

## 인산농도의 차이에 따른 광합성 세균 *Rhodospirillum rubrum*의 인산대사에 관한 연구

이동헌 · 이정배 · 김영미 · 오덕철\*  
제주대학교 생물학과

### A Study on the Phosphate Metabolism of a Photosynthetic Bacterium *Rhodospirillum rubrum* in the Different Phosphate Concentrations

Dong-Heon Lee, Jung-Bae Lee, Young-Mi Kim, and Duck-Chul Oh\*  
Dept. of Biology, Cheju Nat'l Univ., Cheju, Cheju-do 690-756, Korea

#### Abstract

The effects of inorganic orthophosphate on the growth, the content of phosphate compounds, the activities of enzymes related to phosphate metabolism and patterns of total cellular proteins were investigated in *Rhodospirillum rubrum* grown on the media of different concentrations of phosphate.

The growth in the phosphate-free medium was very low but very high in the standard and phosphate-excess media.

The cellular contents of all tested phosphate compounds were much decreased in phosphate-free medium. The total phosphate and polyphosphate contents were much higher in phosphate-excess medium than in other media. Generally, the contents of all kind of phosphate compounds in the cell were in order of added phosphate concentration of the medium but the content of lipid phosphate in the cells grown on the phosphate-limited medium and the contents of acid insoluble polyphosphate of cells grown on the phosphate-limited and standard medium were shown similar with those on the phosphate-free medium.

The activities of alkaline phosphatase, tripolyphosphatase and polyphosphatase

---

\* Corresponding author

were much higher in the cells on phosphate-free medium than in any other media, especially the activities of alkaline phosphatase in the cells grown on the media except phosphate-free were near to zero.

The SDS-PAGE pattern of total protein from cells grown on the phosphate-free medium exhibited three new bands which were not seen in the cells grown on the phosphate-added media. The molecular weight of the three new bands were postulated as about 35kD, 40kD and 63kD respectively.

In conclusion, the different concentration of phosphate in the culture medium influenced the cells for the growth, the levels of phosphate compounds, the activities of enzymes related to phosphate metabolism and the pattern of total cellular proteins in many ways in the photosynthetic bacterium, *Rhodospirillum rubrum*.

## 서론

인산은 미생물의 구조와 대사에 중요한 영양원으로 세포내·외의 무기인산 농도에 따른 생리적 변화 및 인산대사조절에 관여 한다(Chrost, 1991). *Acetabularia mediterranea*를 재료로 무기인산을 결핍시킨 배지에서 배양했을때 polyphosphate(poly P)의 합성과 분해에 미치는 영향에 대해 보고된 바 있고(Rubtsov and Kulaev, 1976), 무기인산 결핍하에서 성장율과 호흡율에 관한 연구도 이루어져 있다(Tsal, 1979). 또한 무기인산의 첨가에 따른 유기물 합성 및 poly P의 축적량의 변화에 대해 보고된 바 있다(Choi *et al.*, 1981). 그리고 *Micrococcus lysodeikticus*에서 세균 건조중량의 약 27%가 poly P임을 확인하고 배양시기에 따라 즉, 유도기에 poly P를 축적하다가 정체기에 이르러 점진적으로 감소한다고 보고한 바 있다(Friedberg and Aigad, 1968). Poly P는 세균, 균류, 녹조류등 다양한 생물에서도 발견되고 있다(Kulaev, 1979). Poly P는 phosphoric anhydride group에 의해 결합된 orthophosphate(ortho P)의 중합체로서, 그 세포내 기능은 유기물 합성 및

세포분열 조절에 관여하고, 당의 수송, 무기인산의 저장고 및 공여체, 기타 에너지원으로 작용한다(Kulaev, 1979; Zeib, 1983). 또 핵의 주요한 성분의 하나일 뿐 아니라, histon-DNA complex를 약하게 하여 gene depression에 관여하고, 핵내의 RNA의 합성에 무기인산을 공급하는 기능도 있다(Weinstein and Li, 1976). Poly P는 미생물 대사과정의 regulator로서 기능뿐만 아니라, *Klebsiella aerogenes*, *Rhizopus oryzae*, *Bacillus sp.* 등에서 증급속에 대한 방어작용에도 관여 한다고 하였다(Aiking *et al.*, 1984; Lee *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 1995). 무기인산의 세포내 축적과정은 세포내 인산이용 또는 도입형태를 energy-rich compound로 전환시키는 일련의 에너지 효율화 과정이라고 보고한 바 있었으며(Lee and Choi, 1985), *Myxococcus coralloides* D를 재료로 life cycle 동안 무기폴리인산 축적량에 대한 연구가 있었다(Gonzalez *et al.*, 1989). 무기인산은 alkaline phosphatase의 합성을 억제하며, 정도는 덜하지만 acid phosphatase의 활성도를 억제하며, orthophosphate의 세포내·외 수준에 따라 alkaline phosphatase, tripolyphosphate,

polyphosphatase의 합성이 조정된다고 하였다(Nesmeyanova *et al.*, 1974; Bonting, 1992; Wynne, 1995). 근래에는 미생물에 있어서 인산제한효과에 대한 형태, 생리, 유전적으로 많은 연구가 이루어져 왔는데 *Escherichia coli*에서 인산제한에는 outer membrane pore protein 및 막표면 단백질의 합성이 유도되었다고 보고된바 있으며(Tomassen and Lugtenberg, 1982), 그리고 *Tiobacillus ferrooxidans*에서는 세포 분열이 중지되어 세포의 길이가 신장된다고 하였으며, 몇몇 단백질의 합성이 유도된다는 보고가 있었다(Seeger and Jerez, 1993). 그런데, 광합성 세균에 대한 연구는 *Chlorobium* spp., *Chlorogloea fritschii* 등을 재료로한 연구 외에는 거의 보고된 바 없다(Wynne and Bergstein, 1994; Park, 1992).

따라서, 본 연구는 빛이 있는 조건에서는 혐기적 광합성으로, 빛이 없는 조건에서는 호기적 호흡으로 성장할 수 있고(Oelze and Pahlke, 1976; Thore *et al.*, 1976), 환경조건에 따라 탄소와 에너지 저장물질로 poly- $\beta$ -hydroxybutyrate와 glycogen, poly P를 축적하는 비유황 광합성 세균인 *Rhodospirillum rubrum*을 재료로하여 인산농도를 달리하여 배양할때 배양시기에 따라 합성되는 poly P의 축적량, ortho P등 인산화합물의 합량 변화와 인산대사에 관련된 효소의 활성도의 변화, total 단백질 양상을 알아보고자 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 균주 및 배지

사용된 균주는 *Rhodospirillum rubrum* S1(ATCC 1770)이고, 배지는 Bose 등(1961)의 기본배지에 탄소원으로 malate을

0.3%(w/v)되게 첨가하여 멸균하기 전에 1 N NaOH를 사용하여 pH 7.0으로 조정하였다.

### 2. 접종 및 배양

Malate를 탄소원으로하는 정상배지에서 4-5일간(정지기에 이룰때까지) 배양된 *R. rubrum*을 10,000rpm으로 10분간 원심분리시킨 후, pellet에 인산을 뺀 배지를 넣어 다시 10,000rpm으로 10분간 두 번 원심분리하여 정상배지의 인산성분을 씻어낸 후 인산농도를 각기 달리한 배지에 초기 Optical Density를 0.1로 맞추어 접종하였다. 인산농도는 인산을 제외한 Bose등(1961)의 배지에 무기인산을 0%, 0.003%, 0.03% 그리고 0.3%되게 첨가하여 정하였으며 투명한 1,000 mL 초자배양기로 2,000 lux, 30°C에서 혐기적으로 정치배양하였다.

### 3. 성장량 측정 및 세포 수확

인산농도의 차이에 따른 *R. rubrum*의 성장량은 spectrophotometer(visible 7230)로 680 nm의 O.D.로서 측정하였다.

배양한 세포를 10,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 0.05 M Tris-HCl 완충용액(pH 7.6)으로 두 번 세척한 후 수확하였으며(Kulaev *et al.*, 1974), wet weight는 수분을 따른 후 화학천칭으로 측정하였다.

### 4. 무기인산화합물의 추출 및 정량분석

무기인산화합물의 추출은 Kulaev 등(1974)의 방법을 약간 변형한 Oh(1987)의 방법으로 실시하였다. 추출한 인산분획의 정량은 Chen 등(1956)의 방법에 따라 6 N 황산, 증류수, 2.5% ammonium molybdate, 10% ascorbic acid를 각각 1 : 2 : 1 : 1의 비율로 섞은 발색시약을 사용하여 37°C에

서 2시간 발색시켜 실온에서 식힌 후 spectrophotometer로 820 nm의 O.D.로서 측정하였다.

## 5. 효소용액의 제조 및 단백질 정량

배양시기별로 적량의 세포를 수확하여 Tris-HCl 완충용액 (pH 7.0)으로 3번 세척한 후 동일한 완충용액에 현탁시켜 초음파 파쇄기(UP400A, Sonicator Instrument, U.S.A)로 4℃에서 1분간씩 10회 파쇄한 후 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상정액을 조효소액으로 용하였다. 단백질정량은 Lowry 등(1951)의 방법을 적용하였다.

## 6. 효소의 활성도 측정

### 1) Alkaline Phosphatase

Alkaline phosphatase의 활성도 측정은 다음과 같이 Ernst(1975)의 방법을 적용하였다. 반응액 ( p-NPP 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, KCl 10 mM )에 0.1 M Tris-HCl 완충용액(pH 9.0)을 사용하여 활성도를 나타내었다. 반응액에 세포추출액을 0.5 mL씩 넣고, 대조군에는 동량의 증류수를 넣어 잘 섞은 후, 37℃에서 20분간 반응시켰다. 다음 37.5% TCA용액 0.5 mL를 가하여 효소의 활성을 정지시켰다. 10분 경과 후 재발색을 위하여 1 N NaOH 용액을 2.5 mL를 넣은 후 3,500 rpm에서 원심분리하여, 얻어진 상정액을 410 nm에서 나타나는 O.D.로서 효소의 활성을 측정하였다.

### 2) Trispolyphosphatase와 Polyphosphatase

Trispolyphosphatase 와 polyphosphatase의 활성도 측정은 Kulaev 와 Konoshenko(1971), Rubtsov 와 Kulaev (1976)가 행한 방법에 따라 실시하였다. 0.5

M Tris-HCl 완충용액(pH 7.4) 0.1 mL, 0.01 M MgCl<sub>2</sub> 0.05 mL, 2 M KCl 0.05 mL, 기질용액( Trispolyphosphate는 1.5 mg/mL, Polyphosphate(n=18)는 1 mg/mL) 0.1 mL에 세포추출액 0.2 mL를 가하여 반응시켰다. 반응은 37℃에서 20분간 시켰으며, 원심분리 후 상정액을 적량 취하여 Chen 등(1965)의 방법을 이용하여 효소의 반응 결과 생성된 ortho P를 정량함으로써 활성도를 구하였다.

## 7. 전기영동

총 단백질의 양상을 비교하기 위하여 각 실험구의 세포를 원심분리하여 수확한 후 0.1 M Tris-HCl 완충용액 (pH 7.6), 1% Triton X-100을 가하여 초음파 파쇄한 후 Leammli(1970)의 방법에 따라 Tris-HCl 완충용액(pH 6.8), 1% SDS, glycerol, 2-mercaptoethanol, bromophenol blue를 가한후 가수분해시켜 전기영동 시료로 사용하였고, stacking gel 4%, separating gel 10%로 조제하여 15 mA에서 prerunning한 후, 30 mA로 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 후 발색은 Coomassie brilliant blue R-250을 사용하였다.

## 결과 및 고찰

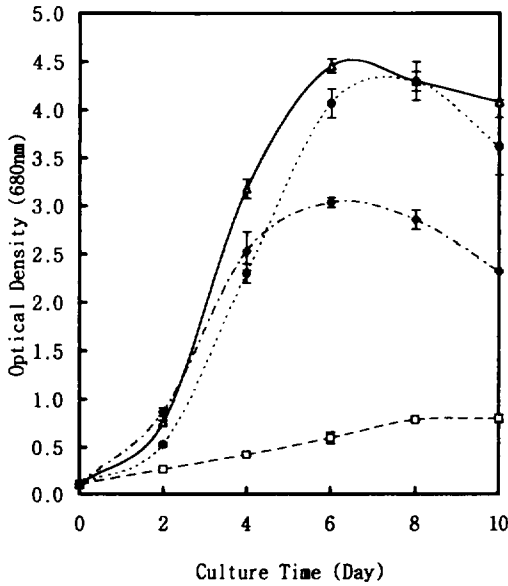
### 1. 인산농도가 세포 성장에 미치는 효과

Malate 배지에 인산을 농도별로 공급했을 때, *R. rubrum*의 성장에 미치는 영향은 Fig.1, Table 1에서 보는 바 같이 인산을 처리하지 않은 배지에서 생장이 저조하나 인산을 농도별로 처리한 배지에서는 높은 성장을 나타내고 있으며, 대개 2일째 유도기가 끝나고 6일째에 정지기에 도달하고 있었다. 인산이 제한된 배지, 인산을 정상적으로 처리한 배지,

**Table 1.** Content of orthophosphate of various phosphate compounds in *Rhodospirillum rubrum* grown anaerobically in the different concentrations of phosphate<sup>1)</sup> (units:  $\mu\text{g Pi}$  per 100mg of wet weight cell)

Media	Culture Days	O.D.(680nm)	Total P	Ortho P	Lipid P	Nucleotide P	Poly P		Total
							Acid soluble	Acid insoluble	
Pi 0%	0	0.10	137.3	44.0	3.1	13.6	10.6	66.0	76.6
	2	0.26	128.3	40.0	2.3	12.2	8.1	65.7	73.8
	4	0.42	112.3	35.7	1.5	10.9	6.2	58.0	64.2
	6	0.59	98.4	35.7	1.1	10.7	5.9	45.0	50.9
	8	0.73	93.0	32.4	2.3	9.3	5.0	44.0	49.0
	10	0.80	89.3	30.4	1.8	9.0	5.1	43.0	48.1
Pi 0.003%	0	0.10	137.3	44.0	3.1	13.6	10.6	66.0	76.6
	2	0.87	123.4	40.5	2.7	13.1	10.1	57.0	67.1
	4	2.53	130.2	43.5	1.2	13.6	9.5	62.4	71.9
	6	3.04	123.0	41.0	2.1	13.4	10.5	56.0	66.5
	8	2.86	116.2	39.0	2.5	11.5	9.2	54.0	63.2
	10	2.36	114.4	41.4	2.0	10.8	7.1	53.2	60.2
Pi 0.03%	0	0.10	137.3	44.0	3.1	13.6	10.6	66.0	76.6
	2	0.76	130.4	42.4	3.3	14.1	10.0	60.6	70.6
	4	3.18	144.4	47.5	2.4	15.2	9.4	69.9	79.3
	6	4.46	139.4	43.0	3.9	13.1	11.5	67.9	79.4
	8	4.31	124.0	41.6	2.6	12.9	10.3	56.6	66.9
	10	4.08	121.5	42.0	2.0	11.4	8.7	57.4	66.1
Pi 0.3%	0	0.10	137.3	44.0	3.1	13.6	10.6	66.0	76.6
	2	0.53	150.0	40.9	3.0	16.3	11.0	78.8	89.8
	4	2.30	197.7	45.2	2.5	17.5	10.9	121.6	132.5
	6	4.07	201.4	44.0	4.5	20.0	13.9	119.0	132.9
	8	4.30	194.6	43.0	2.7	18.4	12.5	118.0	130.5
	10	3.62	179.2	44.9	2.2	16.2	9.2	106.7	115.9

1) Data are mean values of 3 replicates.



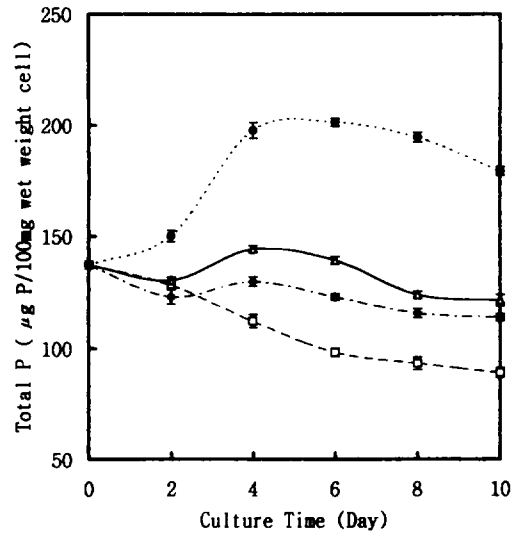
**Fig. 1.** Growth of *Rhodospirillum rubrum* cultured anaerobically in the different concentrations of phosphate (mean  $\pm$  standard error(SE); n=3). Pi 0% ( $\square$ ); Pi 0.003% ( $\blacklozenge$ ); Pi 0.03% ( $\triangle$ ); Pi 0.3%( $\bullet$ )

고농도로 처리한 배지에서 유도기 기간은 거의 같으나 지수기로 접어드는 시기는 다소 차이가 있다. 정지기에 이르는 시기는 비슷하나 성장량은 정상적으로 처리한 배지에서가 과다하게 처리한 배지에서 보다 다소 높게 나타났다. 이는 과다한 인산이 세포 성장을 저해하는 것으로 사료된다. 그리고 인산이 처리되지 않은 배지에서 아주 완만하게 성장하는 것은 세포외의 배지에 있는 인산량보다 세포내에 있는 인산량에 좌우된다고 사료된다. 이는 Toda 와 Yabe(1979)의 보고와 일치한다. 또한 Tsal(1979)이 *Azotobacter vinelandii* 를 재료로 한 연구에서 phosphate가 결여된 상태에서 세포의 단백질, 핵산합성, 초기의 성장율은 거의 영향을 받지 않는다는 보고와

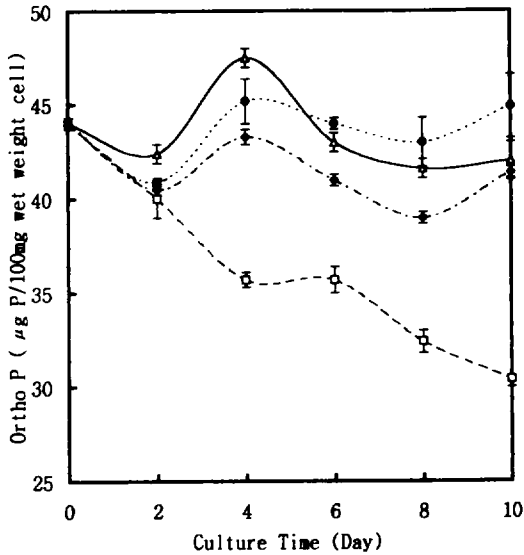
일치한다. 이는 세포분열이 daughter cell에 적량의 인산이 공급됨으로써 수행된다는 것과 그 적량의 인산을 공급할 수 있는 수준까지만 세포 분열을 계속하는 것을 나타낸다.

2. *R. rubrum*의 인산화합물 함량에 미치는 인산농도의 영향

인산농도에 따른 세포의 인산화합물의 함량 변화는 Fig.2-Fig.8, Table 1에서 보는 바와 같다. Total phosphate(total P)의 함량은 Fig.2에 나타나듯이 인산농도가 높을수록 현저히 높은 함량을 보이고 있으며, 인산을 처리하지 않은 배지에서는 전반적으로 함량이 감소하고 있다. 이는 외부의 인산원이 고갈된



**Fig. 2.** Total P content of *Rhodospirillum rubrum* cultured anaerobically in the different concentrations of phosphate(mean  $\pm$  standard error (SE); n=3). Pi 0% ( $\square$ ); Pi 0.003% ( $\blacklozenge$ ); Pi 0.03% ( $\triangle$ ); Pi 0.3%( $\bullet$ )



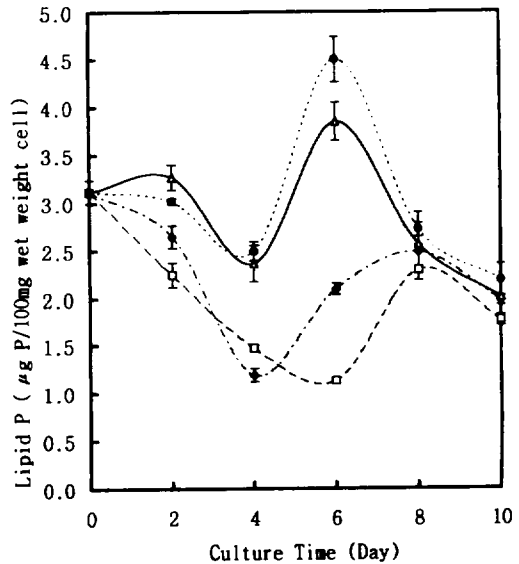
**Fig. 3.** Ortho P content of *Rhodospirillum rubrum* cultured anaerobically in the different concentrations of phosphate(mean  $\pm$  standard error [SE]; n=3), Pi 0% (□); Pi 0.003% (◆); Pi 0.03% (△); Pi 0.3%(●)

환경에 적응하기 위해 세포내의 인산을 이용한다는 것을 알 수 있다. 인산을 처리한 배지에서는 지수기에 많은 함량을 보이면서 정지기에 이르면 다소 감소하고 있는데, 이는 외부의 인산이 세포내로 흡수되어 세포내 유기물 합성에 이용됨을 알 수 있다.

Orthophosphate (ortho P)의 함량은 Fig.3에서 보듯이 대체로 인산농도가 높을수록 많은 함량을 나타내고 있다. 인산이 없는 배지에서는 지수기까지 급속히 감소하고 있으며, 인산을 처리한 배지에서는 지수기 초기에는 감소하다가 점차 증가하면서 지수기에 최대치를 보이고 있다.

Lipid phosphate (lipid P)의 함량변화는

Fig.4에서 보는 바와 같이 인산을 처리하지 않은 배지에서는 전반적으로 감소하고 있고, 인산을 처리한 배지에서는 2일째(유도기가 끝나고 지수기에 이르는 시기)보다 세포의 생장이 활발한 지수기에 급격하게 감소하다가 다시 정체기에 증가됨을 볼 수 있다. 이는 인지질이 세포구성물질중, 특히 세포막 등의 주요성분에 관여하므로 배양초에 합성되었던것이 세포분열이 왕성한 지수기에 공급되는 것으로 사료된다. Lipid P는 phosphate pool에서 인산공급으로 합성된다고 하였는데(Lee, 1967), lipid P의 함량변화를 볼 때 lipid P의 합성에 필요한 인산은 polyphosphate (poly P)에서 전환되는 것으로 사료된다.



**Fig. 4.** Lipid P content of *Rhodospirillum rubrum* cultured anaerobically in the different concentrations of phosphate(mean  $\pm$  standard error [SE]; n=3), Pi 0% (□); Pi 0.003% (◆); Pi 0.03% (△); Pi 0.3%(●)

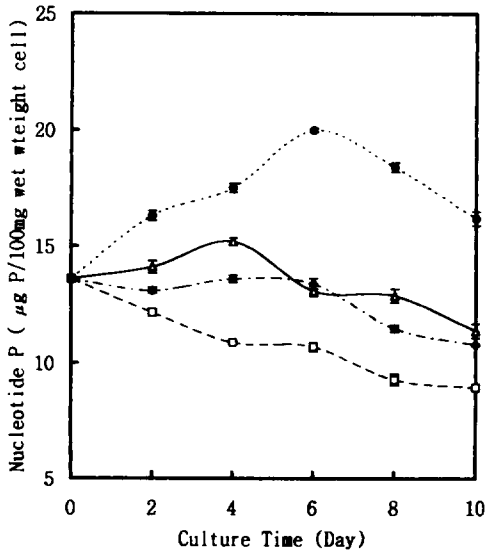


Fig. 5. Nucleotide P content of *Rhodospirillum rubrum* cultured anaerobically in the different concentrations of phosphate(mean  $\pm$  standard error [SE]; n=3), Pi 0% (□); Pi 0.003% (◆); Pi 0.03% (△); Pi 0.3%(●)

Nucleotide phosphate(nucleotide P)의 함량변화는 Fig.5에 보는 바와 같이 인산을 처리하지 않은 배지에서는 아주 완만하게 감소하고 있지만, 인산이 처리된 배지에서는 인산농도가 높을수록 높은 함량을 나타내고 있고, 배양시에 따라 증가하고 있다. 이를 poly P와 비교해볼 때 poly P가 감소하는 시기와 일치하여 poly P로부터 인산이 도입되고 있다고 사료된다. 핵산의 합성은 poly P의 합성을 억제하고, poly P의 분해를 자극한다는 Harold(1966)보고와 일치한다.

Acid soluble poly P의 함량변화는 Fig.6에 나타나듯이 인산을 처리하지 않은 배지에서는 전반적으로 배양시기에 따라 감소하고

있으며, 특히 인산을 처리한 배지에서는 인산농도가 높을수록 높은 함량을 나타내고 있다. 그리고 지수기에 감소하다가 정체기에 많은 양을 축적하고 있음을 알수 있다. 이는 생장율이 좋은 상태에서는 poly P 형성보다 다른 인산화합물로의 전환이 용이한 것으로 사료된다.

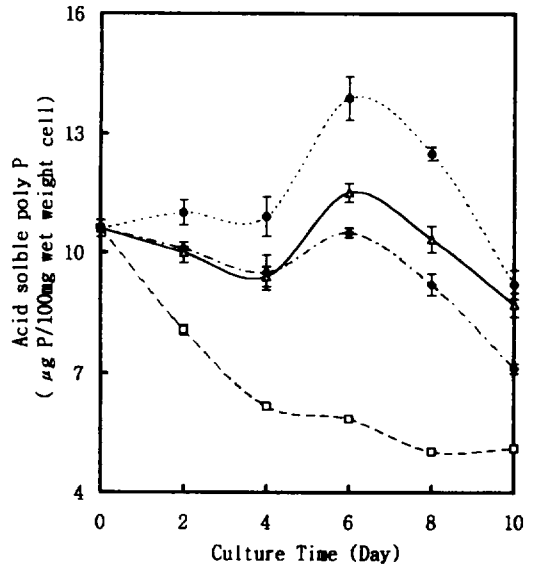


Fig. 6. Acid soluble poly P content of *Rhodospirillum rubrum* cultured anaerobically in the different concentrations of phosphate(mean  $\pm$  standard error[SE]; n=3), Pi 0% (□); Pi 0.003% (◆); Pi 0.03% (△); Pi 0.3%(●)

Fig.7은 Acid insoluble poly P의 함량변화를 나타내고 있는데, 인산이 처리되지 않은 배지에서 acid soluble poly P의 함량변화와 비교해 보면, 감소량이 완만하게 감소하고 있다. 이는 인산원이 없을 때 acid poly P가 먼저 분해되어 인산원으로 이용됨을 알 수 있다. 인산을 첨가한 배지에서는 인산농도가 높



을수록 많은 합성량을 나타내고 있다. 이는 acid soluble poly P는 대체로 분자량이 적고, 즉 poly P의 anhydride linked phosphate의 수가 적고 linear한 반면, acid insoluble poly P는 분자량이 크며, anhydride linked phosphate의 수가 많은 것으로 알려져있는데(Harold, 1962), acid insoluble poly P합성에 있어서는 에너지원 및 인산원이 밀접한 관련이 있다는 보고와 일치함을 보이고 있다(Choi, 1981). 그리고 acid insoluble poly P는 배양시기중 지수기에 최대합량을 보이며 정지기에 이르러 감소하고 있다. Acid soluble poly P와 insoluble poly P의 합량을 비교해보면, acid insoluble poly P의 합량이 많게 나타

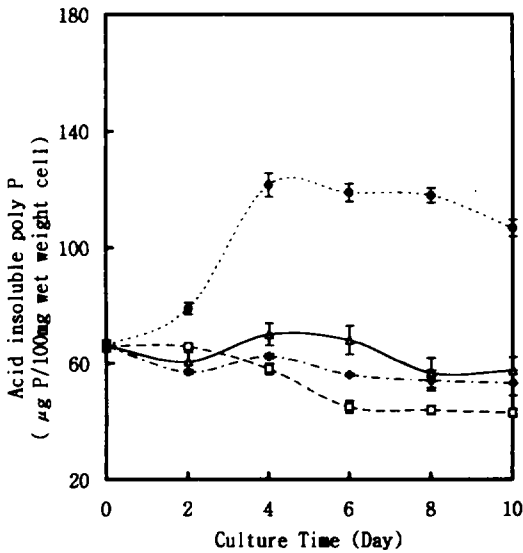


Fig. 7. Acid insoluble poly P content of *Rhodospirillum rubrum* cultured anaerobically in the different concentrations of phosphate(mean  $\pm$  standard error(SE); n=3), Pi 0% (□): Pi 0.003% (◆): Pi 0.03% (△): Pi 0.3%(●)

났는데, 이는 Weber(1965), Kulaev 등(1974)과 Oh and Lee(1987)의 보고와 일치한다.

Total poly P의 합량변화는 Fig.8에서 보는 바와 같이 인산농도에 따라 높은 합량을 보이고 있으며, 인산이 처리되지 않은 배지에서는 감소하고 있다. 인산을 처리한 배지에서는 정지기에 최대 합량을 보이고 있다.

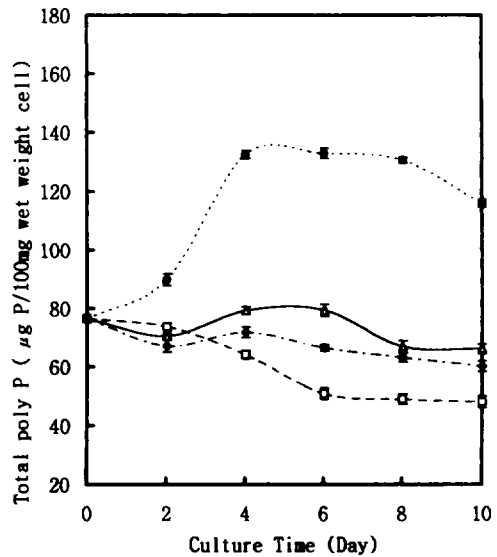


Fig. 8. Total poly P content of *Rhodospirillum rubrum* cultured anaerobically in the different concentrations of phosphate(mean  $\pm$  standard error(SE); n=3), Pi 0% (□): Pi 0.003% (◆): Pi 0.03% (△): Pi 0.3%(●)

### 3. 효소의 활성도에 미치는 인산농도의 영향

인산농도가 alkaline phosphatase의 활성에 미치는 효과는 Fig.9에 나타나 있다. 인산이 처리되지 않은 배지에서는 배양시기에 따라 점차 증가하다가 정지기에 이르러 최대의 활성을 보이고 있으며, 인산이 처리된 배지에

서는 활성이 거의 나타나지 않았다. 이는 alkaline phosphatase가 인산에 의해 억제됨을 나타내는 것으로 해석된다.

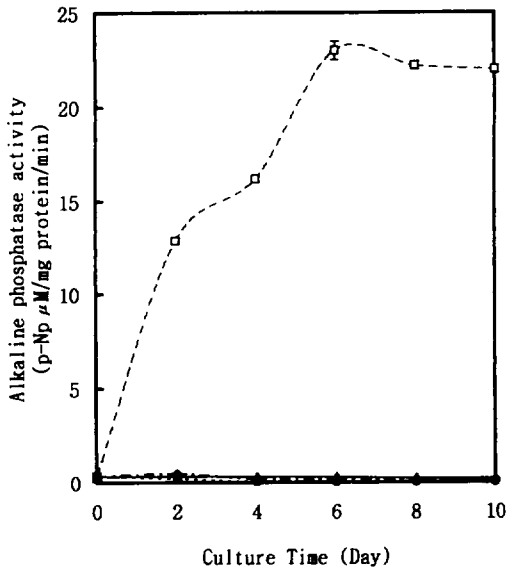


Fig. 9. Alkaline phosphatase activity of *Rhodospirillum rubrum* cultured anaerobically in the different concentrations of phosphate(mean  $\pm$  standard error(SE); n=3), Pi 0% ( $\square$ ); Pi 0.003% ( $\blacklozenge$ ); Pi 0.03% ( $\blacktriangle$ ); Pi 0.3% ( $\bullet$ )

Tripolyphosphatase와 polyphosphatase의 활성은 Fig. 10과 Fig. 11에서 보는 바와 같이 인산이 처리되지 않은 배지에서 tripolyphosphatase는 전반적으로 활성이 증가하고 있는데, 정지기 초기에 최대의 활성을 보이다가 정지기 중반부터 다시 감소하고 있음을 보여 주고 있고, polyphosphatase의 활성은 정지기에 최대의 활성을 보이다가 정지기 이후부터 급속하게 감소하고 있다. 인산이 첨가된 배지에서는 인산농도에 따라 다소

차이는 있지만, tripolyphosphatase인 경우는 2일째에 다소 증가하다가 지수기에 감소하고 있다. 그리고 정지기에 이를수록 활성이 다시 증가하고 있으며, polyphosphatase는 2일째에 다소 활성을 나타내다가 지수기에 감소하고 있다. 그리고 정지기에 이르러 다시 활성을 나타내고 있음을 알 수 있었다. 이와 같이 인산이 첨가되지 않은 배지에서 배양될 때 특히 활성이 증가하는 repressible alkaline phosphatase와 인산농도에 관계없이 활성을 띠는 nonrepressible alkaline phosphatase 등 2가지 형의 alkaline phosphatase가 *E. coli*, 효모, *Neurospora crassa* 등에 존재한

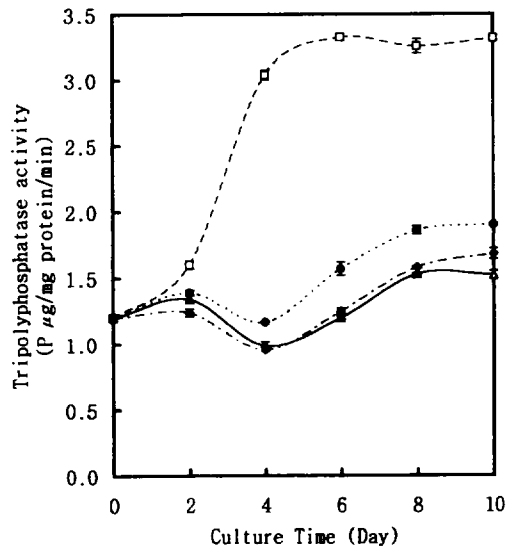
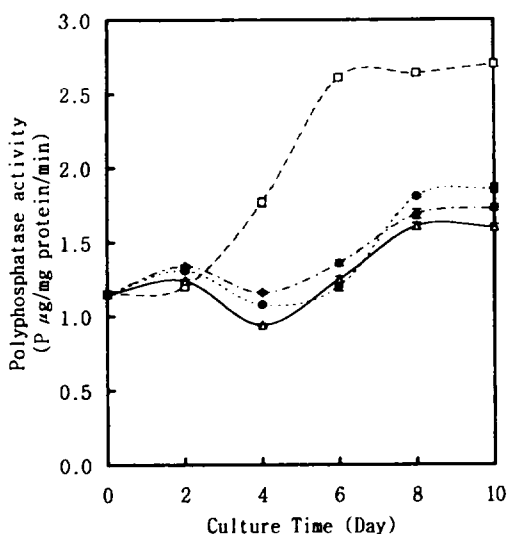


Fig. 10. Tripolyphosphatase activity of *Rhodospirillum rubrum* cultured anaerobically in the different concentrations of phosphate (mean  $\pm$  standard error(SE); n=3), Pi 0% ( $\square$ ); Pi 0.003% ( $\blacklozenge$ ); Pi 0.03% ( $\blacktriangle$ ); Pi 0.3% ( $\bullet$ )



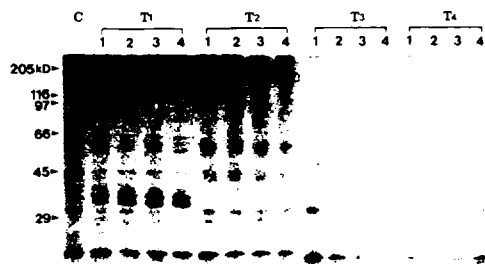
**Fig. 11.** Polyphosphatase activity of *Rhodospirillum rubrum* cultured anaerobically in the different concentrations of phosphate (mean  $\pm$  standard error[SE]; n=3). Pi 0% (□); Pi 0.003% (◆); Pi 0.03% (△); Pi 0.3% (●)

다고 하였는데(Nesmeyanova, et al., 1978; Attias and Bonnet, 1972; Kadner and Nye, 1969). 본 실험에서도 20배의 높은 alkaline phosphatase의 활성을 보였는바 이는 무기인산결핍에 의해 유도되는 repressible enzyme type으로 사료된다. Tripolyphosphatase, polyphosphatase와 poly P와의 상관관계를 비교해보면, 인산이 처리되지 않은 배지에서는 폴리인산이 감소하면서 효소의 활성이 증가하고 있었으며, acid soluble poly P의 함량이 급속하게 감소하는 지수기에 효소의 활성이 가장 높게 나타나고 있었다. 인산이 처리된 배지에서는 poly P의 함량이 증가하는 지수기에 효소의

활성이 감소하다가 poly P의 함량이 높은 지기에 이르러 효소의 활성이 증가하고 있는데, 이는 세포의 생장이 정지된 시기에 축적된 폴리인산을 인산원으로 이용하면서 세포내 인산의 고갈을 보충하기 위해 조절되는 것으로 사료된다. 이런 효소의 활성변화는 세포내의 poly P 축적량의 변화와 거의 일치한다 (Yoo et al., 1991; Park, 1992).

#### 4. 총 단백질 양상

*R. rubrum*세포에 대한 인산농도별 총 단백질의 변화 양상을 SDS-PAGE의 방법으로 조사한 결과는 Fig.12에 나타내고 있다. 인산이 없는 배지에서 성장한 세포에만 특이하게 나타나는 3개의 band를 관찰할 수 있었으며,



**Fig. 12.** SDS-PAGE patterns of total protein from *Rhodospirillum rubrum* cell grown in the different concentrations of phosphate. C, control; T<sub>1</sub>, Pi 0%; T<sub>2</sub>, Pi 0.003%; T<sub>3</sub>, Pi 0.03%; T<sub>4</sub>, Pi 0.3%; 1, 4 days; 2, 6 days; 3, 8 days; 4, 10 days.

분자량은 약 35kD, 40kD 그리고 63kD 정도였다. 그리고 약 29kD 부위의 band는 인

산이 제한된 배지에서 성장한 세포에만 나타나고 있음을 알 수 있었다. 인산농도별 배양 시기에 따라 총 단백질의 변화는 없는 것으로 나타났다. *R. rubrum* 세포는 이와 같이 외부 환경이 변할 때 단백질의 종류가 변한다는 것을 알 수 있으며, 이들 단백질의 대부분이 활성을 나타내는 효소, pore protein *phoE*, 인산 수송계에 관여하는 단백질이라는 관점에서 볼 때, 외부 환경에 따라 세포내부 환경 즉 물질대사과정에 많은 변화가 일어나고 있음을 암시해 준다고 하겠다.

## 적 요

인산농도의 차이에 따른 광합성 세균 *Rhodospirillum rubrum*의 인산대사에 대해 인산화합물의 함량 변화, 폴리인산의 축적량 및 이에 관련된 효소의 활성, 그리고 총 단백질 양상을 조사하였다.

인산이 처리되지 않은 배지(Pi 0%)에서는 생장이 매우 저조하고, 인산이 정상적으로 처리된 배지(Pi 0.03%)과 인산이 과다한 배지(Pi 0.3%)에서 매우 높은 생장을 나타냈다.

인산이 처리되지 않은 배지에서는 모든 인산화합물이 감소하였고, total phosphate와 polyphosphate의 함량은 인산이 제한된 배지(Pi 0.003%)와 인산이 정상적으로 처리된 배지에서 보다 인산이 과다한 배지에서 높은 함량을 나타냈다. 전반적으로 배지내에 인산농도가 높을수록 세포내의 모든 인산화합물의 함량이 높게 나타났다. 인산이 없는 배지에서 성장한 세포와 인산이 제한된 배지에서 성장한 세포에서는 lipid phosphate의 함량이 유사한 양상을 보였고, 산불용성 폴리인산의 함량은 인산이 제한된 배지와 인산이 정상적으로 처리된 배지에서 유사한 양상을 보였다.

Alkaline phosphatase, tripolyphosphatase와 polyphosphatase의 활성은 인산이 처리

되지 않은 배지에서 매우 높게 나타났으며, 특히 alkaline phosphatase의 활성은 인산이 처리된 배지에서는 거의 없었다.

전기영동에 의한 총단백질 양상을 보면, 인산이 처리되지 않은 배지에서 성장한 세포에서는 인산이 첨가된 배지에서 보이지 않은 3개의 새로운 band가 나타났다. 분자량은 약 35kD, 40kD 그리고 63kD로 추정할 수 있었다. 결론적으로 인산농도의 차이가 *Rhodospirillum rubrum* 세포의 생장과 세포내의 인산화합물 및 인산대사에 관련된 효소의 활성, 총단백질 양상에 영향을 미치고 있음을 알 수 있었다.

## 참고문헌

- Aiking, H., A. Tijman, C. Van Garderen, H. Van Heerikhuizen, and J. Van. Treit. 1984. Inorganic Phosphate Accumulation and Cadmium Detoxification in *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 growing in continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 374-377.
- Attaiz, J. and J. L. Bonnet. 1972. A specific alkaline p-nitrophenyl phosphate activity from baker's yeast. *Biochim. Biophys. Acta.* 268: 442-425.
- Bonting, C. F. C., H. W. Van Veen, A. Taverne, G. F. F. Kortstee, and A. F. B. Zehndef. 1992. Regulation of polyphosphate metabolism in *Acinetobacter* strain 210A grown in carbon- and phosphate-limited continuous culture. *Arch. Microbiol.* 158: 139-144.
- Bose, S. K., H. Gest, and J. G. Ormerod. 1962. Light-activator hydrogenase activity in photosynthetic bacterium: A permeability phenomenon. *J. Biol.*

- Chem. 236: 13-14.
- Chen, P. S. Jr., T. Y. Toribara, and H. Warner. 1956. Microdetermination of phosphorus. *Analy. Chem.* 26(11): 1756-1758.
- Choi, Y. K., K. S. Lee, C. S. Lee, and S. H. Cho. 1981. The effect of inorganic phosphate metabolism and the biosynthesis of organic compounds in yeast. *Bull. Environ. Science* 4: 57-76.
- Chrost, R. L. 1991. *Microbial enzymes in aquatic environments*. Springer-Verlag, New York.
- Ernst, S. A. 1975. Transport ATPase cytochemistry: ultrastructural location of potassium-dependent and potassium independent phosphatase activities in rat kidney cortex. *J. Cell. Biol.* 66: 584-608.
- Friedberg, I., and G. Aigad. 1968. Structures containing polyphosphate in *Micrococcus lysodeikticus*. *J. Bacteriol.* 96(2):544-553.
- Gonzalez, F., and J. Munoz., J. M. Arias, and E. Montoya. 1989. Polyphosphate and orthophosphate content during the life cycle of *Myxococcus coralloides* D. *FEMS Microbiology Letters.* 65: 105-108.
- Harold, F. M. 1962. Depletion and replenishment of the inorganic polyphosphate pool in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* 83: 1047-1057.
- Harold, F. M. 1966. Inorganic polyphosphate in *Biology: Structure, Metabolism, and Function*. *Bacteriological Reviews.* 30: 772-794.
- Kander, R. J., and J. F. Nyc. 1969. A repressible alkaline phosphatase in *Neurospora crassa*. III. Enzymatic properties. *J. Biol. Chem.* 244:5125-5129.
- Kulaev, I. S. 1979. *The Biochemistry of Inorganic Polyphosphates*. John Wiley & Sons Co. (Translated by R. F. Brookes.)
- Kulaev, I. S and G. I. Konoshenko. 1971. Detection and some properties of *Neurospora crassa* polyphosphate hydrolyzing inorganic polyphosphates to orthophosphate. *Biokhimiya.* 36: 1175-1182. (English Translation)
- Kulaev, I. S., A. Shadi, and S. E. Mansurova. 1974. Polyphosphates of phototrophic bacteria *Rhodospirillum rubrum* under different cultivation conditions. *Biokhimiya.* 39(3): 656-661. (English Translation)
- Lowry, O. M., N. J. Rosenbrough., A. I. Farr and R. J. Randall. 1951. protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Leammli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature.* 227: 680-685.
- Lee, K. S., and Y. K. Choi. 1985. Studies on the activities of ALPase, ACPase, ATPase and accumulation of volutin granules upon growth phase in *Saccharomyces uvarum*. *Kor. J. Microbiol.* 23: 84-89.
- Lee, K. S., S. W. Kang, Y. H. Kim, E. A. Kim, K. H. Kim, and Y. K. Choi.

1990. Cadmium detoxification mechanism of Cd-resistant *Bacillus* sp. isolated from industrial sewage. *Kor. J. Limnol.* 2: 115-127.
- Lee, K. S., Y. H. Kim, Y. S. Park, and Y. K. Park. 1995. Physiobiochemical detoxification mechanism against cadmium in *Rhizopus oryzae*. *Kor. J. Mycol.* 23: 71-79.
- Lee, Y. N. 1967. Incorporation of phosphate into protein and other nitrogenous compounds in *Chlorella* cells. *Kor. J. Microbiol.* 5: 19-26.
- Nesmeyanova, M. A., A. D. Dmitriev, and I. S. Kulaev. 1974. The regulation of phosphorus metabolism and the level of polyphosphates in *Escherichia coli* K-12 by exogenous orthophosphate. *Mikrobiologiya.* 43: 227-234. (English Translation)
- Nesmeyanova, M. A., A. D. Dmitriev, and I. S. Kulaev. 1978. Interrelationships of metabolic and genetic regulation of alkaline and acid phosphatases in *E. coli* cells. *Biokhimiya.* 43: 1783-1789. (English Translation)
- Oelze, J. and W. Pahlke. 1976. The early formation of the photosynthetic apparatus in *Rhodospirillum rubrum*. *Archive of Microbiology.* 108: 281-285.
- Oh, D. C. and H. S. Lee. 1987. Polyphosphate formation from pyrophosphate in intact cells of a photosynthetic bacterium, *Rhodospirillum rubrum*. *Plant Cell Physiol.* 28(3): 495-502.
- Park, Y. S. 1992. Studies on the phosphate response in *Chlorogloea fritschii*. Ph.D. Thesis. Hanyang Univ.
- Rubtsov, P. M., and I. S. Kulaev. 1976. Some pathway of polyphosphate biosynthesis and degradation in *Acetabularia mediterranea*. *Biokhimiya.* 42(6): 1083-1089. (English Translation)
- Seeger, M. and A. Jerez. 1993. Phosphate-starvation induced changes in *Thiobacillus ferrooxidans* FEMS *Micrbiol. Letter.* 108: 35-42.
- Thore, A., D. L. Keister, and A. San Pietro. 1969. Studies on the respiratory system of aerobically(dark) and anaerobically(light) grown *Rhodospirillum rubrum*. *Arch. Mikrobiol.* 67: 378-396.
- Toda, K. and I. Yabe. 1979. Mathematical model of cell growth and phosphatase biosynthesis in *Saccharomyces carlsbergensis* under phosphate limitation. *Biotech. and Bioengin.* 21: 487-502.
- Tsal, T. C., S. L. Aladegbami and G. R. Vela. 1979. Phosphate limited culture of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 139: 639-645.
- Tomassen, J. and B. Lugtenberg. 1982. Pho-regulon of *Escherichia coli* K-12 : a minireview. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur).* 133A: 243-249.
- Weber, H. 1965. Über das Vorkommen von Kondensierten Phosphaten in Purpurbakterien. *Z. Allg. Mikrobiol.* 5: 315. (Recited from Kulaev, I.S., 1979)
- Weinstein, B. I. and H. C. Li. 1976. Stimulation of chromatin template activity by the physiological macromolecule polyphosphate: A

possible mechanism for eukaryotic gene degeneration. Arch. Biochem. Biophys. 175: 114-120.

Wynne, D., and T. Bergstern Ben-Dan. 1995. The effect of light and phosphate concentrations in phosphatase activities of the photosynthetic bacterium *Chlorobium* spp. Can. J. Microbiol. 41: 278-283.

Yoo, S. A., K. S. Lee and Y. S. Park.

1991. A cytochemical study on the energy-storage system including poly- $\beta$ -hydroxybutyrate and polyphosphate in blue alga *Chlorogloea frischii*. Kor. J. Phycol. 6: 193-202.

Zeib, U. 1983. On the allosteric regulation of polyphosphate metabolism in *Oscillatoria redekei*. Naturwissenschaften. 70: 617-618.