

광합성 기구 조작을 통한 비유황 자색 광합성 세균, *Rhodobacter sphaeroides*의 생산성 증대

The improvement of productivity of a photosynthetic purple bacterium, *Rhodobacter sphaeroides* by manipulating the photosynthetic apparatus

김낙중, 이철균

인하대학교 공과대학 생물공학과

전화 (032) 865-7518, FAX (032) 872-4046

Abstract

The objective of this study was to investigate the effect of high content of light-absorbing pigments on overall photosynthetic efficiency in high density microalgal cultures. The light harvesting complex II (LHC II) regulating gene of *Rhodobacter sphaeroides*, photosynthetic purple bacterium, was removed to construct a mutant strain that had less pigment content. The mutant and wild type strains were cultured under various light intensity by adjusting the distance from the light source. The productivity of the mutant strain was higher at high light intensity (over $118 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$) compared with one of the wild type, and was lower at low light intensity ($34 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$). Especially, the concentration of LHC II⁻ mutant strain was 56% higher at $118 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$. The reduction of per cell pigment contents in the mutant strain lessened the degree of the mutual shading and thus enhanced the overall photosynthetic efficiency.

서론

광합성 세포는 어느 정도 농도가 넘는 고농도 배양에서 기질이 충분한 조건에서 도 빛이 limiting factor로 작용하여 생산성을 높이는데 어려움이 있다. 이는 광합성 세포가 빛을 과잉으로 흡수하여 광원으로부터 멀리 떨어진 세포에 빛이 도달하는 것을 차단하기 때문인데, 이를 상호그림자 효과(mutual shading effect)라 한다. Mutual shading effect는 광합성 세포의 고농도 배양에서 반드시 겪을 수밖에 없는 문제로, mutual shading effect의 감소는 곧 productivity의 향상을 가져오게 된다.
1-2)

광기구 조작을 통한 광 이용효율의 향상은 크게 두 가지 방향으로 생각할 수 있다. 하나는 세포내로 흡수된 빛 에너지를 효율적으로 화학에너지로 변환시키기 위해 에

너지 및 전자전달기구의 조작을 통해 비성장속도를 높이고자 하는 것이고⁴⁾, 다른 하나는 광합성세포의 빛 흡수량을 줄여 빛에너지를 투과시켜 보다 많은 세포에게 공급되도록 함으로써 과도한 빛 흡수에 의한 비효율성을 제거하는 것이다.

전자는 낮은세포농도나 저광도에서 후자는 고농도에서 효과적이라 믿어진다. 따라서 이를 알아보기 위하여 본 실험을 수행하였다.

광합성 세균은 광합성 기구가 간단하고 조작이 용이하여 광합성에서의 에너지 및 전자 수송 체계, 광기구의 구조 및 변형의 효과등을 밝히는 연구등에 널리 이용되고 있다.³⁻⁴⁾ 이중 비유황 자색 광합성 세균인 *Rhodobacter sphaeroides*는 혐기성 또는 미호기성 조건에서 광합성을 하며 *Rhodobacter capsulatus*와 함께 가장 잘 연구되어 있는 종의 하나이다.

비유황 자색 광합성 세균인 *Rhodobacter sphaeroides*의 광기구는 크게 광반응 중심체(reaction center, RC), light harvesting complex I (LHC I, B875 complex), light harvesting complex II (LHC II, B800-850 complex)로 이루어져 있으며, LHC I 과 광반응 중심체의 절대량은 광도가 낮을 때 모두 2배이상 증가되나, 그 비율은 광도에 관계없이 15:1~12:1로 유지된다. LHC II는 LHC I을 둘러싸고 있으며, 그 양은 광도에 따라 역관계로 매우 민감하게 조절된다. 또한 bacteriochlorophyll (Bchl)은 광도가 증가하면 빛에 의한 광분해가 일어나 광도가 증가함에 따라 감소하는 관계가 있다.⁴⁾

따라서, LHC II가 제거된 돌연변이 균주는 wild type에 비해 pigment 함량이 줄어들뿐 아니라 광도에 따른 pigment변화의 민감성이 상당히 약해져 이를 이용하면 mutual shading effect가 상당히 제거되어 생산성의 증대가 기대되었고, 본 연구는 LHC II⁻ mutant와 wild type의 생산성을 비교 연구하였다.

재료 및 방법

균주로는 비유황 자색 광합성세균인 *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 (wild type)와 *Rhodobacter sphaeroides* KDC (LHC II⁻ mutant)를 서강대학교 생명과학과로부터 제공받아 Sistrof's medium을 이용하여 pH 7에서 photoheterotroph로 배양하였다.

광원으로는 두 개의 20 W 형광등과 두개의 500 W halogen 램프가 광원에 따른 실험에 각각 사용되었고, 광원을 상하로 배치하여 거리에 따라 광도를 조절하였으며 광도의 측정을 위해 quantum sensor (model LI-190SA, LI-COR, Lincoln, NE, U.S.A.)를 사용하여 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 의 단위로 측정하였다.

배양용기로는 광원을 형광등으로 할 때 18 mL culture tube를 이용하였고, halogen 램프를 사용할 때는 혐기성조건의 유지와 sampling의 용이를 위해 50 mL glass syringe가 사용되었고, 온도는 29°C로 일정하게 유지되었다.

총 bacteriochlorophyll (total Bchl)과 carotenoid (total Crt)의 정량을 위해서는 시

료 1 mL를 취하여 2000 rpm에서 세포를 침전시키고 상등액을 제거고 아세톤, 메탄올(7:2)혼합용액 1 mL를 가하고 vortex로 분쇄한 후 10000 rpm에서 cell debris를 제거하였다. 이를 468, 775 nm에서 분광광도계로 흡광도를 측정하여 정량하였다. 세포농도는 형광등을 이용한 배양에서 흡광도를, halogen 램프를 이용한 배양에서는 Coulter Counter(model Z2, Coulter Electronics, Inc., Hialeah, FL, U.S.A.)를 이용하여 평균세포크기와 세포수를 측정하여 세포 총 부피(fL/mL)로 결정하였다.

결과 및 고찰

형광등을 광원으로 하는 실험에서는 두 개의 20 W 형광등을 이용하여 광도 $220 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 에서 배양하였을 때 mutant가 약 10% 높은 세포농도를 나타냄을 확인하였다. 그림1에서 볼 수 있듯 mutant의 낮은 비성장속도에도 불구하고 최종세포농도는 보다 높음을 알 수 있다. Pigment 함량 또한 30% 낮았다. 낮은 pigment함량을 가짐에도 비성장속도의 감소가 크지 않은 것으로 보아 적외선 영역의 빛을 많이 내는 광원을 이용하면 보다 큰 세포 농도의 차이를 보이리라 예상하였다. 광합성 세균의 배양에는 tungsten filament를 가진 램프가 주로 사용된다.⁵⁾

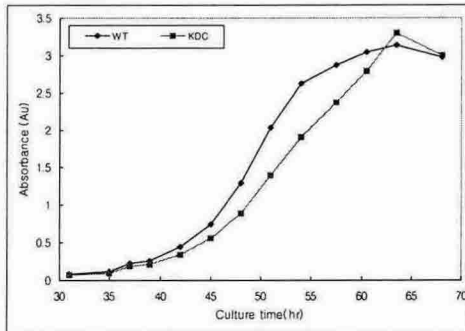
따라서, 적외선 영역의 빛을 많이 발산하는 halogen (500 W) 램프로 거리에 따라 광도를 조절하여 34, 118, 376 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 에서 wild type과 mutant의 성장속도와 세포농도를 관찰하고 각각의 pigment 변화를 측정하였다. 376 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 의 광도에서는 mutant의 세포농도가 조금 높으나 큰 차이는 없었고, 118 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 에서는 mutant가 56% 높은 세포농도를 보였다. 34 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 에서는 wild type이 보다 높은 세포농도를 나타내었다. 고광도에서는 BChl의 광분해가 일어나는 것으로 보고되어 있으므로 고광도에서의 낮은 비성장속도는 클로로필의 광분해 때문이라 여겨진다. 118 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 에서는 상대적으로 낮은 pigment함량을 보이면서도 높은 비성장속도를 나타내어 높은 세포농도를 보였다. 높은 비성장속도로 인해 세포성장은 빠르면서도 pigment 함량은 낮아서 mutual shading effect가 감소하여 세포농도가 높아진 것으로 생각된다. 저광도에서는 wild type과 mutant 모두 pigment함량이 높았는데 비성장속도는 wild type이 보다 큰 것으로 보아 wild type의 LHC II를 포함하는 광기구가 저광도에 보다 효과적인 구조임을 알 수 있다.

본 실험을 통해 광합성 세균의 비성장속도의 감소를 최소화 또는 증가시키면서 pigment양을 줄이는 조작은 고농도 또는 고광도 조건하에서의 세포배양시 세포생산성 향상에 매우 유력한 방법임을 알 수 있었으며 이는 광도에 따라 크게 달라짐 알 수 있었다.

요약

광합성 홍색세균의 light harvesting complex II (LHC II)발현 유전자가 제거된 돌연변이종을 halogen 램프 하에서 거리에 따라 광도를 달리하며 배양하여 wild

type과 생산성을 비교한 결과 낮은 광도($34 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$)에서는 wild type가 높은 광도 ($376, 118 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$)에서는 mutant가 높은 세포농도를 나타내었다. 특히 $118 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 에서 LHC II⁻ mutant가 56% 높은 세포생산량을 보였다. 이는 세포내 pigment양의 감소로 mutual shading effect가 감소하였기 때문으로 판단되었다.



specific growth rate (hr^{-1})			
light intensity	34	118	376
Strain	($\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$)	($\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$)	($\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$)
wild type	0.175	0.217	0.171
mutant	0.142	0.249	0.114

그림 1. The growth curve of wild type and mutant cultured in the fluorescence lamp

표 1. The specific growth rate(hr^{-1}) of the wild type and mutant measured in low cell concentration ($<0.1 \text{ g/L}$)

참고문헌

1. Choul-Gyun Lee, "Calculation of light penetration depth in photobioreactors" (1999), *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 4, 78-81
2. Anatoly Gitelson, Hu Qiang, and Amos Richmond, "Photic volume in photobioreactors supporting ultrahigh population densities of the photoautotroph *Spirulina platensis*" (1996), *Applied and Environmental microbiology*, 62, 1570-1573
3. Wolfgang P. Barz, Francesco Francia, Giovanni Ventruoli, B. Andea Melandri, Andre Vermeglio, and Dieter Oesterhelt, "Role of the PufX protein in photosynthetic growth of *Rhodobacter sphaeroides*"(1995), *Biochemistry*, 34, 15235-15258
4. Robert E. Blankenship, Michael T. Madigan and Carl E. Bauer, "Anoxygenic Photosynthetic Bacteria" (1995), Kluwer Academic Publishers
5. Eiju Nakada, Yasuo Asada, Takaaki Arai, and Jun Miyake, "Light penetration into cell suspensions of photosynthetic bacteria and relation to hydrogen production" (1995), *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 80, 53-57