

광합성세균 *Rhodospirillum rubrum*의 생장과 Bacteriochlorophyll 및 Carotenoids 의 형성에 대한 탄소원의 영향

송승희 · 이수오¹⁾ · 오덕철*

제주대학교 생물학과
¹⁾ 창원대학교 미생물학과

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

Song, Seung-Heui, Soo-O Lee¹⁾ and Duck-Chul Oh*

¹⁾ Dept. of Biology, Cheju Nat'l Univ., Cheju, Cheju-do 690-756, Korea
* Dept. of Microbiology, Changwon Nat'l. Univ., Changwon, Kyongsangnam-do 641-773, Korea

ABSTRACT : The influences of organic compounds such as acetate, alanine, glutamate and malate, on the growth and formation of photosynthetic pigments as a sole or mixed carbon sources were tested in a photosynthetic bacterium, *Rhodospirillum rubrum*. Cells grew most rapidly in culture on glutamate-malate mixtures and showed slowest growth in glutamate among all cultures. Cells cultured on acetate-glutamate mixtures showed much rapid growth than those on single carbon source separately. Cells cultured on mixed carbon sources generally grew more rapidly than those on each single carbon source, so it seems that mixtures of carbon sources exhibit synergistic effect on cell growth.

The formation of bacteriochlorophyll and carotenoids was initiated simultaneously regardless of the kind of carbon source. The synergistic effect of mixed carbon sources on the formation of photosynthetic pigments of *R. rubrum* was not shown distinctly. The influence 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.

Key words : Photosynthetic bacterium, *Rhodospirillum rubrum*, Carbon source, Growth, Synergistic effect, Bacteriochlorophyll, Carotenoids.

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

*R. rubrum*의 성장과 탄소원 이용에 대한 연구도 이루어져 왔는데 *R. rubrum*은 탄소원으로써 상당히 다양한 유기물을 이용할 수 있는 것으로 밝혀져 있으며 (Elsden and Ormerod 1956; Knight 1962; Olsen and Merrick 1968), 배양조건을 달리 했을때의 탄소원의 이용과 성장에 대한 효과 (Coleman 1959; Uffen and Wolfe 1970; Uffen 1973a, b)나 탄소원을 혼합했을 때의 성장에 미치는 효과 (Gest et al. 1962; Solaiman and Uffen 1982) 등이 보고되어 있다. 다른 광합성 세균인 *Rhodobacter capsulatus*에서는 L-형과 D-형 malate에 대한 성장과 포도당을 첨가했을 때의 성장율의 변화 (Stahl and Sojka 1973)가, *Chlorobium thiosulfatophilum*으로는 여러가지 유기물의 첨가에 의한 성장과 대사에 대한 영향이 보고되었다 (Kelley 1974).

최근에는 *Leuconostoc oenos* (Salou et al. 1991; Loubière et al. 1992b; Sallou et al. 1994), *Eubacterium limosum* (Loubière and Lindley, 1991; Loubière et al. 1992a), 또는 *Veillonella parvula* (Janssen 1992) 등으로 기질에 대한 성장 실험을 한 바 대개 단독 기질보다 혼합기질에서 성장이 촉진되었고 최종 생체량도 증가되는 결과를 얻었으며 어떤 경우는 단독으로는

이용되지 않으나 혼합 했을때는 이용되는 기질이 있음도 밝혀지므로써 중요한 대사과정이 알려지고 있다. 그러나 근년의 문헌에서 광합성세균 특히 *R. rubrum*의 성장에 대한 기질의 영향 실험은 발견되고 있지 않다.

한편 *R. rubrum*의 bacteriochlorophyll (Bchl)이나 carotenoid 등 광합성 색소에 관련된 연구로는 광이나 산소에 의한 색소 형성 조절 (Cohen-Bazire and Kunisawa 1960; Oelze and Pahlke 1976; Arnheim and Oelze 1983), 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 세균인 *Rhodobacter capsulatus*로는 暗所배양시의 광합성 색소 형성 (Madigan et al. 1982)에 대하여, 탄소원과 색소 형성 (Grether-Beck and Oelze 1987) 등이 있고 *Rhodobacter sphaeroides*로는 광에 의한 Bchl 형성 조절 (Oelze 1988)에 대한 보고등이 있으며, Iba and Takamiya (1989), Takamiya (1992) 등은 특이한 호기성 광합성 세균인 *Roseobacter denitrificans*는 청색광에 의해서 Bchl과 carotenoid의 축적이 저해된다는 보고를 한 바 있으며 최근에는 주로 광합성 색소에 대한 연구를 유전자 수준에서 접근하고 있다 (Wellington et al. 1992; Young et al. 1992; Klug 1993; Lang et al. 1994).

그러나 이러한 다양한 연구에도 불구하고 탄소원을 달리 했을때의 *R. rubrum*의 성장과 색소 형성과의 상관성에 관한 연구는 Solaiman and Uffen (1982)의 극히 제한적인 연구 외에는 거의 보이지 않고 있다.

본 연구는 이러한 점에 착안하여 *R. rubrum*을 몇가지의 단독 혹은 혼합 탄소원으로 배양할때 생

장과 색소 형성이 어떻게 나타나는지와 또 성장과 색소 형성은 어떠한 상관성을 가지고 있는 지를 알아보려고 실시되었다.

재료 및 방법

균주 및 배양

공시 균주는 *Rhodospirillum rubrum* S1 (ATCC 11170) 이었고, 배지는 Bose et al. (1962) 의 배지에서 탄소원을 제외한 것을 무기배지로 하여 여기에 탄소원을 첨가하고 1N NaOH로써 pH 7로 조절한 후(Oelze and Pahlke 1976) 사용하였다. 사용한 탄소원은 acetate (sodium salt anhydrous), L-glutamic acid, DL-malate (sodium salt), L-alanine의 4가지였고, 탄소원을 단독으로 사용할때는 0.3% (w/v) 씩, 두가지를 혼합하여 사용할 때는 각각 0.15% (w/v) 씩 첨가하였다.

암배양은, 본 실험에서 사용할 광합성색소가 완전히 소실된 세포를 얻기 위하여, 300mL 삼각 플라스크에 탄소원별(단독 또는 혼합)로, 30mL의 배지를 넣어 멸균한 후 사전에 Bose et al. (1962) 의 배지로 명배양한 대수기의 *R. rubrum* 배양액 3mL씩을 접종하고 솜마개 부분을 제외하고는 완전히 알루미늄 foil로 싸서(Horio and Kamen 1962; Uffen and Wolfe 1970) 120rpm, 30°C의 shaking incubator에서 2일 동안 행하였으며, 1차 암배양된 세포는 광합성색소가 거의 소실된 상태였으며 이 세포를 동일한 방법으로 각 탄소원별 배양액을 3mL씩 접종하여 계대배양하므로써 광합성색소가 완전히 결여된 세포를 얻었다.

명배양은 배지를 가득 채운 60mL 삼각 플라스크에 암배양으로 계대배양시켜 광합성색소가 결여된 세포 배양액을 탄소원별로 세포량이 일치하도록 조정하여($A_{680} = 0.017$) 접종하고 고무마개를 막아

암소에 몇시간 방치하여 용존산소를 소모시켜 혐기적으로 만든 후, 백열 전구로써 2000 lux로 광을 조절하고 30°C에서 배양하였다.

세포 수확 및 생세포의 흡광도 측정

일정한 배양 시간별로 일정량의 명배양액을 원심 분리(Sorval RC-5C Refrigerated Centrifuge, SS-34 rotor, 5000rpm, 6°C, 20분)하여 얻어진 세포에 인산완충액을 가하여 혼합한 후 재차 원심 분리하여 세척된 세포를 수확하였으며, 이 세포에 원심분리한 배양액과 동일한 양이 되게 60% 설탕 용액을 더하여 vortex mixer로 균질화 될 때까지 섞어 680nm에서의 흡광도(Perkin-Elmer Lambda 5 UV/VIS spectrophotometer)로서 성장량을 측정하였다(Cohen-Bazire and Kunisawa 1960 ; Solaiman and Uffen 1982).

아울러 명배양 동안에 무색소 세포의 Bchl과 carotenoid의 경시적 형성 정도를 추적하기 위하여 350nm-900nm까지의 생세포 흡광도를 측정, 비교하였다.

색소의 추출 및 비함량 계산

생세포의 흡광도와 비교하고 색소 형성시기를 명확하게 알아내기 위하여 생세포로부터 광합성색소를 추출하였다. 색소는 세포 수확과 동일한 방법으로 20mL의 명배양액으로부터 세포를 수확한 후 acetone-methanol (7 : 2, v/v) 혼합용매(Grether-Beck and Oelze 1987; Schwerzmann and Bachofen 1989) 10mL을 넣고 vortex mixer로 균질화하여 20분 정도 방치한 후 원심분리하여 추출하였으며(Cohen-Bazire and Kunisawa 1960; Uffen 1985) 같은 과정을 2회 반복하므로써 형성된 색소를 모두 추출할 수 있었고, 추출 과정에서는 가능한 한 흡광도의 변화를 방지하기 위해서 광을 차단하였다. 추출한 색소용액은 분광광도계로

350nm-900nm범위에서 흡광도를 측정하여 각 탄소원별로 색소 형성정도를 비교하였다(Schultz and Weaver 1982).

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

전조중량은 배양액의 흡광도가 $A_{680}^{1\text{cm}} = 0.1$ 일 때 배양액 1mL당 0.087mg으로 계산하였다(Holt and Marr 1965). Bchl의 비함량은 mg전조세포를 기준 하여 $A_{772} \cdot A_{680}^{-1} \cdot 0.87 \cdot 65.3$ 로 계산하였고, carotenoid의 비함량은 $A_{495} \cdot A_{680}^{-1} \cdot 0.87 \cdot 149$ 로 계산하였다.

결과 및 고찰

탄소원에 따른 세포 성장

Fig. 1은 단일 탄소원으로 배양했을 때의 성장곡선을 나타낸 것이고, Fig. 2는 두 가지씩 혼합한 탄소원으로 배양했을 때의 성장곡선을 나타낸 것이다.

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 나타났는데 (Fig. 1), 이는 malate가 주로 광합성 세균이 잘 이용하는 탄소원으로 높은 성장을 나타낸다는 Grether-Beck and Oelze (1987)의 보고와 일치하고 있다.

Acetate, glutamate, alanine배지에서는 느린

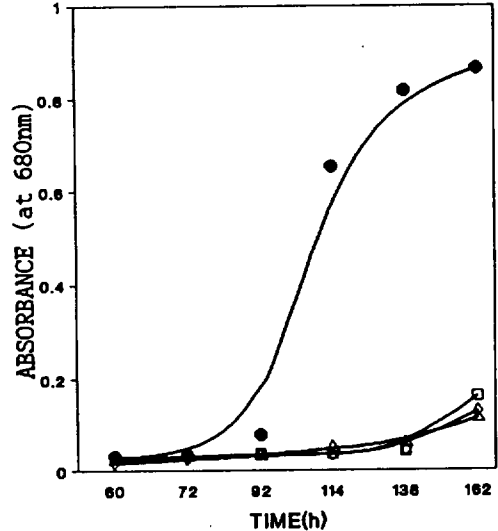


Fig.1. Growth of *Rhodospirillum rubrum* on single carbon sources.

□ ACETATE ▲ GLUTAMATE
● MALATE ◆ ALANINE

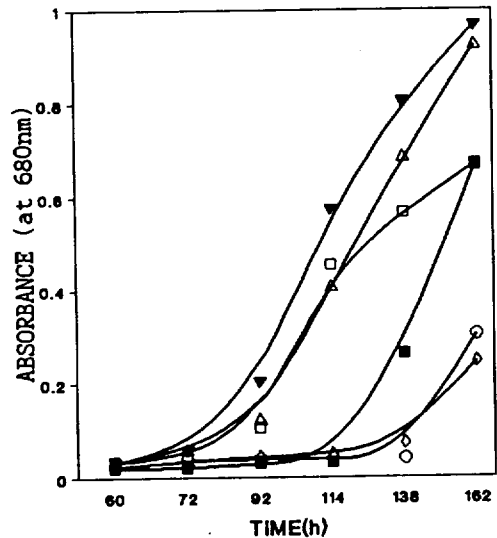


Fig.2. Growth of *Rhodospirillum rubrum* on mixed carbon sources.

□ ACETATE-GLUTAMATE ▲ ACETATE-MALATE
● ACETATE-ALANINE ◆ GLUTAMATE-MALATE
▲ GLUTAMATE-ALANINE ◆ MALATE-ALANINE

생장을 나타내고 있으나, 138시간 이후 조금씩 증가하여 glutamate와 alanine에서는 282시간, acetate배지에서는 306시간 배양에 이르러서 A_{680} 가 각각 0.47, 0.42와 0.34로서 다소 생장이 증가되었다(자료 미제시). 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 다소 높아지기 때문이 아닌가 생각된다.

탄소원을 혼합하였을 때의 생장은 glutamate-malate 혼합배지에서 가장 빨랐고, glutamate-alanine 혼합배지에서 가장 느리게 나타났으며, 배양구별로 비교하면 초기에는 비슷한 생장을 나타내고 있으나 acetate-glutamate, acetate-malate 그리고 glutamate-malate배지는 92시간, malate-alanine 배지는 114시간, acetate-alanine, glutamate-alanine배지는 138시간 이후 대부분 생장이 급격히 증가하였다. 특히 acetate와 glutamate혼합배지에서는 162시간 배양했을 때의 acetate단독배지에서 보다 4배, glutamate단독배지에서 보다는 6배의 생장 증가 현상을 나타내었다(Fig. 2).

Fig. 1과 2를 종합하여 볼 때 세포 생장은 malate 단독배지보다 오히려 느린 malate-alanine혼합배지의 경우를 제외하고 대부분의 경우 탄소원을 단독으로 사용했을 때보다 두 종류를 혼합했을 때가 빠르게 나타나고 있는데 이는 pyruvate와 malate를 혼합 사용한 Solaiman and Uffen(1982)의 결과와 일치하였고, acetate는 단독으로 사용했을 때보다 각각 succinate, fumarate, malate와 혼합해 배양했을 때의 생장이 크게 상승된다는 Elsdon and Ormerod(1956)의 결과와도 상통하였다. 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; Salou et al. 1994) 등에서도 보고되고 있어 많은 경우에 탄소원을 혼합하면 생장에 대하여 상승효과를 나타내는 것으로 보인다. 그러나 생장에 대한 혼합탄소원의 효과는 *Veillonella parvula*나 *Clostridium acetobutylicum*에서 세포내의 NADH나 ATP의 수준이 증가한다는 보고(Janssen 1992; Vasconcelos et al. 1994)나 *Eubacterium limosum*에서 탄소원과 에너지원으로서 이용도가 높아지는 것에 기인한다는 추정(Loubière et al. 1992a) 정도의 보고만 있을뿐 그 구체적인 기전은 아직 불분명한 상태로 남아있으며 *R. rubrum*의 경우도 마찬가지로 규명해야 할 과제로 남아있다.

생세포의 흡광도

Fig. 3과 4는 각각 단독 탄소원중 가장 느린 생장을 보인 glutamate 배지와 혼합 탄소원중 생장에 대한 상승효과를 가장 높게 나타낸 acetate-glutamate 혼합배지에서 생세포의 경시적 흡광도 변화를 나타낸 것이다.

glutamate 단독배지에서는 138시간이 되어서야 파장 883nm에서 Bchl의 peak가 나타나기 시작하였고 500nm부근의 carotenoid의 peak는 162시간이 되어서야 조금씩 나타남으로써 생세포의 흡광도로는 배양후 시간이 상당히 지난 후에야 색소 형성을 알 수 있었다.

acetate와 glutamate를 혼합한 경우에는 72시간배양에서 Bchl의 peak가 극히 조금 나타나기 시작하여 92시간 배양에서는 뚜렷한 peak를 볼 수 있었으며, carotenoid의 peak는 이때 회미하게 나타나기 시작하여 114시간 이후 그 peak가 더욱 뚜렷해졌다. 그 이외에 생장이 비교적 빠른

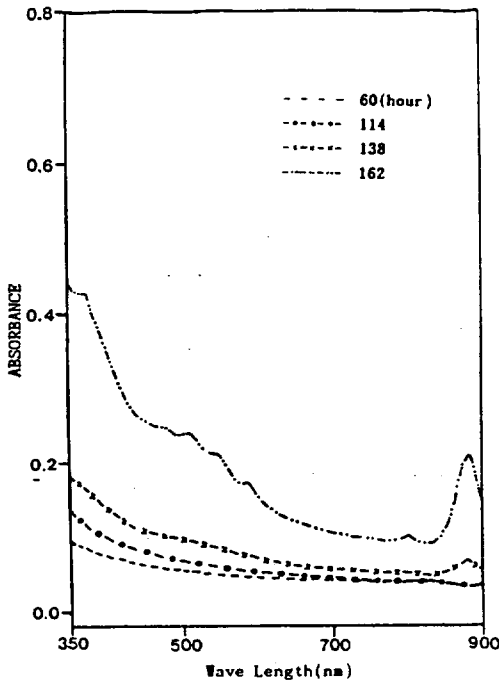


Fig.3. Absorption spectra of intact cells of *Rhodospirillum rubrum* cultured on glutamate.

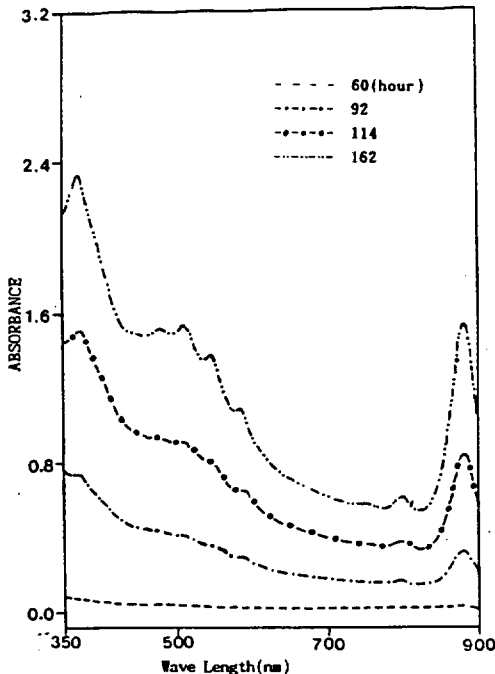


Fig.4. Absorption spectra of intact cells of *Rhodospirillum rubrum* cultured on acetate-glutamate mixture.

혼합배지와 malate 단독배지에서는 Fig.4와 비슷한 유형을 나타내었고, 생장이 저조한 단독 탄소원 배지와 acetate-alanine과 glutamate-alanine 배지에서는 Fig.3과 비슷한 유형을 나타내었다(자료 미제시). 또한 탄소원에 관계없이 Bchl의 peak는 carotenoid의 peak보다 항상 먼저 나타나는 것을 볼 수 있었지만 초기배양시 생세포의 흡광도로는 carotenoid가 전혀 합성되지 않아서 peak가 나타나지 않는 것인지, peak가 나타나지 않을 정도로 소량 형성되어서인지 확실히 알 수 없었고, 따라서 Bchl과 carotenoid중에서 어느 것이 먼저 형성되는지 혹은 동시에 형성되는지는 명확히 판별하기가 어려웠다.

추출 색소의 배양 시간별 흡광도 변화

Fig.5와 6은 각각 glutamate와 acetate-glutamate 배지에서 배양한 세포에서 추출한 색소의 흡광도를 배양 시간별로 나타낸 것이다. acetate와 alanine배지에서는 Fig.5와 비슷한 양상을 나타내었고, malate배지와 혼합 탄소원배지에서는 Fig.6과 비슷한 변화를 보였으나 탄소원에 따라 각 파장에서의 흡광 정도나 색소 형성 시간은 다소 차이가 있었다(자료 미제시).

모든 배양에서 색소를 추출했을 때는 생세포에서와는 달리 동일 배양에서는 Bchl과 carotenoid의 peak가 동시에 나타났으며 색소 형성 역시 탄소원을 혼합했을 때가 단독으로 사용했을 때보다 더욱 많이 이루어지고 있어 성장과 색소형성 증가(색소의 비함량 증가가 아님)는 비례적이라는 Cohen-Bazire and Kunisawa (1960)의 보고와 일치하고 있다.

glutamate 배지에서는 138시간배양에서 Bchl과 carotenoid의 흡광파장에 약간의 peak가 인지되었으며 162시간배양에서는 772nm의 Bchl과 495nm의 carotenoid peak가 뚜렷하게 나타났으

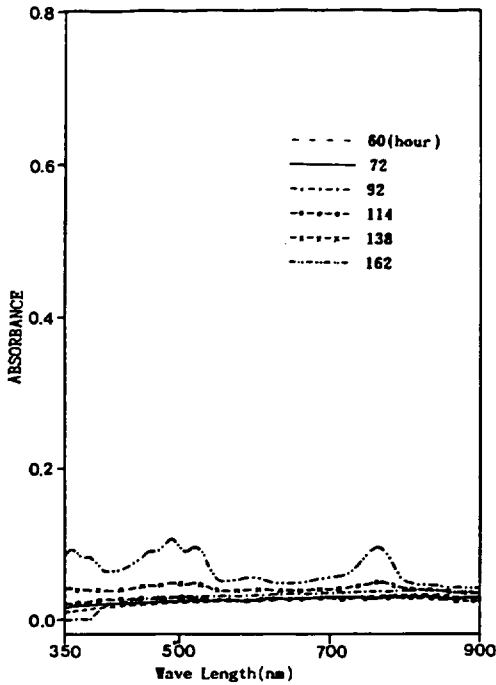


Fig. 5. Absorption spectra of photosynthetic pigments from *Rhodospirillum rubrum* cultured on glutamate. (Solvent : acetone : methanol = 7:2, v/v)

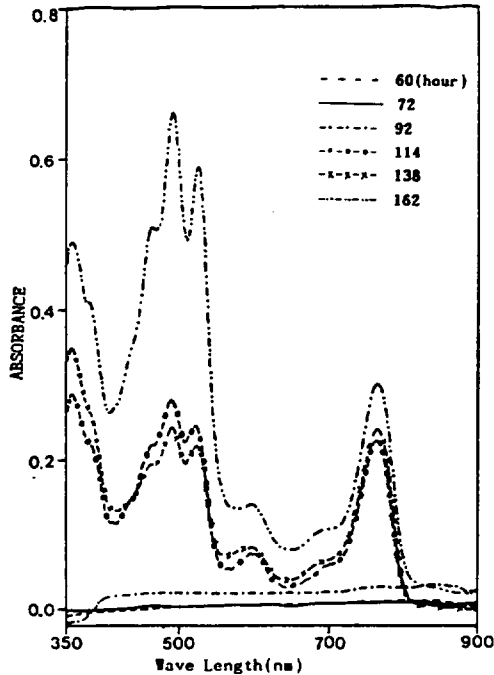


Fig. 6. Absorption spectra of photosynthetic pigments from *Rhodospirillum rubrum* cultured on acetate-glutamate mixture. (Solvent : acetone : methanol = 7:2, v/v)

며 carotenoid의 peak가 Bchl의 peak보다 약간 높게 나타나고 있었다(Fig. 5).

acetate-glutamate 혼합배지에서는 92시간과 114시간 사이에서 색소 형성이 많이 이루어졌으며, 비교적 초기에는 772, 600, 450-550nm에서 각각 Bchl, bacteriopheophytin, spirilloxantin에 의한 peak (van der Rest and Gingras 1974) 들이 나타났으나 시간이 경과될수록 450-550nm에서의 carotenoid peak가, 772nm의 Bchl peak보다 상대적으로 높게 나타나고 있어 Cohen-Bazire et al. (1957)의 결과와 일치하고 있다(Fig. 6).

본 실험에서 추출 색소중의 Bchl과 carotenoid의 최대 peak는 각각 772nm와 495nm에서 나타났는데 이는 carotenoid의 최대 peak가 474nm에서 나타난다는 보고(Uffen 1985; Schwerzmann and Bachofen 1989)와는 다소 차이가 있으나 Vernone and Garcia(1967)의 결과와는 유사한 것이다.

光合成色素의 比含量

배양구별 *R. rubrum*의 1mg 건조중량당 nmol로 나타낸 광합성 색소의 비함량은 Fig. 7-10과 같다.

Fig. 7과 8은 *R. rubrum*의 탄소원별 Bchl 비함량을 나타낸 것이다. 단독 탄소원 배양에서의 Bchl 비함량은 60시간 배양의 경우 탄소원에 따라 거의 2배까지의 차이가 났지만 배양 시간이 길어짐에 따라 그 차이는 줄어드는 경향이 있었다. 같은 탄소원 배양에서는 배양 시간이 길어짐에 따라 비함량이 두배정도 증가 하는 경향을 나타 내었으며 생장이 가장 좋았던 malate배지에서 가장 낮은 수치를 나타낸 반면 성장에는 비교적 덜 효율적인 alanine배지에서 높은 수치를 보이는 것이 특이하였다(Fig. 7).

혼합 탄소원 배양에서의 Bchl 비함량은 단독탄

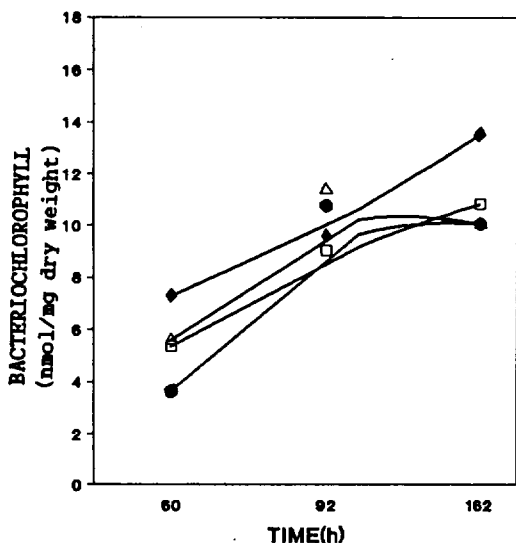


Fig.7. Specific bacteriochlorophyll content of *Rhodospirillum rubrum* cultured on a single carbon sources.

□ ACETATE ▲ GLUTAMATE
● MALATE ◆ ALANINE

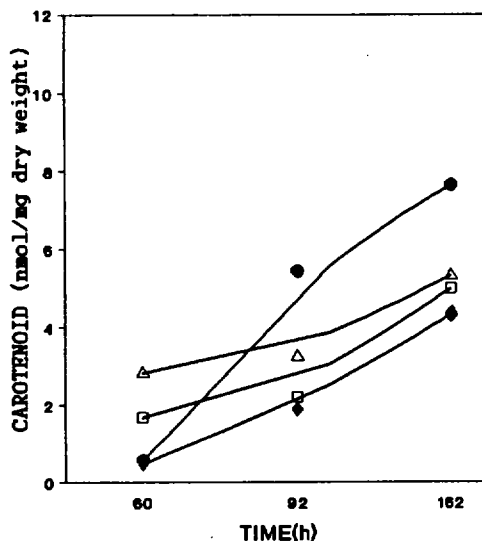


Fig.9. Specific carotenoid content of *Rhodospirillum rubrum* cultured on single carbon sources.

□ ACETATE ▲ GLUTAMATE
● MALATE ◆ ALANINE

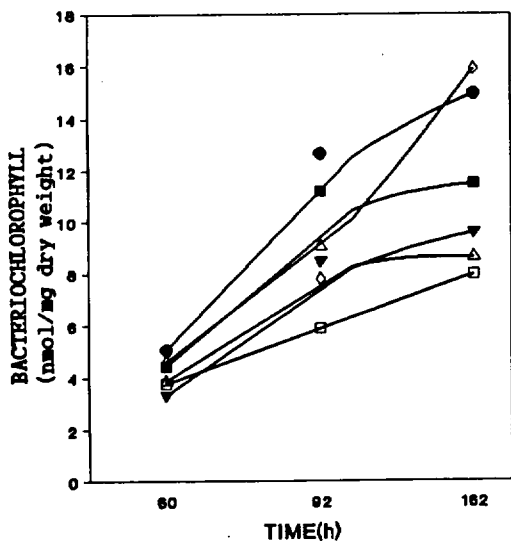


Fig.8. Specific bacteriochlorophyll content of *Rhodospirillum rubrum* cultured on mixed carbon sources.

□ ACETATE-GLUTAMATE ▲ ACETATE-MALATE
● ACETATE-ALANINE ◆ GLUTAMATE-MALATE
◆ GLUTAMATE-ALANINE ■ MALATE-ALANINE

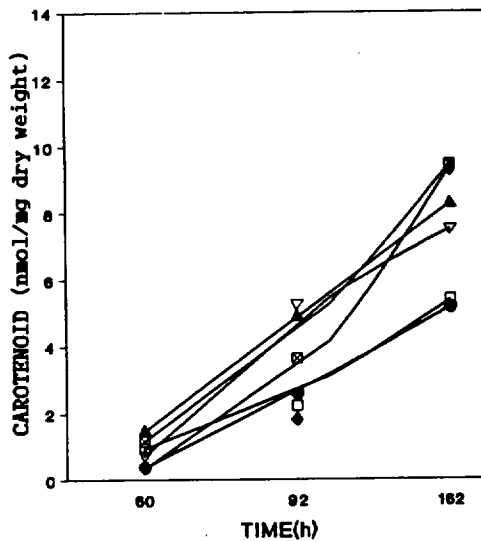


Fig.10. Specific carotenoid content of *Rhodospirillum rubrum* cultured on mixed carbon sources.

□ ACETATE-GLUTAMATE ▲ ACETATE-MALATE
● ACETATE-ALANINE ◆ GLUTAMATE-MALATE
◆ GLUTAMATE-ALANINE ■ MALATE-ALANINE

소원 배양때와 다르게 배양시간이 길어짐에 따라 배양구별 비합량차이는 심하였고, 같은 배양구에서도 시간이 길어질수록 합량이 4배까지 증가하였다. 그러나 162시간 배양에서의 비합량은 단독탄소원이나 혼합 탄소원 배지에서 심한 차이는 보이지 않았다. 혼합 탄소원 배지에서의 성장과 비교했을 때 비교적 낮은 성장을 보였던 glutamate-alanine, acetate-alanine, malate-alanine 혼합배지에서의 Bchl 비합량이 높게 나타났고, 단독일 때보다 혼합했을 때 생장이 상당히 증가했던 acetate-glutamate 혼합배지에서 Bchl 비합량이 가장 낮았다(Fig. 8).

이상의 결과를 종합하면 alanine이 들어갔을 때는 단독 또는 혼합 탄소원 모두에서 Bchl 비합량이 높게 나타나는 경향을 볼 수 있었고, 탄소원을 단독으로 사용한 경우에 비해 혼합했을 때 뚜렷한 성장의 상승효과를 보인 것과는 달리 Bchl 비합량은 혼합했을 때에 뚜렷한 상승효과를 보이고 있지 않아 세포 성장량과 색소 함량이 꼭 일치하지는 않는 것으로 보인다. 이는 세포 성장량과 색소 함량이 일치하지는 않는다는 Solaiman and Uffen(1982)의 결과와 일치되며, 세포의 Bchl 비합량은 일정한 Bchl을 함유하는 세포 내막의 많고 적음에 의존 한다는 보고(Holt and Marr 1965)에 비추어 볼 때 alanine에서 자란 세포에는 Bchl을 함유하는 세포 내막이 malate에서 자란 세포에서 보다 더 많아진 것이 아닌가 생각된다.

배양구별 carotenoid의 비합량은 Fig. 9와 10과 같았다. 단독 탄소원에서의 carotenoid 비합량은 162시간 배양을 기준으로 할 때 malate배지에서 가장 높고 alanine배지에서 가장 낮게 나타나고 있어 Bchl 비합량과는 다소 다른 양상을 보이고 있었으며, 배양 초기에는 비교적 낮은 비합량을 보이다가 시간이 경과할수록 많은 증가를 보이고 있었는데 성장률이 높은 malate배지에서는

carotenoid 비합량도 높게 나타나고 있어서 Bchl 비합량에서의 결과와는 차이를 나타내고 있었다(Fig. 9). 혼합 탄소원 배지에서의 carotenoid 비합량은 malate-alanine, glutamate-alanine 배지에서 높고 acetate-glutamate, acetate-alanine 배지에서 낮게 나타나고 있어 Bchl 비합량과는 다소 유사하긴 하나 다른 양상을 보이고 있으며, acetate-glutamate, acetate-alanine 배지에서만 단독으로 사용했을 때의 malate배지의 값보다 낮게 나타났을 뿐 나머지 혼합배지에서는 모두 단독 탄소원 배지에 비해 상승효과가 있었다(Fig. 10). 혼합 탄소원에서의 성장과 비교해 봤을 때 carotenoid 비합량은 탄소원에 따른 성장과도 다소 다른 양상을 보이고 있으나 탄소원을 혼합했을 때 상승효과를 나타내었다는 점에서는 유사하였다.

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 성장시간과 탄소원에 따라 다르며 탄소원을 혼합했을 때 성장과 색소 형성에 미치는 효과는 다소 차이가 있고, 세포 성장과 색소의 비합량은 서로 일치하고 있지 않는 것으로 나타났다.

세포내 광합성색소의 함량비

Table 1은 탄소원별 Bchl에 대한 carotenoid의 함량비를 나타낸 것이다.

단독 탄소원으로 배양했을 때의 함량비는 초기에는 glutamate에서 가장 높고, alanine에서 가장 낮았으나 시간이 경과할수록 malate에서 가장 높고 alanine에서 가장 낮았으며, 혼합 탄소원으로 배양했을 때의 함량비는 acetate-malate 배지에서 가장 높고, acetate-alanine 배지에서 가장 낮았다.

Table 1. Ratios of specific contents of carotenoid to Bchl from *Rhodospirillum rubrum* cultured on a single or mixed carbon sources at different culture time

| Carbon source Culture Time (h) | Ratios (%) | | |
|-----------------------------------|------------|----|-----|
| | 60 | 92 | 162 |
| 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 |

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

전체적으로 볼때 초기에는 carotenoid의 비함량이 Bchl에 비해 50% 이하였으나 배양 시간이 경과함에 따라 대부분 carotenoid의 비율이 높아져서 92시간 배양의 경우 대개 20-62%정도 되었고, 162시간이 되면 낮게는 alanine배지에서의 32%로부터 높게는 acetate-malate배지에서와 같이 96%까지 되었다. 이런 비함량비의 변화는 Bchl에 대한 carotenoid의 비율은 모든 성장기간 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 Bchl에 대한 carotenoid의 함량비가 1:2라는 보고(Schwerzmann and Bachofen 1989; Picorel et al. 1983)와 어느 정도 일치한다고 생각된다.

적 요

광합성 세균인 *Rhodospirillum rubrum*으로 생장과 색소 형성에 대한 탄소원의 영향을 조사하였다. 탄소원은 acetate, alanine, glutamate 그리고 malate였으며 단독 또는 혼합하여 사용하였다. 세포 생장은 glutamate배지에서 가장 느렸으며 glutamate-malate 혼합 배지에서 가장 빨랐다. acetate와 glutamate를 혼합했을 때는 두가지를 단독으로 사용했을 때보다 월등히 빠른 생장을 나타내었다. 대부분의 경우 탄소원을 단독으로 사용했을 때보다 혼합하였을 때 빠른 생장을 보였으며 혼합 탄소원은 생장에 대하여 상승효과를 나타내는 것으로 보인다. 색소가 없는 *R. rubrum*은 혐기적으로 광을 조사하였을때 bacteriochlorophyll과 carotenoid를 탄소원의 종류에 관계없이 동시에 형성하였으며 bacteriochlorophyll 비함량은 alanine 배지와 glutamate-alanine 혼합배지에서 가장 높고, carotenoid 비함량은 malate배지와 malate-alanine 혼합배지에서 가장 높아서 두 색소의 비함량에 대한 탄소원의 영향은 다르게 나타났다. 탄소원에 따른 성장량과 색소 함량은 반드시 일치하지는 않았고 색소 형성이나 생장에 있어서의 효과는 탄소원의 종류에 따라 달랐다. 세포내 bacteriochlorophyll에 대한 carotenoid의 비함량비는 다소 변화가 있으나 대개 1:2 수준이었다.

참 고 문 헌

- Arnheim, K. and J. Oelze. 1983. Differences in the control of bacteriochlorophyll formation by light and oxygen. Arch. Microbiol. 135 : 299-304.

- Bose, S. K., Gest, H. and Ormerod, J. G. 1962. Light-activated hydrogenase activity in photosynthetic bacterium: A permeability phenomenon. *J. Biol. Chem.* 236(3) : 13-14.
- Cohen-Bazire, G. and R. Kunisawa. 1960. Some observations on the synthesis function of the photosynthetic apparatus in *Rhodospirillum rubrum*. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA.* 46 : 1543-1553.
- Cohen-Bazire, G., W. R. Sistrom and R. Y. Stanier. 1957. Kinetic studies of pigment synthesis by non-sulfur purple bacteria. *J. Cell. Comp. Physiol.* 49 : 25-68.
- Coleman, G. S. 1959. The effect of D, L-glutamic acid on the growth of *Rhodospirillum rubrum*. *Biochim. Biophys. Acta.* 31 : 55-65.
- Elsden, S. R. and J. G. Ormerod. 1956. The effect of monofluoroacetate on the metabolism of *Rhodospirillum rubrum*. *Biochemistry* 63 : 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.* 97 : 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.* 149 : 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.* 89(5) : 1421-1429.
- Horio, T. and Kamen, A. G. 1962. Observations on the respiratory system of *Rhodospirillum rubrum*. *Biochemistry* 1 (6) : 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.* 30(4) : 471-477.
- Janssen, P. H. 1992. Growth yield increase and ATP formation linked to succinate decarboxylation in *Veillonella parvula*. *Arch. Microbiol.* 157 : 442-445.
- Jensen, S. L. and A. Jensen. 1971. Quantitative determination of carotenoids in photosynthetic tissues. *Methods Enzymol.* 23 : 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 : 163-178.
- Klug, G. 1993. Regulation of expression of photosynthesis genes in anoxygenic photosynthetic bacteria. *Arch. Microbiol.* 159 : 397-404.
- Knight, M. 1962. The photometabolism of propionate by *Rhodospirillum rubrum*.

- Biochem. J. 84 : 170-185.
- Kohlmeier, E. F. Jr. and H. Gest. 1951. A comparative study of the light and dark fermentations of organic acids by *Rhodospirillum rubrum*. J. Bacteriol. 61 : 269-282.
- Lang, H. P., R. J. Cogdell, A. T. Gardiner and C. N. Hunter. 1994. Early steps in carotenoid biosynthesis : Sequences and transcriptional analysis of the *CrtI* and *CrtB* genes of *Rhodobacter sphaeroides* and overexpression and reactivation of *CrtI* in *Escherichia coli* and *Rhodobacter sphaeroides*. J. Bacteriol. 176 (13) : 3859-3869.
- 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. J. Gen. Microbiol. 138 : 979-985.
- Loubière, P. and N. D. Lindley. 1991. The use of acetate as an additional co-substrate improves methylo-trophic growth of the acetogenic anaerobe *Eubacterium limosum* when CO₂ fixation is rate-limiting. J. Gen. Microbiol. 137 : 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. 174 : 5302-5308.
- Madigan, M., J. C. Cox and H. Gest. 1982. Photopigments in *Rhodopseudomonas capsulata* cells grown anaerobically in darkness. J. Bacteriol. 150 : 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. 161 (1) : 13-17.
- Oelze, J. 1988. Regulation of tetrapyrrole synthesis by light in chemostat cultures of *Rhodobacter sphaeroides*. J. Bacteriol. 170 : 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. 95 (4) : 1774-1778.
- Oelze, J. and W. Pahlke. 1976. The early formation of the photosynthetic apparatus in *Rhodospirillum rubrum*. Arch. Microbiol. 108 : 281-285.
- Picorel, R., G. B. Langer and G. Gingras. 1983. Antenna holochrome E880 of *Rhodospirillum rubrum* S1. pigment, phospholipid, and polypeptide composition. Biochemistry. 22 : 2491-2497.
- Salou, P., M. J. Leroy, G. Goma and A. Pareilleux. 1991. Influence of pH and malate-glucose ratio on the growth kinetics of *Leuconostoc oenos*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36 : 87-91.
- Salou, P., P. Loubière, and A. Pareilleux. 1994. Growth and energetics of

- Leuconostoc oenos* during cometabolism of glucose with citrate or fructose. Appl. Environ. Microbiol. 60(5) : 1459-1466.
- 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. 162(3) : 1322-1324.
- Schultz, J. E. and P. F. Weaver. 1982. Fermentation and anaerobic respiration by *Rhodospirillum rubrum* and *Rhodopseudomonas capsulata*. J. Bacteriol. 149(1) : 181-191.
- Schwerzmann, R. U. and R. Bachofen. 1989. Carotenoid profiles in pigment-protein complexes of *Rhodospirillum rubrum*. Plant Cell Physiol. 30(4) : 497-504.
- Solaiman, D. and R. L. Uffen. 1982. Pyruvate-dependent diauxic growth of *Rhodospirillum rubrum* in light. J. Bacteriol. 152(3) : 1175-1187.
- Stahl, C. L. and G. A. Sojka. 1973. Growth of *Rhodopseudomonas capsulata* on L- and D-malic acid. Biochim. Biophys. Acta. 297 : 241-245.
- Takamiya, K., Y. Shioi, H. Shimada and H. Arata. 1992. Inhibition of accumulation of bacteriochlorophyll and carotenoids by blue light in an anaerobic photosynthetic bacterium, *Roseobacter denitrificans*, during anaerobic respiration. Plant Cell Physiol. 33(8) : 1171-1174.
- Thore, A., D. L. Keister and A. S. Pietro. 1969. Studies on the respiratory system of aerobically (dark) and anaerobically (light) grown *Rhodospirillum rubrum*. Arch. Microbiol. 67 : 378-396.
- Uffen, R. L. 1973a. Growth properties of *Rhodospirillum rubrum* mutants and fermentation of pyruvate in anaerobic, dark conditions. J. Bacteriol. 116 : 874-884.
- Uffen, R. L. 1973b. Effect of low-intensity light on growth response and bacteriochlorophyll concentration on *Rhodospirillum rubrum* mutant C. J. Bacteriol. 116 : 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. 163(3) : 943-950.
- Uffen, R. L. and R. S. Wolfe. 1970. Anaerobic growth of purple nonsulfur bacteria under dark conditions. J. Bacteriol. 104 : 462-472.
- Van der Rest, M. and G. Gingras. 1974. The pigment complement of the photosynthetic reaction center isolated from *Rhodospirillum rubrum*. J. Biol. Chem. 249(20) : 6446-6453.
- Van Niel, C. B. 1941. The bacterial photosynthesis and their importance for the general problem of photosynthesis. Adv. Enzymol. 1 : 263-328.
- Vasconcelos, I., L. Girbal and P. Soucaille. 1994. Regulation of carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum*

- growth in chemostat culture at neutral pH on mixures of glucose and glycerol. *J. Bacteriol.* 176(3) : 1443-1450.
- Vernon, L. P. and A. F. Garcia. 1967. Pigment-protein complexes derived from *Rhodospirillum rubrum* chromatophores by enzymatic digestion. *Biochim. Biophys. Acta.* 143 : 144-153.
- Wellington, C. L., C. E. Bauer and J. T. Beatty. 1992. Photosynthesis gene superoperons in purple nonsulfur bacteria : the tip of the iceberg? *Can. J. Microbiol.* 38 : 20-27.
- Young, D. A., M. B. Rudzik and B. L. Marrs. 1992. An overlap between operons involved in carotenoid and bacteriochlorophyll biosynthesis in *Rhodobacter capsulatus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 95 : 213-218.