

Chlorobium limicola f. *thiosulfatophilum* NCIB 8327에서 분리한 Chlorosomes의 물리화학적 특성

나종욱 · 윤 환 · 강사육*

서울대학교 자연과학대학 미생물학과 서울대학교 분자미생물학연구소,
서울대학교 유전공학연구소

녹색황세균인 *Chlorobium limicola* f. *thiosulfatophilum* NCIB 8327로부터 광수확기구인 chlorosome을 초원심분리법으로 분리하여 그들의 물리화학적 특성을 조사하였다. Chlorosome은 Percoll self gradient에서 초원심분리하였을 때 약 1.05 g/cm³의 밀도인 것으로 측정되었다. UV-visible absorption spectra에 의한 분석결과, chlorosome은 세균엽록소(bacteriochlorophyll) *d*, chlorobactene 및 약간의 세균엽록소 *a*로 구성되어있음을 확인하였다. 분리된 chlorosome은 산성 조건에서보다 염기성 조건(pH>7)에서 더 안정하고, 0°C에서 80°C까지 온도에서는 안정하나 그 이상의 온도에서는 급격하게 파괴되었으며, 빛에 의해서도 쉽게 파괴되는 것을 확인하였다. 이러한 결과를 두고 볼 때, chlorosome에는 색소를 안정화시켜 주는 단백질이나 지질이 존재할 것으로 생각된다.

KEY WORDS □ bacteriochlorophyll, bacteriopheophytin, chlorobactene, chlorosome, density, light sensitivity, pH stability, temperature stability, spectrophotometry

녹색세균(green bacteria)은 자색세균(purple bacteria)에 비해 낮은 조도에서 선택적으로 배양되고, 조도에 의해서 색소형성이 조절되며, 조도가 낮아짐에 따라 세균엽록소(bacteriochlorophyll) *a*의 농도는 비교적 일정한데 비하여 세균엽록소 *d*의 농도는 증가한다고 보고된 바 있다(15, 16). Chlorosome은 녹색세균에 존재하는 광수확기구로서 녹색황세균(green sulfur bacteria)과 녹색비황세균(green nonsulfur bacteria)사이의 진화적 유연관계는 멀지만(8) Chlorobiaceae와 Chloroflexaceae에 공통적으로 존재한다. Chlorosome은 종에 따라 차이가 있지만, 평균 길이가 100 nm, 폭이 30 nm인 타원체로서 세포막의 안쪽에 단단하게 고정되어 있고(18), 그 밀도는 1.11 g/cm³로 알려져 있다(6). Chlorosome의 envelope는 두께가 3~5 nm인 단층지질막(lipid monolayer membrane)으로 이루어져 있고, chlorosome의 주요 색소는 세균엽록소 *c*, *d* 또는 *e*로서 반응중심당 약 1,000~2,000개의 세균엽록소가 존재한다고 보고된 바 있다(11). Chlorosome의 기능은 빛의 흡수 및 흡수된 빛의 excitation energy를 base plate에 존재하는 수용성 세균엽록소 *a*를 포함하는 단백질에 전달하여 최종적으로 막에 존재하는 반응중심에 전달하는 것이다(2).

지금까지 녹색세균의 chlorosome에 관한 연구는 Chlorobiaceae에 속하는 *Chlorobium limicola* f. *thiosulfatophilum* strain 6230(3, 4, 5, 9, 11, 18)과 고온성, 통기성 세균인 Chloroflexaceae에 속하는 *Chloro-*

flexus aurantiacus(3, 6, 7, 10, 15, 16, 18, 19, 20), *Prosthecochloris aestuarii*(1) 등을 중심으로 이루어져 왔다. Chlorosome의 구조에 관한 견해에는 색소와 단백질이 결합되어 있다는 단백질-색소 복합체 가설(6, 7, 9, 11, 20)과 단백질의 관여없이 색소만으로 복합체를 형성한다는 색소-색소 복합체 가설(10, 17)이 상호 대립되어 있는 실정이다.

본 논문에서는 *Chlorobium limicola* f. *thiosulfatophilum* NCIB 8327로부터 chlorosome을 분리하고 색소를 추출한 다음 물리화학적 특성분석을 통하여 chlorosome의 구조를 두 가지 주장의 관점에서 분석해 보고자 하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양

본 실험에 사용한 균주는 R. Sirevag (Department of Biology, University of Oslo, Norway)로부터 분양받은 *Chlorobium limicola* f. *thiosulfatophilum* NCIB 8327로서, Na와 Kang(12)이 제시한 계대배양용배지에서 30°C로 계대배양하였다. Chlorosome을 얻기위한 배지는 Na와 Kang(12)이 제시한 배지를 사용하였고, 질소원으로는 NH₄Cl이 사용되었다. 배양조건과 성장도 측정에는 Na와 Kang(13)의 방법이 사용되었다.

시약

고순도의 상업용 표준제품이 본 실험에서 시약으로

사용되었다.

Chlorosome의 분리

원심분리하여 얻은 균체를 세척용 완충용액(2 M NaSCN을 포함하는 10 mM Tris-HCl, pH 7.9)으로 두번 세척한 다음, 5배의 세척용 완충용액을 첨가하고 초음파발생기로 파쇄한 후 15,000×g에서 25분간 원심분리하여 얻은 상층액을 PM10 Amicon membrane으로 농축하였다. 이 때 안정한 chlorosome을 얻기 위한 조건을 정하기 위하여 경우에 따라 초음파발생기 사용시간을 조절하거나 sodium dodecylsulfate, Triton X-100 등, detergent를 첨가하기도 하였다. 특별한 경우 이외의 전과정이 4°C에서 처리되었다. 세포 추출액을 5%~20%~40%(W/V)의 sucrose step gradient를 사용하면서 L7-55 Ultracentrifuge(Beckman, U.S.A.)를 사용하여 4°C의 조건하에서 140,000×g로 15시간 동안 초원심분리(10)시켜 5%와 20% 사이의 띠(band)를 취한 다음, 시료를 20% (w/v) sucrose cushion으로 다시 1차와 똑같은 조건으로 원심분리하여 cushion 상단을 취한 다음, 1 mM Tris-HCl 완충용액에서 24시간 투석하여 냉동건조시켜 4°C의 냉암소에 보관하였다.

Chlorosome에서 색소의 추출 및 분리

분리된 chlorosome를 아세톤/메탄올(7:2) 용매에 녹인 다음, 원심분리하여 상층액으로부터 얻은 chlorosome 색소는 C-18 SEP-PAK Cartridge(Waters Co.)를 사용하여 70% 메탄올로 세척한 다음 100% 메탄올로 시료를 용출시켜 세균염색소 부분과 carotenoid 부분으로 분리하였다. 세균염색소 부분과 carotenoid 부분은 모두 Speed Vac concentrator(Savant Instruments, U.S.A.)으로 건조시킨 후 각각 100% 메탄올, 100% 아세톤에 녹여 분석용 고압액체 크로마토그래피(analytical HPLC)에 사용되었다. 분석용 고압액체 크로마토그래피(Waters, U.S.A.)는 μ Bondapak C-18 analytical column(3.9×300 mm, Waters, U.S.A.)을 사용하여, 세균염색소부분은 90% 메탄올과 10% 물의 혼합액으로, carotenoid부분은 95% 메탄올과 5% 물의 혼합액으로 각각 용출시켜, Diode-Array Spectrophotometer(Hewlett Packard, U.S.A.)로 분석하였다.

Bacteriopheophytin d의 제조

Braumann(1)의 방법에 따라 chlorosome에서 색소를 아세톤/메탄올(7:2)로 추출한 다음 상온에서 330 lux의 빛을 쬐어 세균염색소 d를 bacteriopheophytin d로 변화시켜 얻었다.

분광학적 특성분석

UV-Visible 흡수스펙트럼 측정에는 UV-VIS 265 spectrophotometer(Shimadzu, Japan)가 사용되었다. Circular Dichroism(CD) 스펙트럼 측정에는 Jobin-YVON CD6 spectrophotometer(Jobin-YVON, France)가 사용되어 상온에서 1초의 integration time으로 측정되었다.

Chlorosome의 안정성 측정

온전한 chlorosome의 특징적인 peak는 728 nm이

고, 파괴된 chlorosome의 특징적인 peak는 664 nm이므로, chlorosome의 안정성은 728 nm와 664 nm에서의 흡광도비(A_{728}/A_{664})로 측정되었다.

Chlorosome의 밀도 결정

Chlorosome의 밀도는 분리된 chlorosome을 0.15 M NaCl을 포함하는 Percoll용액(Pharmacia, Sweden)에서 SW 50.1로터(Beckman, U.S.A.)를 사용하여 75,000×g에서 40분간 초원심분리하여 결정하였다. 밀도의 확인을 위해 4가지의 density marker(orange, 1.033(g/ml); green, 1.048; red, 1.062; blue, 1.076)가 사용되었다.

Chlorosome에 대한 pH, 빛 및 온도의 영향

Chlorosome에 대한 pH의 영향은 0.1 M boric acid-citric acid-trisodium orthophosphate 완충용액 pH 4~10에 각각 넣고 4°C에서 8시간 처리한 후 앞에서 언급한 방법으로 측정하였다. Chlorosome에 대한 빛의 영향은 30°C, 330 lux의 빛에 노출되는 시간에 따른 chlorosome의 안정성을 10시간을 단위로 5일 동안 측정하였다. 시간을 고정된 경우의 chlorosome에 대한 온도의 영향은 빛투과를 차단한 시료를 0°C에서 100°C까지의 온도에서 4시간 처리한 후 측정하였다. 온도를 고정된 경우의 chlorosome에 대한 온도의 영향은 빛투과를 차단한 시료를 온도 100°C에서 8시간까지 처리한 후 측정하였다.

결과 및 고찰

온전한 chlorosome을 얻기 위한 세포파쇄의 조건

세포로부터 온전한 상태의 chlorosome을 얻기 위

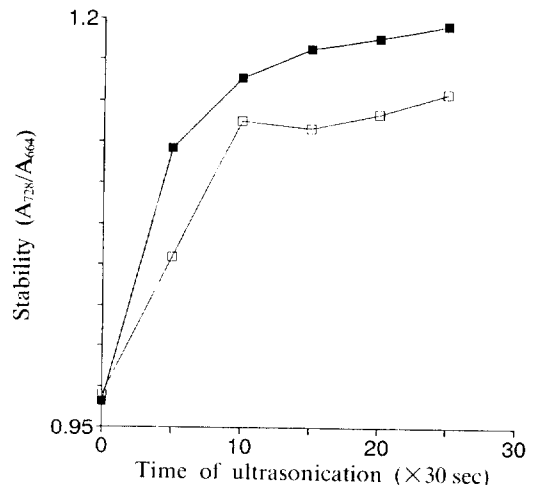


Fig. 1. Effect of NaSCN on the stability of chlorosomes estimated by UV-Visible absorption spectra during the purification. in the presence of NaSCN (—■—), in the absence of NaSCN (—□—).

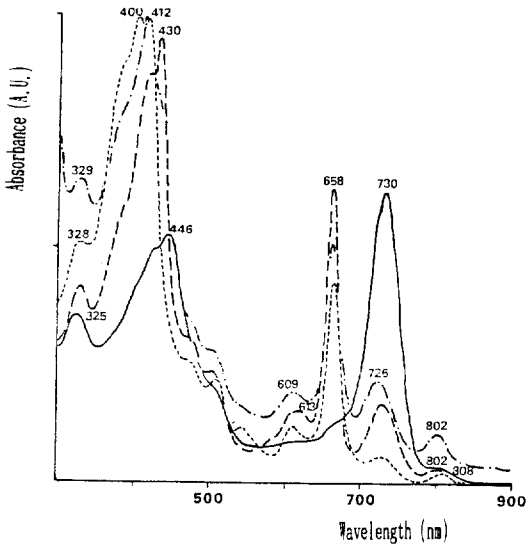


Fig. 2. Effect of detergents on the UV-Visible absorption spectra of the crude extracts. control (—), 0.3% SDS (---), 0.3% Triton X-100 (-.-), 60 mM n-hexanol (---).

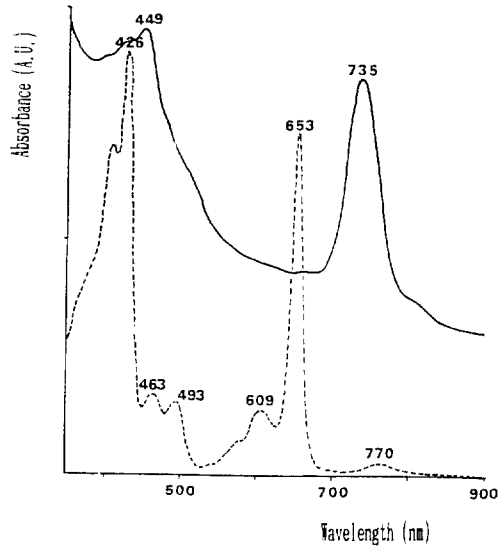


Fig. 3. UV-Visible absorption spectra of intact cells (—) and their acetone/methanol (7:2) extracts (---) of *Chlorobium limicola* f. *thiosulfatophilum* NCIB 8327.

Table 1. Optimal conditions of ultrasonication for the isolation of intact chlorosomes.

Time (sec)	near-IR band	Soret band
0	1.556 ^a (735 nm) ^b	1.611 (450 nm)
300	1.182 (732 nm)	1.016 (448 nm)
450	1.184 (730 nm)	0.907 (447 nm)
600	1.206 (729 nm)	1.025 (446 nm)
750	1.326 (728 nm)	1.163 (446 nm)

*a: absorbance, b: wavelength

해 stabilizing agent로 NaSCN을 사용하였을 때의 효과는 Fig. 1과 같다. 세포를 초음파로 파쇄한 다음 조사한 스펙트럼은 peak가 735 nm에서 728 nm까지 다양하였다. 이 중에서 chlorosome을 분리하는데 가장 적당한 조건은, 온전한 세포에 비해서 730 nm가 훨씬 큰 peak로 나타날 경우이며, 80 W에서 450초 동안 초음파 파쇄하는 경우가 가장 이상적이었다 (Table 1). 730 nm의 peak가 나타난 용액에 detergent를 처리하면 chlorosome이 깨져 Soret-band 쪽에서 다양한 peak들이 나타난다(Fig. 2). Triton X-100이 사용되면 430 nm에서 peak가 나타나고 413 nm 부근에서 shoulder가 생기는데 비하여, Sodium dodecyl sulfate(SDS)를 사용하면 412 nm와 402 nm에서 peak가 나타난다. 이것은 강한 detergent인 SDS가 색소체와 관련된 물질과 결합한 결과 때문이라고 생각된다. 반면, 1-hexanol은 중간의 모양을 나타낸다.

In vivo와 in vitro상태에서 chlorosome의 분광학적 특성

온전한 세포의 스펙트럼은 735 nm와 448 nm에서의 peak가 거의 같은 크기로 나타났지만, 아세톤/메탄올(7:2)로 추출하였을 때의 스펙트럼은 653 nm에 비하여 426 nm에서 나타나는 peak가 거의 2배의 크기를 보였는데(Fig. 3). 이러한 특징을 보이는 peak는 세균엽록소 d에 해당하고, 769 nm에서 나타나는 작은 peak는 세균엽록소 a에 해당한다(14). 초음파발생기로 파쇄된 세포파쇄액의 스펙트럼은 chlorosome의 특징적인 peak로 생각되는 730 nm의 peak가 446 nm의 peak보다 두드러지게 되며, 664 nm에서의 peak는 세균엽록소 d로부터 유도된 것이라고 추측되는 bacteriopheophytin d로 생각된다(Fig. 4b).

Chlorosome의 분리 및 분리된 chlorosome의 분광학적 특성

Chlorosome이 많이 함유된 세포파쇄액을 sucrose step gradient로 초원심분리하면 3개의 띠가 나타나는데 그 중에서 chlorosome은 5%와 20%(w/v) sucrose 사이의 띠에서 분리되었다. 나머지 띠는 짧은 파장쪽의 흡광도가 클 뿐만 아니라, 664 nm의 peak가 특징적인데 이중에서 664 nm의 peak는 bacteriopheophytin d로 생각된다. 이러한 결과는 *Chlorobium limicola* NCIB 6230 또는 *Chloroflexus aurantiacus*에서의 초원심분리에 의한 chlorosome의 순수 분리에 관한 보고(3, 5, 6, 7, 9, 19)와 일치하는 것으로, 5%와 20%(w/v) sucrose 사이 띠의 스펙트럼은 728 nm와 446 nm의 peak가 특징적으로 나타났으며 세포막에 특징적인 664 nm의 peak는 거의 나타나지

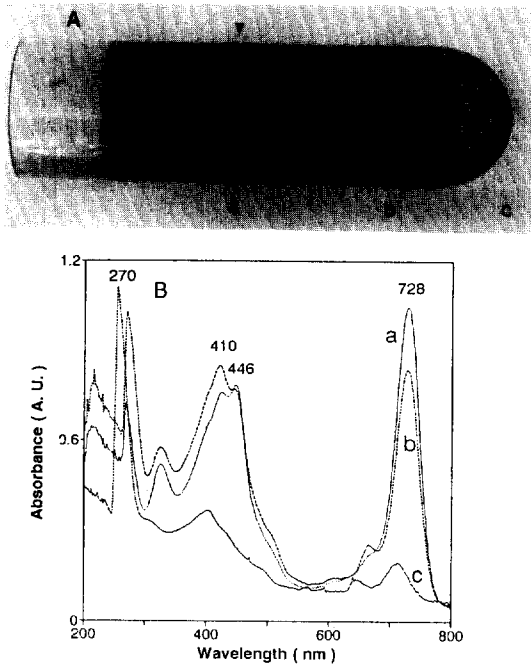


Fig. 4. UV-Visible absorption spectra of chlorosomes isolated by 5%/20%/40% (W/V) sucrose step gradient ultracentrifugation. a, membrane-free chlorosomes; b, membrane-bound chlorosomes; c, membrane fraction. (A) Photography of ultracentrifugation, (B) UV-Visible spectra.

않았다(Fig. 4). 또한 이것을 아세톤/메탄올(7:2)로 추출한 스펙트럼에는 crude extract로부터 추출한 것의 스펙트럼과 달리, 세균염록소 a에 해당되는 770 nm의 peak가 거의 보이지 않는 것으로 보아 여기에는 세균염록소 a가 거의 존재하지 않음을 알 수 있다(Fig. 5). 따라서 이런 결과를 보여 주는 때에는 chlorosome이 세포로부터 온전하게 순수분리되었다고 생각된다.

분리된 chlorosome의 CD-spectrum은 흡수스펙트럼을 한번 미분한 듯한 모양을 보여주고 있다(Fig. 6). 특히, NIR-CD spectrum의 positive와 negative band모양은 Brune 등(3)에 의해서 보고된 *Chlorobium limicola* NCIB 6230의 스펙트럼과 유사하지만, 세균염록소 c와 d의 차이 때문에 전체적으로 peak가 청색편이되어 있는 것 이외에는 거의 동일한 모양이었다. 그러나, 아세톤/메탄올(7:2)로 추출한 세균염록소 d의 CD-spectrum에는 위와 같은 모양이 나타나지 않았다. 이것은 세균염록소 자체는 chirality가 없지만 세균염록소 간에 상호작용할 때 chirality가 생기기 때문에 나타나는 현상이라 생각된다.

분리된 chlorosome의 밀도결정

본 균주의 chlorosome의 밀도는 Percoll self gra-

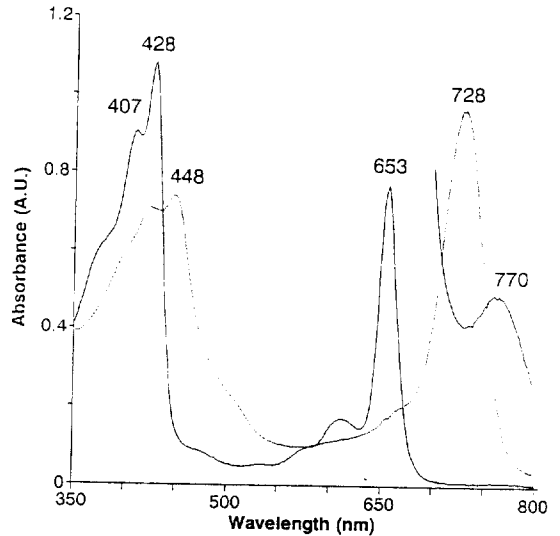


Fig. 5. UV-Visible absorption spectra of the isolated chlorosomes in acetone/methanol (7:2) extracts (—) and those in 10 mM Tris-HCl (---).

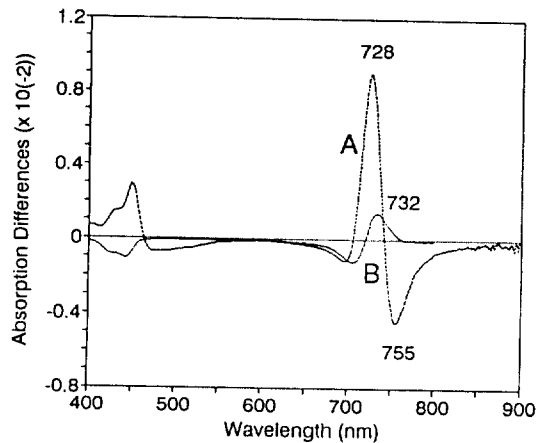


Fig. 6. Circular dichroism spectra of isolated chlorosomes (A) compared with bacteriochlorophyll d (B).

dient로 초원심분리에 의해서 1.048(g/ml)과 1.062(g/ml) 사이에 존재하므로 두 밀도사이가 선형이라면 1.049(g/ml)이 된다(Fig. 7). 이는 *Chloroflexus aurantiacus*에서의 chlorosome 밀도가 1.11 g/cm³(15°C)이라는 보고(6)와 약간의 차이가 있었다.

Chlorosome내 색소의 탐색

순수분리된 chlorosome의 색소를 C-18 analytical HPLC로 분석한 결과 세균염록소 d, bacteriopheophytin d, chlorobactene 순서로 용출되었다(Fig. 8). Carotenoid 부분은 3부분의 분획으로 용출되며 모두

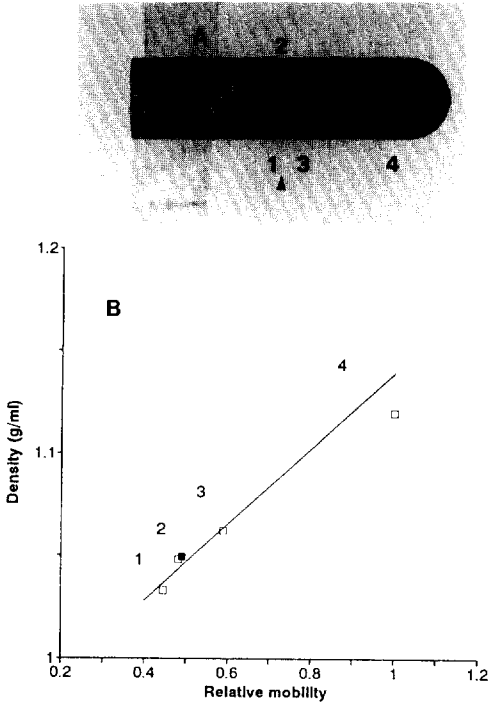


Fig. 7. Density of chlorosomes estimated by Percoll self density gradient ultracentrifugation using Percoll solution containing 0.15 M NaCl. 1. orange (1.033 g/ml); 2. green (1.048 g/ml); 3. red (1.062 g/ml); 4. blue (1.078 g/ml). (A) Photograph of ultracentrifugation. (B) Density estimation.

chlorobactene임(1)을 UV-VIS 흡수스펙트럼으로 확인하였다(Fig. 9). 세균엽록소는 빛에 의해 쉽게 bacteriopheophytin으로 변하는 성질이 있기 때문에(1) 여기서 발견된 bacteriopheophytin *d*는 chlorosome 내부에 존재하는 물질이라기 보다는 시료 준비과정에서 만들어진 물질로 생각된다. Chlorosome 색소의 HPLC profile에는 세균엽록소 *a*의 흔적을 찾아볼 수 없었던 것을 제외하곤 bacteriopheophytin *d*의 스펙트럼도 관찰되는 등 순수분리된 chlorosome의 분광학적 특성은 온전한 세포에서 추출한 색소의 것(Fig. 5)과 유사하였다.

Chlorosome에 대한 pH의 영향

pH 4~10 사이의 boric acid-citric acid-trisodium orthophosphate 완충용액으로 4°C에서 chlorosome을 pH 조건을 바꾸어 주면서 8시간 동안 처리한 다음 각각의 안정성을 조사한 결과, chlorosome은 중성 및 알칼리성 상태에서는 비교적 안정한 상태를 유지하지만, 산성상태에서는 매우 불안정한 상태로 변함을 알 수 있었다(Fig. 10). 즉, 이는 chlorosome이 산성상태에서 bacteriopheophytin *d*의 스펙트럼을

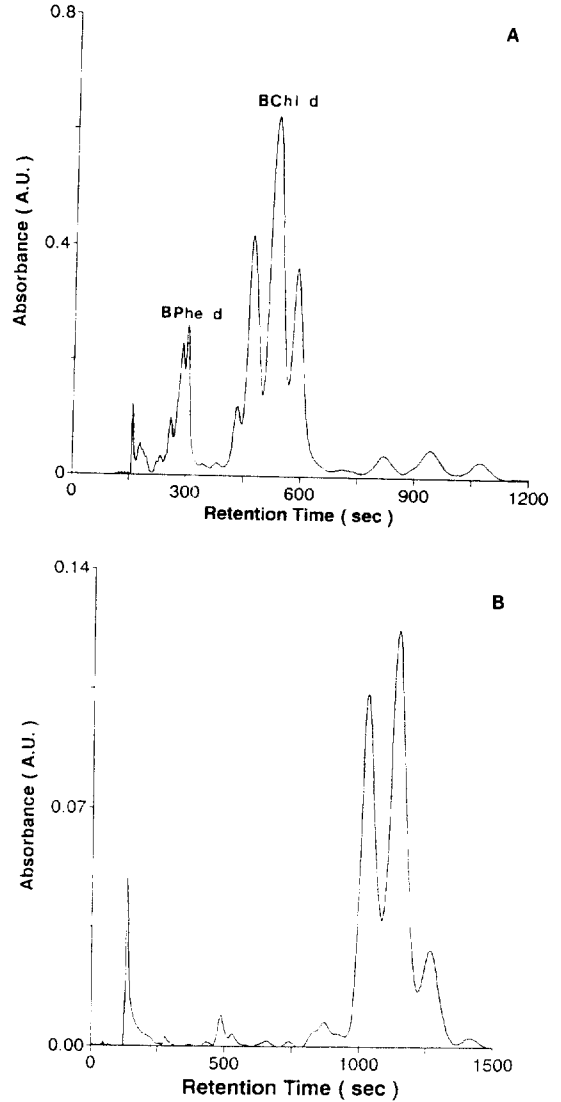


Fig. 8. HPLC profiles of pigments extracted from chlorosomes.

(A) bacteriochlorophyll moiety eluted by 90% methanol in water. (B) carotenoid moiety eluted by 95% methanol in water.

나타내는 것으로 보아 그를 구성하는 세균엽록소 *d*가 Mg^{2+} 이온을 잃어버리고 bacteriopheophytin *d*로 변화되었기 때문에 이를 중심으로 결합을 이루고 있던 세균엽록소간의 결합력이 와해되어 생긴 현상이라 볼 수 있으며, 이로부터 chlorosome의 안정성과 bacteriopheophytin의 생성은 서로 반비례의 관계에 있음을 추정할 수 있다.

Chlorosome에 대한 빛의 영향

Chlorosome은 빛을 수용하는 기구이지만 분리된

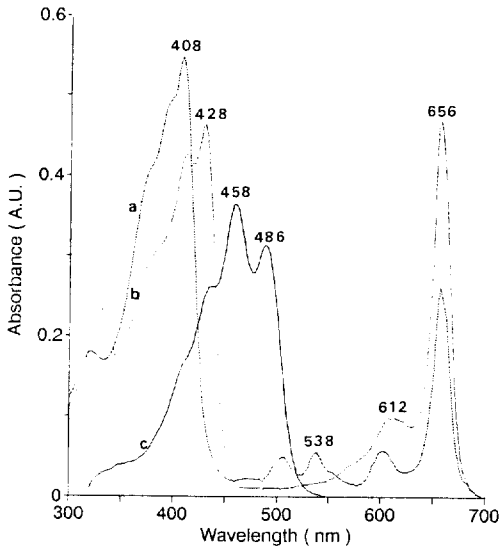


Fig. 9. UV-Visible absorption spectra of pigments purified by HPLC from chlorosomes. a. bacteriopheophytin d (---); b. bacteriochlorophyll d (----); c. chlorobactene (—).

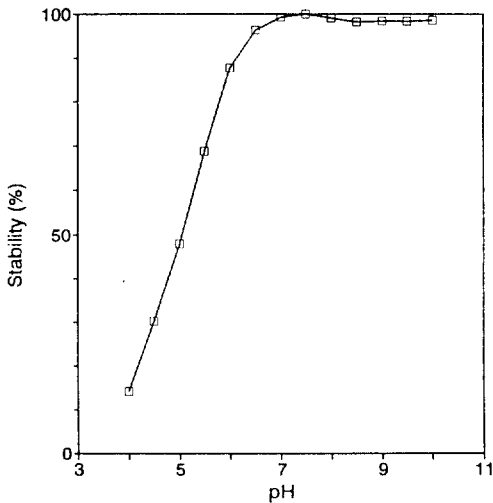


Fig. 10. pH stability estimated by peak ratio (A_{728}/A_{664}) of isolated chlorosomes which were preincubated at the indicated pH in 0.1 M borate-citrate-phosphate buffer for 8 hrs at 0°C.

chlorosome은 빛에 민감한 반응을 보여, 세포를 배양할 때와 똑같은 광조건에서 chlorosome의 안정성을 조사한 결과 8시간 정도 경과하면서부터 안정성이 심하게 파괴되기 시작하였다(Fig. 11). 이러한 결과는 산성상태에서의 안정성 파괴와는 그 양상이 크게 달랐다.

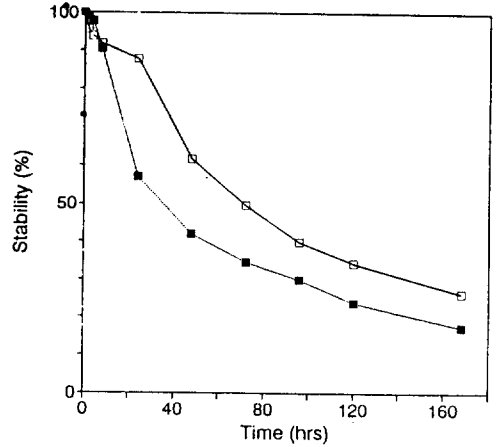


Fig. 11. Time dependent light stability estimated by peak ratio (A_{728}/A_{664}) of isolated chlorosomes under 330lux illumination at 30°C in 10 mM Tris-HCl (pH 7.9). low concentration of chlorosomes ($A_{728} = 0.45$, -□-), high concentration of chlorosomes ($A_{728} = 11.36$, -■-).

Table 2. Temperature dependent spectral change of isolated chlorosomes which were preincubated for 4 hrs at the indicated temperature.

Temperature (°C)	near-IR band (nm)	Soret band (nm)
0	728	446
20	728	446
40	727	446
60	726	446
80	722	446

Chlorosome에 대한 온도의 영향

0°C에서 80°C까지 온도를 올리면서 흡광도비로 측정된 chlorosome의 안정성은 파괴의 정도가 심하지 않았지만, 온도가 높아 질수록 스펙트럼 모양은 같은데도 불구하고 near-IR band가 최고 10 nm 정도 청색편이 되는 현상이 일어났다(Table 2). 이런 현상은 온도를 원상태로 내려도 회복되지 않는 것으로 보아 색소의 주위환경이 비가역적으로 변하기 때문에 나타난 것으로 판단된다. 또한 chlorosome은 Fig. 12에 나타난 것과 같이 안정성이 계속 유지되다가, 물이 끓는 온도에서 급격히 파괴되기 시작하였다. 이러한 결과는 단백질을 주성분으로 하는 효소에서는 보편적으로 일어나는 현상인 점으로 판단해 볼 때, 이것은 chlorosome내의 색소환경이 온도변화에 의해 회복 불능의 상태로 변화되었음을 시사하는 것으로 온도 변화에 민감한 단백질이나 지질이 고온에서 그의 구조가 파괴되어 활성이 관찰되었던 원래의 온도로 회복되었는 데도 본래의 역할이 회복될 수 없었다고

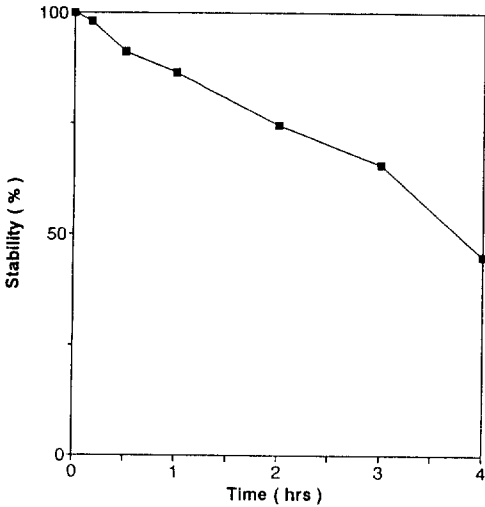


Fig. 12. Time-dependent temperature stability of isolated chlorosomes at 100°C in 10 mM Tris-HCl (pH 7.9) under dark condition.

가정하면, chlorosome에는 세균엽록소 부착단백질 (bacteriochlorophyll-binding protein)이나 지질이 존재함을 간접적으로 증명하고 있다.

지금까지 검토된 chlorosome의 구성을 보면, *Chlorobium limicola*에서 chlorosome의 구조에 관한 주장은 단백질-색소 복합체 가설(6, 7, 9, 11, 20)에 따라 세균엽록소 *c*가 주성분인 *Chlorobium limicola* NCIB 6230 위주로 전개되어 7.5 kd 단백질의 확인(9) 및 아미노산 염기서열이 보고(11)된 단계이지만, 본 글에서는 세균엽록소 *d*, chlorobactene 및 세균엽록소 *a*로 구성되어 있음을 순수분리된 chlorosome의 분광학적 특성분석을 통하여 확인하는 단계에 머물고 있으며, 본 논문에서는 chlorosome이 안정성을 유지하는 데는 구성단백질이나 지질이 존재해야 함을 밝히고 있다. 이러한 사실은 녹색세균의 chlorosome 구조에 관해서 본 글과 같은 중에 속하는 *Chlorobium limicola* NCIB 6230에서 7.5 kd의 단백질의 존재를 주장하는 Gerola 등(9)의 보고와 일치하는 것으로 이들이 분자생물학적인 방법으로 단백질의 존재를 밝힌 반면에, 본 논문에서는 물리화학적 방법으로 단백질의 존재 가능성을 밝혔는데 그 의의가 있다. 따라서, 앞으로의 실험에서는 일련의 인위적인 조작을 통하여 만들어진 chlorosome-like aggregate(복합체)의 생화학적 특성을 온전한 chlorosome의 것과 비교분석하여 단백질의 존재 가능성을 증명하고, 분자생물학적인 방법으로 단백질의 존재를 확인하는 연구가 요구된다.

사 사

초원심분리기와 Speed Vac concentrator의 사용에

도움을 주신 서울대학교 유전공학연구소 식물분자생물학 연구실의 홍주봉 박사님과 CD Spectroscopy의 사용에 도움을 준 서울대학교 기초과학교육연구 공동기기원의 관계자에게 감사드립니다.

본 연구는 한국과학재단 우수연구센터(서울대학교 분자미생물학연구센터) 연구비로 수행되었음.

참 고 문 헌

1. Braumann, P., H. Vasmel, L.H. Grimme, and J. Amesz, 1986. Pigment composition of the photosynthetic membrane and reaction center of the green bacterium *Prosthecochloris aestuarii*. *Biochim. Biophys. Acta.* **848**, 83-91.
2. Brune, C.D., G.H. King, A. Infosino, T. Steiner, M. L.W. Thewalt, and R.E. Blenkinship, 1987. Antenna organization in green photosynthetic bacteria: I. Oligomeric bacteriochlorophyll *c* as a model for the 740 nm absorbing bacteriochlorophyll *c* in *Chloroflexus aurantiacus* chlorosomes. *Biochemistry* **26**, 8644-8652.
3. Brune, D.C., P.D. Gerola, and J.M. Olson, 1990. Circular dichroism of green bacterial chlorosomes. *Photosynth. Res.* **24**, 253-263.
4. Causgrove, T.P., D.C. Brune, R.E. Blenkinship, and J.M. Olson, 1990. Fluorescence lifetimes of dimers and higher oligomers of bacteriochlorophyll *c* from *Chlorobium limicola*. *Photosynth. Res.* **25**, 1-10.
5. Dorssen, R.D., P.D. Gerola, J.M. Olson, and J. Amesz, 1986. Optical and structural properties of chlorosomes of the photosynthetic green sulfur bacterium *Chlorobium limicola*. *Biochim. Biophys. Acta.* **848**, 77-82.
6. Feick, R.G., M. Fitzpatrick, and R.C. Fuller, 1982. Isolation and characterization of cytoplasmic membrane and chlorosomes from the green bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. *J. Bacteriol.* **150**, 905-915.
7. Feick, R.G., and R.C. Fuller, 1984. Topography of the photosynthetic apparatus of *Chloroflexus aurantiacus*. *Biochemistry* **23**, 3693-3700.
8. Fox, G.E., Sackebrandt E., Heyall R.B., Gibson J., Maniloff J., Dyer T.A., Wolfe R.S., Balch W.E., Tanner R.S., Magrum L.J., Zablen L.B., Blakemore R., Gupta R., Bonen L., Lewis B.J., Stahl D.A., Chen K.N. and Woese C.R., 1980. The phylogeny of prokaryotes. *Science* **109**, 457-463.
9. Gerola, P.D., and J.M. Olson, 1986. A new bacteriochlorophyll *a*-protein complex associated with chlorosomes of green sulfur bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* **848**, 69-76.
10. Griebenow, K., A.R. Holzworth, and K. Schaffner, 1990. The 5.6-kilodalton protein in isolated chlorosomes of *Chloroflexus aurantiacus* strain Ok11 is a degradation product. *Z. Natur.* **45c**, 823-828.
11. Hojrup, P., P. Gerola, H.F. Hansen, J.M. Mikkelsen, A.E. Shahed, J. Knudsen, P. Rosestorf,

- and J.M. Olson, 1991. The amino acid sequence of a major protein component in the light harvesting complex of the green photosynthetic bacterium *Chlorobium limicola* f. *thiosulfatophilum*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1077**, 220-224.
12. Na J.-U., and S.-O. Kang, 1993. Factors affecting hydrogen evolution in *Chlorobium limicola* f. *thiosulfatophilum* NCIB 8327. *Kor. J. Microbiol.* **30** (6), 553-557.
 13. Na J.-U., and S.-O. Kang, 1993. Light-dependent hydrogen production in *Chlorobium limicola* f. *thiosulfatophilum* NCIB 8327; a possibility of regulation via glutamine synthetase. *Kor. J. Microbiol.* **30**(6), 558-563.
 14. Oelze, J., 1985. Analysis of bacteriochlorophylls. *Methods in Microbiol.* **18**, 257-284.
 15. Oelze, J., and R.C. Fuller, 1987. Growth rate and control of development of the photosynthetic apparatus in *Chloroflexus aurantiacus*. *Arch. Microbiol.* **148**, 132-136.
 16. Oelze, J., 1992. Light and oxygen regulation of the synthesis of bacteriochlorophylls *a* and *c* in *Chloroflexus aurantiacus*. *J. Bacteriol.* **174**, 5021-5026.
 17. Smith, K.M., and L.A. Kehres, 1983. Aggregation of the bacteriochlorophyll *c*, *d*, and *e*: Model for the antenna chlorophylls of green and brown photosynthetic bacteria. *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 1387-1389.
 18. Schmidt, K., 1980. A comparative study on the composition of chlorosomes (chlorobium vesicles) and cytoplasmic membranes from *Chloroflexus aurantiacus* strain OK-fl and *Chlorobium limicola* f. *thiosulfatophilum* strain 6230. *Arch. Microbiol.* **124**, 21-31.
 19. Staehelin L.A., J.R. Golecki, R.C. Fuller, and G. Drews, 1978. Visualization of the supramolecular architecture of chlorosomes (chlorobium type vesicles) in freeze-fractured cells of *Chloroflexus aurantiacus*. *Arch. Microbiol.* **119**, 269-277.
 20. Wechsler, T., F. Suter, R.C. Fuller, and H. Zuber, 1985. The complete amino acid sequence of the bacteriochlorophyll *c* binding polypeptide from chlorosomes of the green photosynthetic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. *FEBS letter.* **181**, 173-178.

(Received January 21, 1993)

(Accepted February 6, 1993)

ABSTRACT: Physicochemical Characterization of Chlorosome Isolated from *Chlorobium limicola* f. *thiosulfatophilum* NCIB 8327

Jong-Uk Na, Hwan Youn and Sa-Ouk Kang* (Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Research Center for Molecular Microbiology, and Institute for Molecular Biology and Genetics, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea)

Physicochemical characteristics of chlorosomes isolated from *Chlorobium limicola* f. *thiosulfatophilum* NCIB 8327 were analyzed by means of UV-Visible spectrophotometer and CD-spectrophotometer. The density of the isolated chlorosomes were estimated to be 1.05 (g/cm³) by Percoll self gradient ultracentrifugation. Chlorosome consist of bacteriochlorophyll *d* and some chlorobactene, and little amount of bacteriochlorophyll *a*. Chlorosome is stable from 0 to 80°C and alkaline solution (above pH 7.0), but unstable in illuminated condition. From these results, it is suggested that some proteins or lipids may be essential for the stabilization of chlorosomes *in vivo*.