A4-vinylproto-chlorophyllide complex as a model of the spectral forms of protochlorophyllide *in vivo*, abstr. 10th FEBS Meeting, Paris, P.1210
- Pudek, M. R., and Richards. W. R., 1975, A Possible alternate Pathway of bacteriochlorophyll biosynthesis in a mutant of *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *Biochemistry.* 14:3132.
- Richards, W. R., and Lascelles, J., 1969, The biosynthesis of bacteriochlorophyll. The Characterisation of the latter stage intermediates from mutants of *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *ibid.* 8:3473.
- Sistrom, W. R., Mary Griffiths and R. Y. Stanier, 1956 (a), A note on the Porphyrins excreted by the blue-green mutant of *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 48:459
- _____, _____ and _____. 1956 (b), The biology of a photosynthetic bacterium which lacks colored carotenoids. *ibid.* 48:473.