

碩士學位請求論文

光合成 細菌 *Rhodospirillum rubrum*의
生長에 對한 acetate-glutamate
混合 炭素源의 上昇 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

任 昌 斗

1997年 2月

光合成 細菌 *Rhodospirillum rubrum*의
生長에 對한 acetate-glutamate
混合 炭素源의 上昇 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

1996年 12月 日

濟州大學校 教育大學院 生物教育 專攻



提出者 任昌斗

任昌斗의 教育學 碩士學位 論文을 認准함

1997年 1月 日

審査委員長
審査委員
審査委員

鄭朴吳

忠德鐵



<국문 초록>

광합성 세균 *Rhodospirillum rubrum*의 생장에 대한
acetate-glutamate 혼합 탄소원의 상승 효과

임 창 두

제주대학교 교육대학원 생물교육전공

지도교수 오 덕 철

*Rhodospirillum rubrum*을 acetate, glutamate, acetate-glutamate 혼합 배지에서 명배양과 암배양 조건에 따라 성장과 탄소원비 등을 비교하였다.

혐기적 명배양에서는 acetate나 glutamate 배지에서 보다 acetate-glutamate 혼합 배지에서 생장이 매우 빨랐으나, 최종적인 성장량은 거의 비슷하였고, acetate 배지의 유도기가 가장 길었다. 호기적 암배양에서는 acetate-glutamate 혼합 배지에서의 생장이 명배양보다 오히려 더 빨랐으나 단독 탄소원 배지에서는 240시간이 될 때까지 생장이 매우 낮았다.

탄소원의 소비는 단독 탄소원에서의 배양일 때는 각각 성장률의 증가에 비례하여 증가되었고, 혼합 탄소원일 때는 glutamate 배지보다 acetate 배지에서 소비 속도가 증가되었다. pH 역시 탄소원이 소비됨에 따라 증가하였다.

이러한 결과들은 명·암배양 모두에서 acetate와 glutamate가 혼합 탄소원으로 제공될 때 각각의 단독 탄소원에서 보다 생장이 매우 촉진되며, glutamate가 어떤 방법으로든지 acetate 소비를 촉진함으로써 생장에 대하여 두 탄소원이 상승 작용을 나타내는 것으로 판단된다.

목 차

I. 서 론	1
II. 재 료 및 방 법	3
1. 균주 및 배양	3
2. 생세포의 흡광도 및 pH 측정	4
3. 탄소원 및 암모니아의 정량	5
III. 결과 및 고찰	6
1. 배양 조건에 따른 세포 성장량 및 배지의 pH 변화	6
2. 탄소원의 소모량	13
3. 암모니아의 정량 분석	22
참 고 문 헌	25
Abstract	28

그림 목 차

Fig 1.	Growth of <i>Rhodospirillum rubrum</i> cultured anaerobically on different carbon sources.	7
Fig 2.	pH changes of anaerobically grown <i>Rhodospirillum rubrum</i> culture media of different carbon sources.	9
Fig 3.	Growth of <i>Rhodospirillum rubrum</i> cultured aerobically on different carbon sources.	11
Fig 4.	pH changes of aerobically grown <i>Rhodospirillum rubrum</i> culture media of different carbon sources.	12
Fig 5.	Growth and acetate consumption of <i>Rhodospirillum rubrum</i> cultured anaerobically on acetate medium.	15
Fig 6.	Growth and glutamate consumption of <i>Rhodospirillum rubrum</i> cultured anaerobically on glutamate medium.	16
Fig 7.	Growth and substrate consumption of <i>Rhodospirillum rubrum</i> cultured anaerobically on acetate-glutamate mixtures.	17
Fig 8.	Growth and substrate consumption of <i>Rhodospirillum rubrum</i> cultured aerobically on different carbon sources.	20
Fig. 9.	Growth and substrate consumption of <i>Rhodospirillum rubrum</i> cultured aerobically on acetate-glutamate mixtures.	21
Fig 10.	Ammonia contents in the anaerobically grown <i>Rhodospirillum rubrum</i> culture media of different carbon sources.	23
Fig 11.	Ammonia contents in the aerobically grown <i>Rhodospirillum rubrum</i> culture media of different carbon sources.	24

I. 서 론

비유황 홍색 광합성 세균의 일종인 *Rhodospirillum rubrum*은 빛이 있는 조건하에서는 혐기적 광합성으로, 빛이 없는 조건하에서는 호기적 호흡으로 성장할 수 있다 (Van Niel, 1941 ; Elsdén and Omerod, 1956 ; Thore et al., 1969 ; Oelze and Pahlke, 1976). 빛이 없고 혐기적인 조건하에서도 적절한 탄소원만 공급되면 발효에 의하여 성장할 수 있는 것으로 밝혀짐으로써 에너지 생성면에서 어떤 조건에서도 생장이 가능하므로 생리학적, 생태학적으로 매우 흥미있는 생물로 취급되어 많은 연구자들의 재료로 이용되었다(Kohlmiller and Gest, 1951 ; Thore et al., 1969 ; Uffen and Wolfe, 1970 ; Uffen, 1973a ; Schultz and Weaver, 1982 ; Schultz et al., 1985).

그리고 광종속 영양생물인 *R. rubrum*은 탄소원으로 다양한 유기물을 이용할 수 있는 것으로 밝혀졌으며(Elsden and Ormerod, 1956 ; Knight, 1962 ; Olsen and Merrick, 1968), 배양조건을 달리했을 때의 탄소원의 이용과 성장에 대한 효과 (Coleman, 1959 ; Uffen and Wolfe, 1970 ; Uffen, 1973a,b), 탄소원을 혼합했을 때의 성장에 미치는 효과(Gest et al., 1962 ; Ohmori et al., 1974 ; Solaiman and Uffen, 1982 ; Tauchert et al., 1990) 등이 부분적으로 보고되어 있으나, *R. rubrum*의 탄소원 이용에 관한 실험들의 대부분은 단순히 분류학적 목적으로 이용 가능 여부를 밝히는 데 국한되어 있을 뿐이다.

최근에 비광합성 세균인 *Hypomicrobium* X(Brooke and Attwood, 1983), *Eubacterium limosum*(Loubière and Lindley, 1991), *Azotobacter vinelandii*(Wong et al., 1994) 등에서 혼합 탄소원에 따른 성장 효과에 대한 보고 등이 있다. 그러나 광합성 세균을 이용한 연구는 미흡한 실정으로 이에 대해서는 Song등(1994)의 *R. rubrum*에서의 광합성 색소 형성에 대한 탄소원의 효과, Albers와 Gottschalk(1976)의 다수의 Rhodospirillaceae에서 acetate 대사의 비교, Youn과 Lee(1991), Lee등(1994)이 광합성 세균간의 유연 관계를 밝힌 것 등이 있다.

광합성 세균은 유기물을 탄소원으로 이용하는 경우에는, 단독으로 사용할 때보다

두 가지 탄소원을 혼합하여 사용할 때가 매우 빠른 성장 속도를 나타내며(Song et al., 1994), 또한 비광합성 세균인 *Thiobacillus* A2(Wood and Kelly, 1977), *Eubacterium limosum* (Loubière and Lindley, 1991), *Leconostoc oenos*(Salou et al., 1994), *Azotobacter vinelandii*(Wong et al., 1994) 등을 이용한 연구도 혼합기질로 사용했을 때의 생장이 훨씬 증가한다고 보고하고 있다.

본 연구는 *R. rubrum*의 배양 조건을 혐기적, 호기적으로 달리하여 성장량 및 배지내의 pH의 변화, 탄소원의 소모량, 암모니아량을 측정하여, 배양 조건에 따른 성장량과 탄소원, 질소원의 소모량을 통해 혼합 탄소원에서의 상승 효과에 미치는 영향을 알아보려고 하였다.



II. 재 료 및 방 법

1. 균주 및 배양

1) 균주 및 배지

사용된 균주는 *R. rubrum* S1(ATCC 1770)이고, 배지는 기본 무기 배지로 탄소원을 뺀 Bose 배지(Bose et al., 1962)를 사용하였는데, 그 조성은 KH_2PO_4 , 600 mg ; K_2HPO_4 , 900 mg ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 200 mg ; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 75 mg ; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 11.8 mg ; 미량원소 용액(100 mL D.W. ; H_3BO_3 , 280 mg ; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 210 mg ; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 75 mg ; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 24 mg ; $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4 mg), 1 mL ; EDTA, 20 mg ; biotin, 15 μg ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.25 mg ; D.W. 1 L이고, 여기에 탄소원을 첨가하고 1N NaOH를 사용하여 pH 7.0으로 조절한 후(Oelze and Pahlke, 1976) 사용하였다. 사용한 탄소원은 sodium acetate(anhydrous), L-glutamic acid이며, 단독일 때는 0.3%(w/v), 혼합일 때는 각각 0.15%(w/v)씩 사용하였다.

2) 세포 배양

(1) 혐기적 명배양

Malate 배지에서 2 차 계대배양을 통해 혐기적으로 전배양한 균주를 각 탄소원별 배양액에 세포량이 optical density 0.1(O.D., 0.1)이 되도록 조정하여 접종하고, cap tube에서 혐기적으로 하여 백열전구로 2,000 Lux, 30℃를 유지시켜 shaking incubator(Vision Scientific Co, KMC 8480)에서 150rpm 으로 명배양하였다.

(2) 암배양

500 mL 삼각 플라스크에 malate 배지 300 mL (Horio and Kamen, 1962 ; Uffen and Wolfe, 1970)를 넣어 shaking incubator에서 멸균한 후 지수기의 *R. rubrum* 배양액 10 mL를 넣어 솜 마개로 막은 다음, 알루미늄 foil로 싸서 (Horio and Kamen, 1962 ; Uffen and Wolfe, 1970) 광을 차단하여 shaking incubator에서 150 rpm, 30°C 조건으로 3일간 전배양하였다. 계대배양은 암배양된 malate 배양액을 30 mL을 접종한 후 전배양과 동일한 방법으로 3 일간 배양하였고, 2 차 계대배양한 지수기의 균주를 각 탄소원별 배양액에 세포량이 일치하도록 조정하여(O.D., 0.1) 접종하고, 50 mL 삼각플라스크에 10 mL씩 넣어 전배양과 동일한 방법으로 배양하였다.

2. 생세포의 흡광도 및 pH 측정

배양 세포는 성장 속도를 고려하여 일정한 시간 간격에 따라 sample을 3 개씩 수확하여 vortex mixer로 균질화 시킨 후 680 nm에서 O.D.(Perkin-Elmer Lambda 5 UV/VIS spectrophotometer 7230)로 성장량을 측정하고 (Cohen-Bazire and Kunisawa, 1960 ; Solaiman and Uffen, 1982), 원심분리 (Soval RC-5C Centrifuge SS-34 rotor, 5,000rpm, 6°C, 10분)시킨 후, 상정액을 취하여 pH(Cole parmer, Model#59003-00)를 측정하고, 3 회의 반복 실험한 측정치를 산술 평균으로 그래프를 그리고, 표준 오차를 표시하였다.

3. 탄소원 및 암모니아의 정량

Acetate 와 glutamate의 정량은 배양 시간별로 배양액을 세포 수확시와 동일한 방법으로 원심분리시켜 세포를 제거한 후 얻은 상정액으로 측정하였고 (Uffen, 1985), 3 회 반복 실험한 측정치를 산술평균으로 그래프를 그리고, 표준 오차를 표시하였다.

1) Acetate의 정량은 원심분리한 상정액을 filtering(filter pore, 0.2 μm)한 후 HPLC(Waters Products Division Millipore Ltd, LC 7000160-11)를 이용하였으며, HPLC condition은 다음과 같다.

Flow rate, 0.5 mL/min ; chart speed, 0.5 Cm/min ; detector, UV 214nm ; eluent, 0.1% phosphate ; AUFS, 0.02(감도) ; analysis time, 30 min ; injection volume, 15 μL ; column, organic acid analysis column(C-610H) ; column temperature, 30 $^{\circ}\text{C}$.

2) Glutamate 및 NH_3 의 정량은 아미노산 분석기(Pharmacia LKB Biochrome Ltd, Biocrome 20 PEEK Sodium)를 이용하였으며, Amino acid analyzer condition은 다음과 같다.

Volume loaded, 10 μl ; amount loaded, 5 mL ; O.D. range(440, 570nm), 0~0.1 ; flow rate, buffer-35 mL/hr(Nin/OPA, 25 mL/hr) ; pressure, buffer, 50 bar(Nin/OPA, 11 Bar) ; column, P-0032 ; reaction coil temperature, 135 $^{\circ}\text{C}$.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 배양 조건에 따른 세포 성장량 및 배지의 pH 변화

1) 혐기적 명배양에서의 성장

Fig.1은 단일 탄소원으로 acetate와 glutamate 배지, 혼합 탄소원으로 acetate-glutamate 배지에서의 성장 곡선으로, 탄소원의 종류에 따라 차이를 나타내고 있다.

Acetate에서의 초기 성장율은 낮은 편이나, 지속적인 배양 결과 장시간의 유도기(156 시간)를 거쳐 240 시간(O.D., 1.7)만에 정지기에 도달하는 매우 느린 성장을 보여주고 있다. 이는 acetate 및 혼합 배지에서의 광대사율을 비교한 결과 acetate를 단독으로 사용하는 경우 광대사율이 혼합 배지에 비해 저조하며, 혼합 배지에서의 정지기일 때 acetate 단독 배지에서는 계속 성장량이 증가한다는 Elsdon과 Ormerod(1956)의 보고와 일치하고 있다. 또한 긴 유도기(138 시간)를 거쳐 306 시간(O.D., 0.3)에 비교적 높은 성장을 보인다는 Song 등(1994)의 결과와는 차이를 보였다.

Glutamate 배지에서의 성장은 초기부터 계속되어 84 시간에 최고 성장량(O.D., 1.9)을 나타내고 있는데, 이는 질소원인 이성체 아미노산 L-glutamic acid의 이용율이 매우 높아 80 시간만에 최고 성장을 보인다는 Coleman(1958)의 보고와 거의 일치하고 있다. 그러나 glutamate를 단독으로 이용할 때 138 시간의 유도기를 거쳐 282 시간(O.D., 0.5)배양에서 비교적 높은 성장을 보인다는 Song 등(1994)의 결과와는 차이를 보이고 있다.

Acetate-glutamate를 혼합 탄소원으로 사용했을 때의 성장은 glutamate의 성장 곡선과 비슷하나, 72 시간(O.D., 1.8)만에 정지기에 도달하는 빠른 성장율을 보이고 있다.

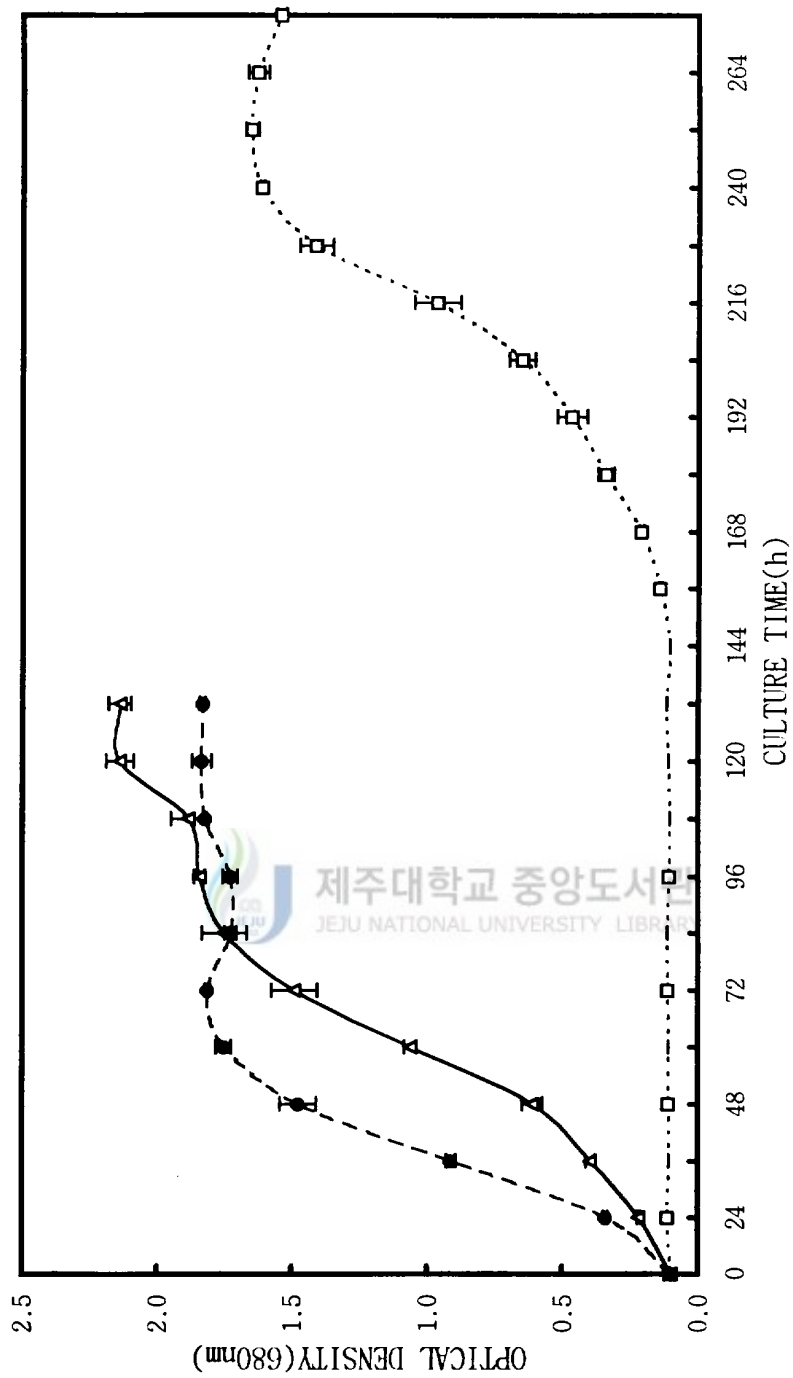


Fig.1. Growth of *Rhodospirillum rubrum* cultured anaerobically on different carbon sources(mean \pm standard error, n=3).

··□·· Acetate medium —▲— Glutamate medium - - ● - - Acetate-Glutamate medium

Fig.2는 단일 탄소원 acetate, glutamate 및 acetate-glutamate 혼합 배지에서 pH의 변화를 나타낸 것으로, pH의 상승은 생장에 따른 기질의 대사 산물에 의한 것으로 생장이 증가함에 따라 알칼리도가 높게 나타나고 있다.

Fig.1과 Fig.2를 종합하여 볼 때, 세포의 성장 및 pH의 증가는 glutamate 배지에서와 acetate-glutamate 혼합 배지에서는 거의 유사하게 나타나는 데 비하여, acetate 단독일 때는 장시간의 유도기를 거친 후, glutamate 및 acetate-glutamate 혼합 탄소원에서와 비슷하게 나타나고 있음을 볼 수 있다. 또한 acetate를 단독으로 사용했을 때보다 acetate와 glutamate를 혼합했을 때의 생장이 훨씬 높게 나타나고 있다. 이것은 탄소원으로 malate를 단독으로 사용하는 것보다 pyruvate와 혼합하여 사용하는 경우에 짧은 유도기를 거쳐 성장율이 높게 나타난다는 보고(Solaiman and Uffen, 1982)와, acetate를 malate, succinate, 또는 fumarate와 혼합하였을 때 성장율이 증가한다는 보고(Elsden and Ormerod, 1956)와도 일치하고 있다. 그리고 acetate-glutamate 혼합 탄소원에서의 성장량은 acetate나 glutamate에서의 성장량에 비해 크게 증가한다는 보고(Song et al., 1994)와는 다르게 나타나고 있는데, 이것은 집중한 세포량의 차이에 의한 유도 기간의 격차와 최고 성장량에 도달하는 시기를 비교하는 기준 시점이 다르기 때문으로 사료된다.

한편, 비광합성 세균인 *Eubacterium limosum*에서 acetate와 malate 등을 혼합했을 때(Loubière and Lindley, 1991)와 *Leuconostoc oenos*에서 glucose와 citrate 또는 fructose를 혼합했을 때의 성장율의 증가 현상(Salou et al., 1994) 등을 볼 때에, 탄소원을 혼합하면 세균의 성장에 상승 효과를 나타내는 것으로 보아 본 실험의 결과와도 일치하는 것으로 보인다.

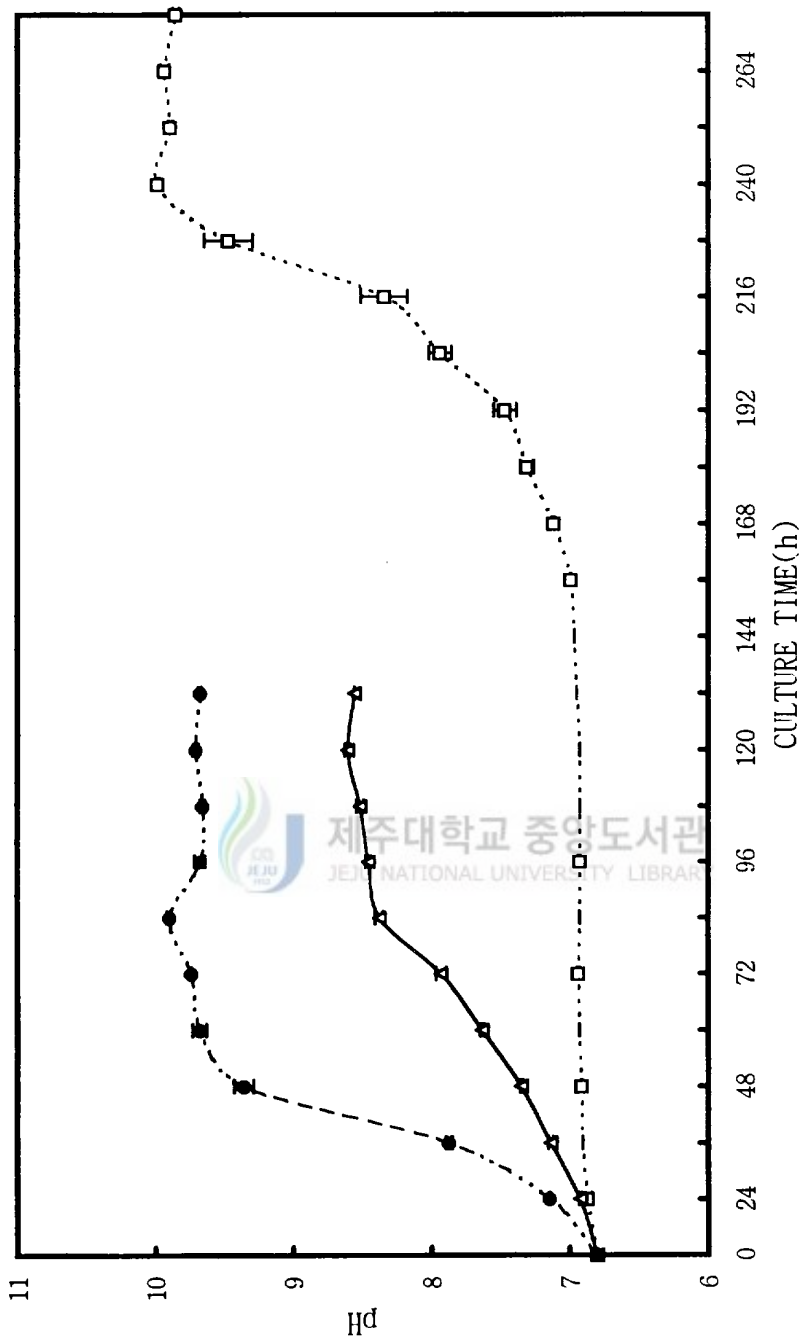


Fig. 2. pH changes of anaerobically grown *Rhodospirillum rubrum* culture media of different carbon sources (mean \pm standard error, n=3).
 ---□--- Acetate medium —▲— Glutamate medium -●- Acetate-Glutamate medium

2) 호기적 암배양에서의 성장

Fig.3은 단일 탄소원으로 acetate와 glutamate, 혼합 탄소원으로 acetate-glutamate를 이용했을 때의 성장 곡선으로 탄소원의 종류에 따라 비교적 큰 차이를 나타내고 있다.

Acetate 배지와 glutamate 배지에서의 생장은 장시간의 유도기(24~96 시간)를 거치는 저조한 생장이지만, glutamate 배지에서의 성장량이 조금 높게 나타나고 있다.

Acetate-glutamate를 혼합 탄소원으로 사용했을 때의 성장 곡선은 혐기적 명배양에서와 비슷하나, 정지기에 도달하는 시간은 48 시간으로 혐기적 명배양(72 시간)에서보다 훨씬 빠르고, 최고 성장량은 O.D., 1.4로서 혐기적 명배양(O.D., 1.8)에서 보다 약간 낮게 나타나고 있다.

Fig.4는 acetate와 glutamate를 단독으로 사용했을 때와 혼합하여 사용하였을 때, 배지 내의 pH 변화를 나타낸 것으로, acetate-glutamate, glutamate, acetate 배지 순으로 pH가 상승하는 것은 생장의 증가와 함께 대사되는 기질의 소모에 따른 결과인 것으로 사료된다.

Fig.3과 Fig.4에서 볼 때, 탄소원을 단독으로 사용할 때보다 혼합으로 사용했을 때의 성장량이 훨씬 높게 나타나는데, 이는 비광합성 세균인 *Azotobacter vinelandii*에서 galactose와 glucose를 혼합했을 때의 상승 효과에 대한 보고(Wong et al., 1995)와 *Thiobacillus A2*에서 당과 유기산을 혼합했을 때의 상승 효과에 대한 보고(Wood and Kelly, 1977)와 거의 일치하고 있는 것으로 보아, 호기적 조건에서도 혼합 탄소원에서 배양하는 경우가 세포 성장에 상승 효과가 있음을 나타내는 것으로 해석된다. 다만, 단독 배양을 했을 때의 제한된 배양 시간(240 시간)으로 인하여 최종 성장량을 측정하지 못해, 지속적으로 생장이 가능한지의 여부를 단정할 수는 없다.

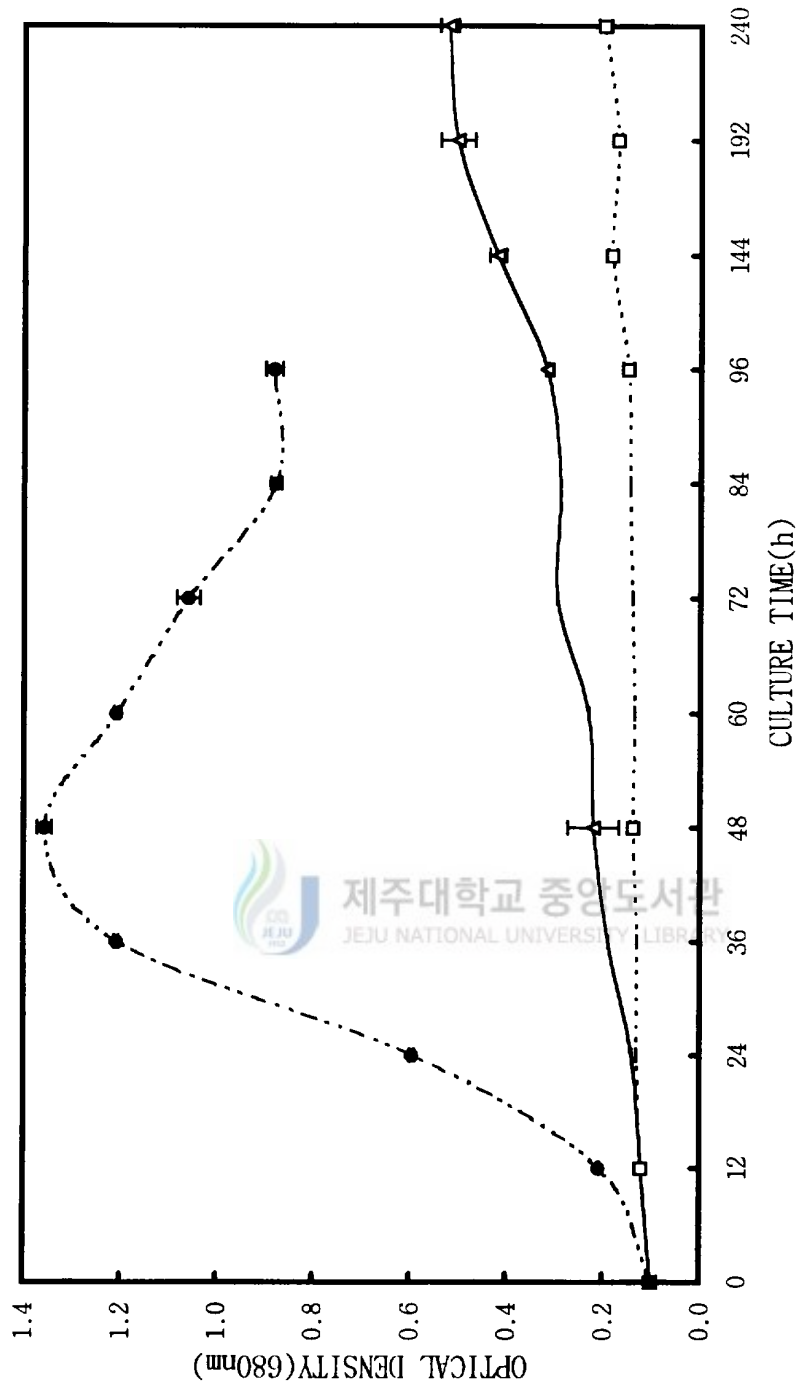


Fig.3. Growth of *Rhodospirillum rubrum* cultured aerobically on different carbon sources (mean \pm standard error, n=3).

□·····Acetate medium ●---Glutamate medium ▲---Acetate-Glutamate medium

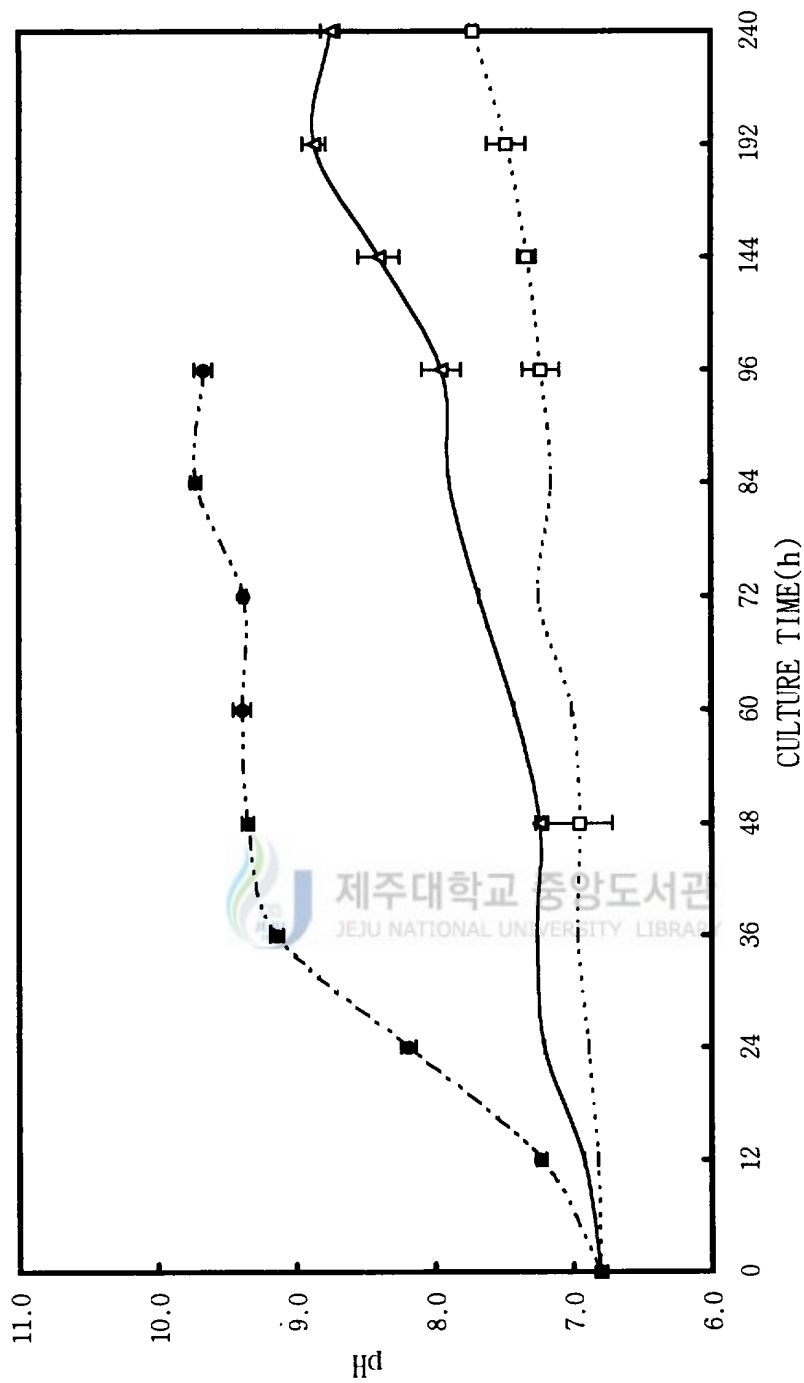


Fig.4. pH changes of aerobically grown *Rhodospirillum rubrum* culture media of different carbon sources(mean \pm standard error, n=3).
 ...□...Acetate medium —▲— Glutamate medium -●- Acetate-Glutamate medium

2. 탄소원의 소모량

1) 혐기적 명배양에서의 탄소원 소모량

Fig.5는 acetate 배지에서의 생장에 따른 탄소원의 소모량을 나타낸 것으로, 긴 유도기(156 시간)가 지난 후부터 비교적 많은 소모 경향을 보이며 240 시간에 정지기에 도달하고 있다. acetate에서의 초기 생장이 저조한 것은 acetate를 단일 탄소원으로 사용하는 경우 광대사율이 낮다는 Elsden과 Ormerod(1956)의 보고와 일치하였다.

Fig.6은 glutamate 배지에서의 생장에 따른 탄소원의 소비량을 나타낸 것으로, acetate 배지에서와는 달리 초기부터 지속적인 완만한 소모 경향을 보여주고 있다. acetate가 반감되는 데 소요되는 시간이 84 시간인데 비해 glutamate는 190 시간이 소요되는 것으로 보아, acetate보다 glutamate가 더 빠르게 이용되고 있는 것임을 나타내고 있다.

Fig.7은 acetate와 glutamate를 혼합한 배지에서의 탄소원 소모량의 변화를 나타낸 것으로, acetate가 뚜렷하게 소모되는 데 비해 glutamate는 완만한 소모 경향을 보이고 있다. 또한 acetate의 잔여량이 최저에 도달할 때의 시기(60~72 시간)와 세포 생장이 지수기일 때(60~72 시간)가 일치하고 있는 것으로 보아, acetate를 급속히 사용하고 있음을 알 수 있다. 이것은 *R. rubrum*을 pyruvate와 DL-malic acid를 혼합한 탄소원에 배양했을 때, pyruvate를 빠르게 이용한 후 DL-malic acid를 소모하여 성장량이 증가한다는 보고(Solaiman and Uffen, 1982)와, acetate를 단독으로 사용할 때는 광대사율이 저조한 반면 succinate, fumarate, 또는 malate와 혼합하여 사용할 때는 광대사율이 증가하며 특히, acetate-succinate 혼합 배지에서 succinate를 3 배 가량 빠르게 소모한다는 보고(Elsden and Ormerod, 1956)와도 일치하고 있다.

또한, Song 등(1994)이 glutamate를 단독으로 사용할 때의 소비 경향보다 acetate-glutamate 혼합 탄소원에서의 glutamate가 비교적 서서히 감소되었다는 결과와도 일치하고 있으며, 비광합성 세균인 *Eubacterium limosum*에서도

혼합 탄소원으로 methanol과 acetate를 사용할 때 성장 초기부터 methanol이 다량 이용되고 있다는 보고(Loubière and Lindley, 1991)와도 일치하고 있다.

Fig.5, 6, 7에서 볼 때 acetate-glutamate 혼합 탄소원에서의 급격한 생장의 상승 효과는 *R. rubrum*이 다량의 acetate를 급속히 사용한 결과로서, 탄소원이며 질소원으로 이용될 수 있는 glutamate가 acetate의 대사를 촉진하는 데 기인하는 것이라 사료된다.

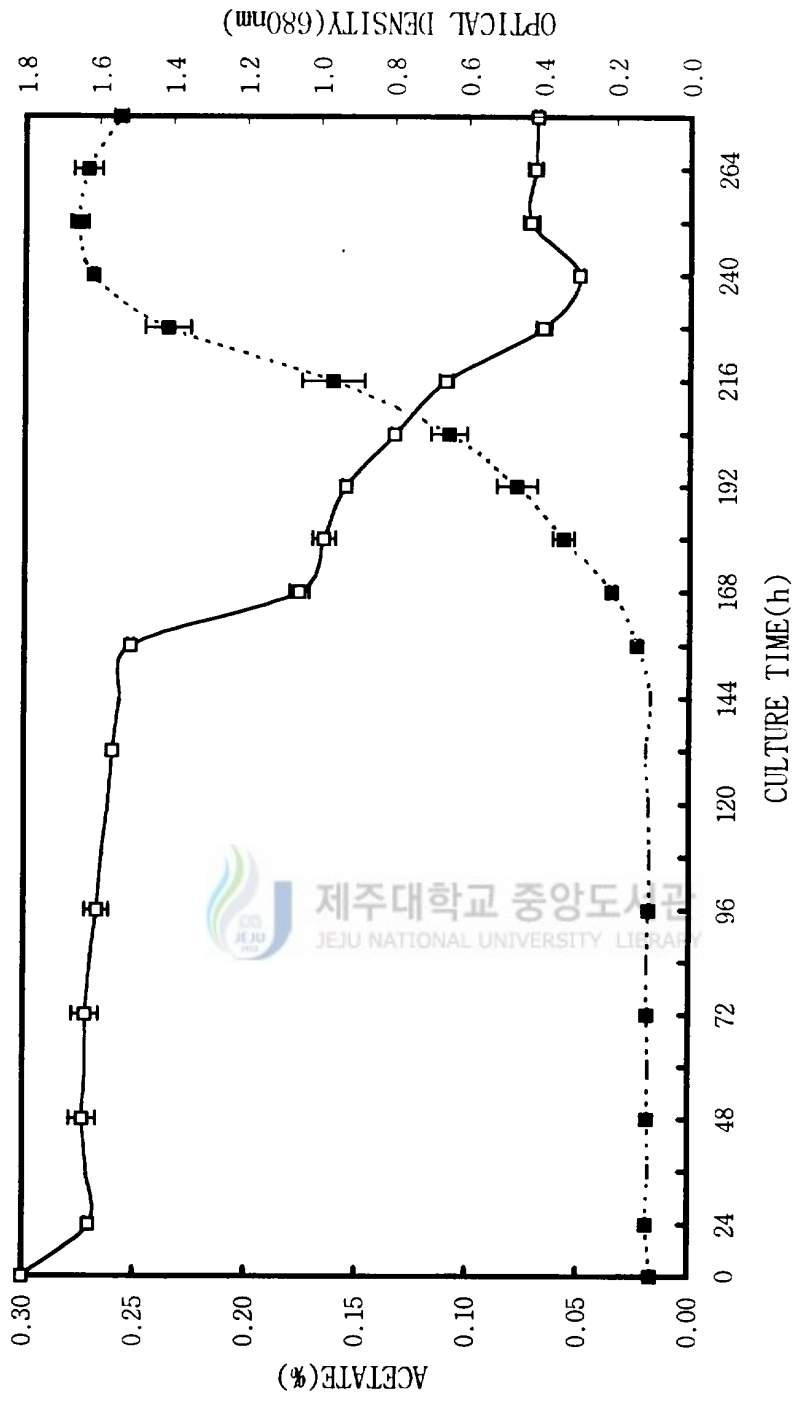


Fig.5. Growth (····) and acetate consumption (—□—) of *Rhodospirillum rubrum* cultured anaerobically on acetate medium (mean \pm standard error, n=3).

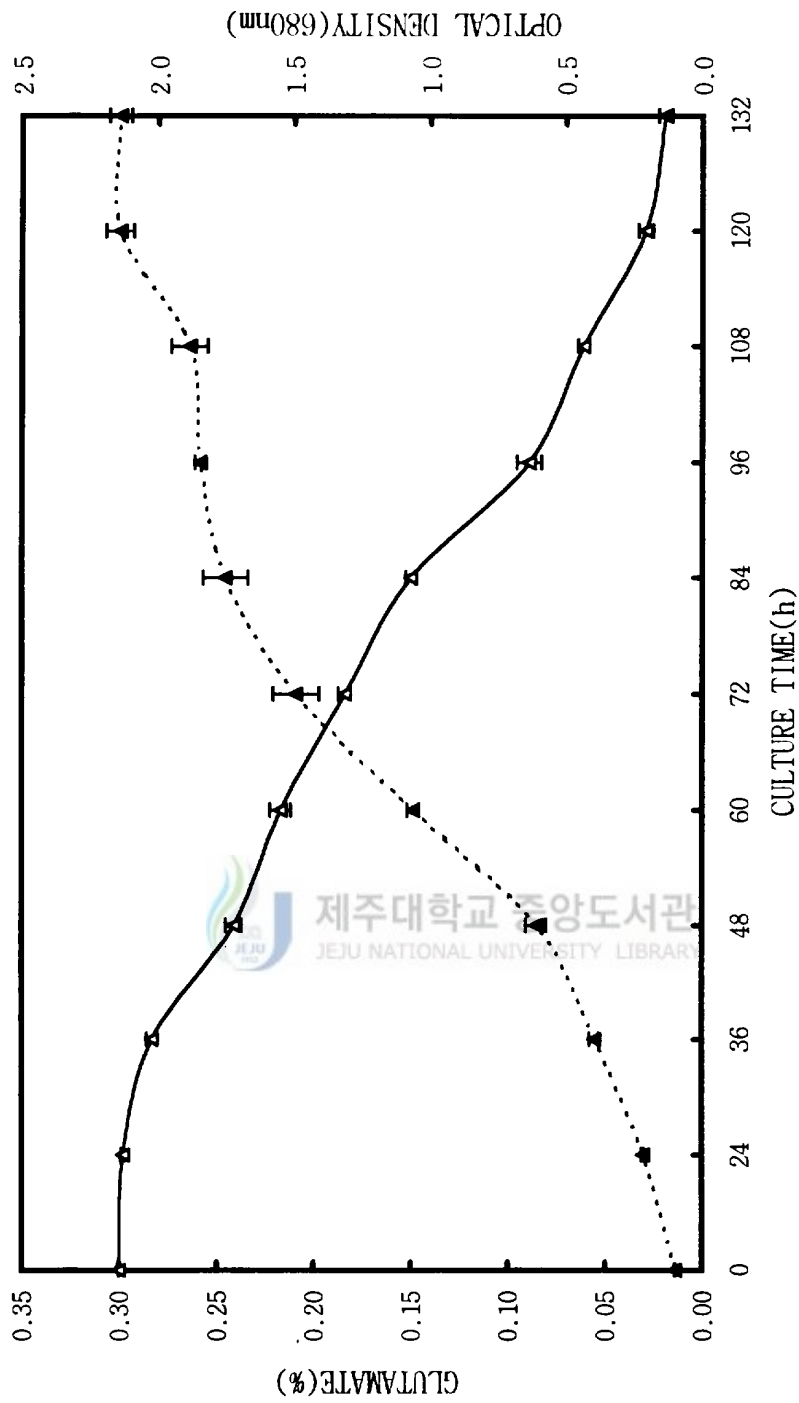


Fig.6. Growth(····) and glutamate consumption(—▲—) of *Rhodospirillum rubrum* cultured anaerobically on glutamate medium(mean \pm standard error, n=3).

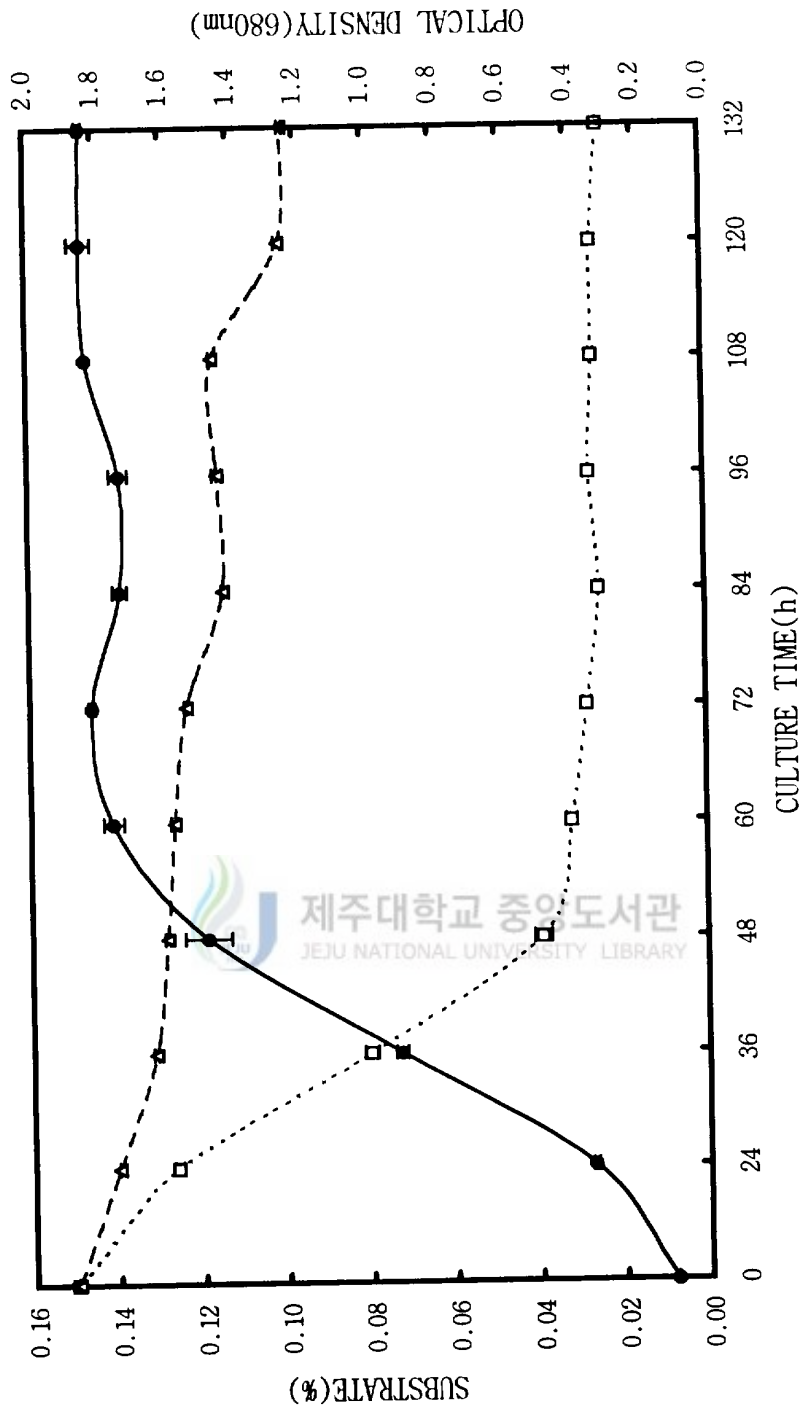


Fig.7. Growth(—●—) and substrate consumption(---□---, acetate; -▲-, glutamate) of *Rhodospirillum rubrum* cultured anaerobically on acetate-glutamate mixtures(mean \pm standard error, n=3).

2) 호기적 암배양에서의 탄소원 소모량

Fig.8은 acetate와 glutamate 배지에서 생장에 따른 탄소원의 소모량을 나타낸 것으로, 긴 유도기 동안의 저조한 성장과 함께 탄소원의 소모량도 거의 변화가 없음을 보여주고 있으며, glutamate 배지에서 유도기 이후부터 비교적 완만한 생장에 따라 소모량이 증가하는 것은 단일 탄소원을 이용할 때 acetate에 비해 glutamate가 보다 더 빠르게 대사에 이용되고 있음을 나타내는 것이다.

호기적 조건에서는 장시간의 배양에 한계가 있어 240 시간 이후의 탄소원 소모량을 측정하지 못하여, 배양 시간을 더욱 더 연장하였을 때 성장량의 증가 여부와 생장이 지속됨에 따라 탄소원의 소모량도 변화될 것인지의 여부는 확인할 수 없었다.

Fig.9는 acetate와 glutamate를 혼합 탄소원으로 이용할 때의 생장에 따른 탄소원의 소모량을 나타낸 것으로, glutamate에 비해 acetate가 급격히 소모되고 있음을 볼 수 있다. 세포 생장이 지수기(48~60 시간)에 달했을 때 acetate는 거의 소모되어 최저치에 도달하며, 이 때부터 glutamate가 급격히 감소되며 생장이 증가하는 경향을 보이고 있다. 이는 비광합성 세균인 *Thiobacillus* A2가 fructose와 acetate를 혼합한 배지에서 성장할 때, fructose보다는 acetate를 급격히 이용하여 acetate가 거의 소모되면 fructose를 이용하여 급격히 성장한다는 보고(Wood and Kelly, 1977)와, *Hypomicrobium* X는 methylamine-ethanol 혼합탄소원에서 두 탄소원이 동시에 생장에 이용될 때, methylamine이 급격히 소모되면서 1 차 성장기(O.D., 0.6)를 거치고, methylamine이 거의 소모된 후 ethanol만을 이용하는 마지막 성장기(O.D., 1.5)를 거친다는 보고(Brook and Attwood, 1983)와도 일치하고 있다. 또한 acetate와 glucose를 거의 사용하지 않고 acetate만을 우선적으로 사용하여 초기 생장이 이루어지며, acetate가 다 소모된 후에 glucose를 이용하여 생장이 더욱 증가하는 diauxic growth가 이루어지는 *Thiobacillus* A2에서의 보고

(Wood and Kelly, 1977)와 *Azotobacter vinelandii*에서의 보고(Tauchert et al., 1990)와도 상통하며, *Azotobacter vinelandii*는 galactose-glucose 혼합 배지에서 galactose와 glucose를 동시에 이용하나 galactose를 우선적으로 이용하여 초기 성장을 하고 galactose가 거의 소모된 후부터 glucose를 급격히 소모하면서 2차 생장이 재개된다는 또 다른 diauxic growth에 대한 보고(Wong et al., 1995)와도 같은 경향을 나타내는 것으로 보아, 혼합 탄소원 배지에서는 우선적으로 한 가지 탄소원을 초기 성장에 급격히 이용하기 때문에 거의 소모된 후부터 다른 탄소원의 소모량도 커지면서 생장이 지속되고 있음을 알 수 있다.

Fig.8과 Fig.9에서는 *R. rubrum*이 glutamate에 비해 acetate를 더 많이 이용하여 성장량이 최대가 되면서 acetate가 거의 소모되면 glutamate를 빠르게 소모하여 높은 성장을 유지시키고 있음을 나타내 주고 있다. 이것은 *Azotobacter vinelandii*에서 TCA 회로에 관계하는 효소들이 glucose의 이용을 억제할 수 있다는 보고(Wong et al., 1995) 등을 미루어 볼 때, acetate-glutamate 혼합 탄소원에서 나타나는 생장의 상승 효과는 acetate의 급격한 사용에 의한 것으로 acetate의 대사 산물이 glutamate의 대사계를 억제하며, 탄소원이며 질소원인 glutamate가 acetate의 이용을 촉진하는 어떤 효과가 있는 것으로 사료된다.

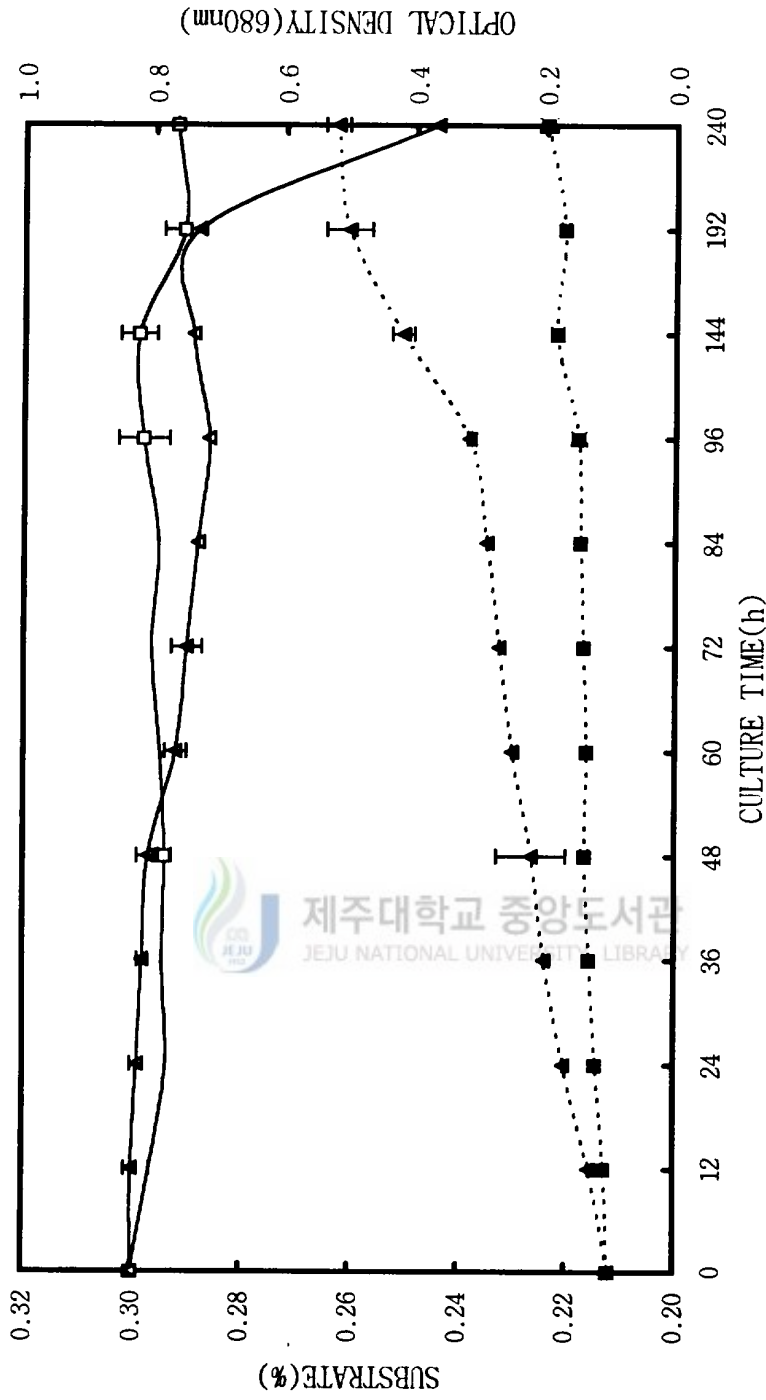


Fig.8. Growth (---■---, acetate medium ; ---▲---, glutamate medium) and substrate consumption(—□—, acetate ; —▲—, glutamate) of *Rhodospirillum rubrum* cultured aerobically on different carbon sources (mean \pm standard error, n=3).

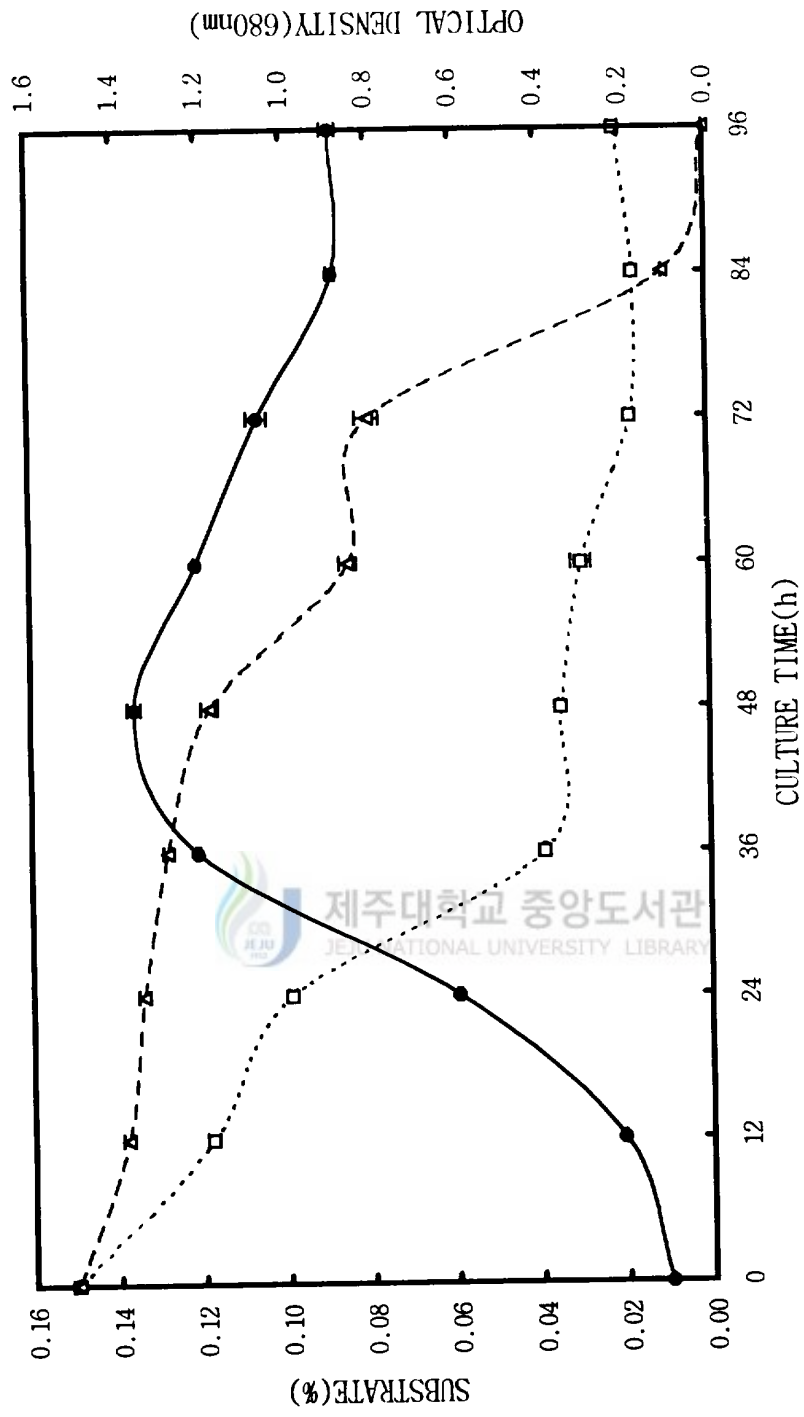


Fig.9. Growth(—●—) and substrate consumption(---□---, acetate; -▲-, glutamate) of *Rhodospirillum rubrum* cultured aerobically on acetate-glutamate mixture(mean ± standard error, n=3).

3. 암모니아의 정량 분석

Fig.10과 Fig.11은 배양 조건에 따라 질소원으로 공급한 암모늄염 함량의 변화를 나타낸 것이다.

혐기적 명배양과 호기적 암배양에서 배지 내의 암모늄염 함량의 변화를 보면, glutamate 배지에서는 소모되어지는 glutamate양에 비례하여 암모니아가 생성되면서 암모늄염도 증가하기 때문에, *R. rubrum*의 성장량은 증가하여도 질소원으로 이용되는 glutamate 배지 내에서 암모늄염 함량의 감소는 거의 없는 것으로 나타나고 있으며, acetate 배지에서는 저조한 성장으로 인하여 암모늄염의 소모량도 적게 나타나고 있다. 그러나, acetate-glutamate 혼합 배지에서는 성장량이 증가함에 따라 질소원인 glutamate의 소모량과 암모늄염의 소모량도 acetate나 glutamate 배지에서보다 비교적 많아 지고 있음을 나타내고 있다.

Fig.10과 Fig.11을 종합하여 볼 때, 암모늄염의 소모량은 혐기적 명배양에서 보다는 광대사가 없는 호기적 암배양에서, 질소원이 충분한 배지보다는 질소원이 부족한 배지에서 비교적 크게 나타나며, 또한 생장이 빠른 혼합 배지에서 소모량이 더욱 커지고 있는 것으로 보아, 암모늄염은 생장에 필요한 질소원으로 상승 효과에 영향을 미치고 있는 것으로 사료된다.

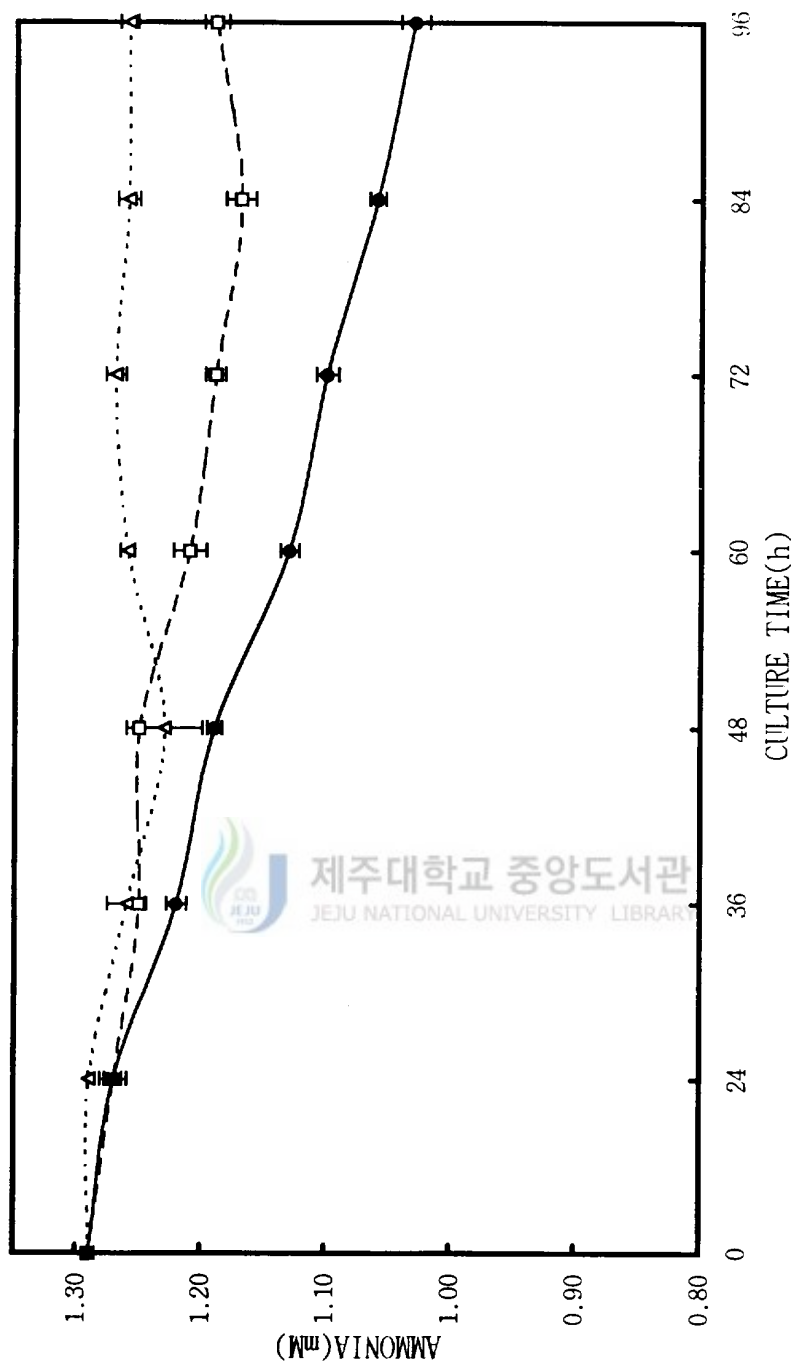


Fig.10. Ammonia contents in the anaerobically grown *Rhodospirillum rubrum* culture media of different carbon sources (mean \pm standard error, n=3).
 -□- Acetate medium -△- Glutamate medium -●- Acetate-Glutamate medium

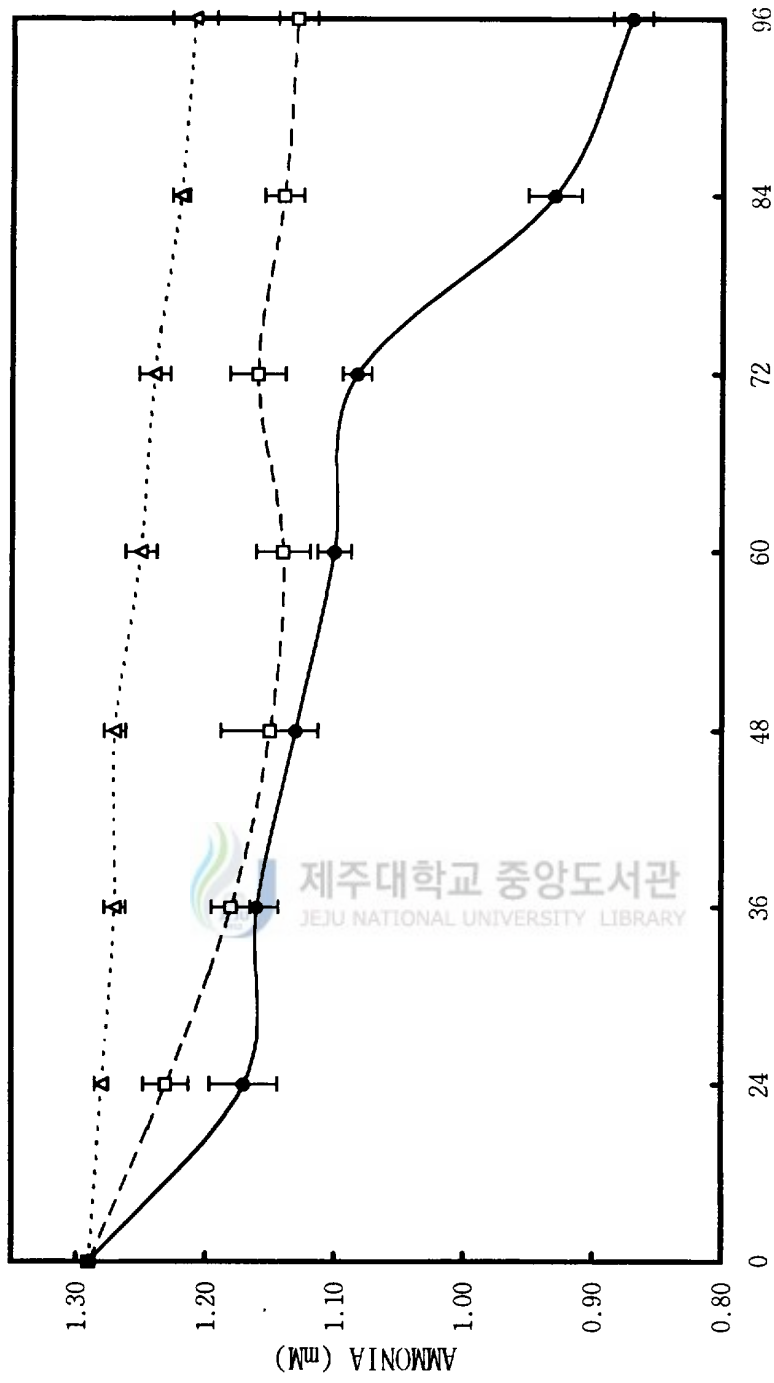


Fig.11. Ammonia contents in the aerobically grown *Rhodospirillum rubrum* culture media of different carbon sources (mean \pm standard error, n=3).

-□- Acetate medium ···△··· Glutamate medium —●— Acetate-Glutamate medium

참 고 문 헌

- Albers, H., and Gottschalk, G. 1976. Acetate metabolism in *Rhodopseudomonas gelatinosa* and several other Rhodospirillaceae. *Arch. Microbiol.*, 111: 45~49.
- Bose, S. K., Gest, H., and Ormerod, J. G. 1962. Light-activated hydrogenase activity in photosynthetic bacterium: A permeability phenomenon, *J. Biol. Chem.*, 236(23): 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. *J. Gen. Microbiol.*, 129: 2399~2404.
- Cohen-Bazire, G. and R. Kunisawa. 1960. Some observation on the synthesis function of the photosynthetic apparatus in *Rhodospillum rubrum*. *P.N.A.S.* 46: 1543~1553.
- Coleman, G. S. 1959. The effect of D,Lglutamic acid on the growth of *Rhodospillum rubrum*. *Biochim. Biophys. Acta.* 59., 131: 55~65.
- Elsden, S. R., and J. G. Ormerod. 1956. The effect of monofluoroacetate on the metabolism of *Rhodospillum rubrum*. *Biochem.*, 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.
- Horio, T., and A. G. Kaman. 1962. Observation on the respiratory system of *Rhodospirillum rubrum*. *Biochem.*, 1(6): 1141~1157.
- Knight, M. 1962. The photometabolism of propionate by *Rhodospirillum rubrum*. *Biochem.*, 84: 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.*, 61: 269~282.

- Lee, S. S., B. S. Yoon, J. S. Kim, and H. S. Lee. 1994. Molecular level relationship of purple nonsulfur bacteria and their relatives. *Kor. J. Microbiol.*, 32: 1~6.
- Loubière, P., and N. D. Lindley. 1991. The use of acetate as an additional co-substrate improves methyltrophic growth of the acetogenic anaerobe *Eubacterium limosum* when CO₂ fixation is rate-limiting. *J. G. Microbiology.*, 137: 2247~2251.
- Loubière, P., E. Gros., V. Paquet., and N. D. Lindley. 1992. Kinetic and physiological implication of the growth behaviour of *Eubacterium limosum* on glucose/methanol mixtures. *J. G. Microbiology.*, 138: 979~985.
- Oelze, J., and W. Pahlke. 1976. The Early Formation of the photosynthetic apparatus in *Rhodospirillum rubrum*. *Arch. Microbiol.*, 108: 281~285.
- 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): 1174~1778.
- Ohmori, H., H. Ishitani., K. Sato., S. Shimizu., and S. Fukui. Metabolism of glutamate in purple nonsulfur bacteria participation of vitamin B₁₂. *Agr. Biol. Chem.*, 38(2): 359~365.
- 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., and P. F. Weaber. 1982. Fermentation and anaerobic respiration by *Rhodospirillum rubrum* and *Rhodopseudomonas capsulata*. *J. Bacteriol.*, 149: 181~191.
- Schultz, J. E., J. W. Gotto, P. F. Weaber., and D. C. Yoch. 1985. Regulation of nitrogen fixation in *Rhodospirillum rubrum* grown under dark, fermentative conditions. *J. Bacteriol.*, 162: 1322~1324.
- Solaiman, D., and R. L. Uffen. 1982. Pyruvate-dependent diauxic growth of *Rhodospirillum rubrum* in light. *J. Bacteriol.*, 152: 1175~1187.

- Song, S. H., S. O. Lee, and D. C. Oh. 1994. Growth, formation of bacteriochlorophyll and carotenoids in a photosynthetic bacterium, *Rhodospirillum rubrum*. J. Basic Science Cheju Nat. Univ., 7: 11~24.
- Tauchert, K., A. Jahn., and J. Oelze. 1990. Control of diauxic growth of *Azotobacter vinelandii* on acetate and glucose. J. Bacteriol., 172(11): 6447~6451.
- 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., 167: 378~396.
- Uffenn, R. L., and R. S. Wolfe. 1970. Anaerobic growth of purple nonsulfur bacteria under dark conditions. J. Bacteriol., 104: 462~472.
- Uffenn, R. L. 1973a. Growth properties of *Rhodospirillum rubrum* mutants and fermentation of pyruvate in anaerobic, dark condition. J. Bacteriol., 116: 874~884.
- Uffenn, R. L. 1973b. Effect of low-intensity light on growth response and bacteriochlorophyll concentration on *Rhodospirillum rubrum* mutant C. J. Bacteriol., 116: 1086~1088.
- Van Niel, C. B. 1941. The bacterial photosynthesis and their importance for the general problem of photosynthesis. Adv. Enzymol., 1: 263~328.
- Wong, T. Y., H. Pei, K. Bancroft., and G. W. Cilders. 1995. Diauxic growth of *Azotobacter vinelandii* on galactose and glucose: Regulation of glucose transport by another hexose. Appl. environ. Microbiol., 61: 430~433.
- Wood, A. P., and D. P. Kelly. 1977. Heterotrophic of *Thiobacillus A2* on sugars and organic acids. Arch. Microbiol., 113: 257~264.
- Youn, B. S., and S. S. Lee. 1991. Relationship among seven species of purple nonsulfur bacteria based on DNA-DNA hybridization. Mol. Cells., 1: 503~506.

Abstract

Synergistic Effect of Acetate-glutamate Mixtures as
Carbon Source on the Growth of a Photosynthetic
Bacterium, *Rhodospirillum rubrum*

Yim, Chang-Doo

Biology Education Major

Graduate School of Education, Cheju National University
Cheju, Korea

Supervised by Professor Oh, Duck-Chul

The growth and the consumption of substrate of *Rhodospirillum rubrum* were compared in the light and dark cultures on the media of acetate, glutamate and acetate-glutamate mixtures as carbon sources.

Under anaerobic, light culture, the growth on the acetate-glutamate mixtures was very rapid than those on single carbon source but the final growth yields were nearly same. Under aerobic, dark culture, the growth on the acetate-glutamate mixtures was more rapid than that of anaerobic light, culture. But growths on single carbon sources were very poor till 240 hours.

* 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 February, 1997.

The consumptions of carbon sources were increased proportionally to the increase of growth on single carbon sources in both dark and light culture, but in case of cultures on mixed carbon sources, the consumption of acetate was much of glutamate in both cultures.

According to these result it is postulated that the effect of acetate-glutamate mixtures on the growth of *Rhodospirillum rubrum* is synergistic and glutamate has a role of promoting the consumption of acetate in some way.

