

Ubiquinone 생성 *Rhodopseudomonas capsulata* H161의 Carotenoid 색소에 관한 연구

이 은 속

경산대학교 한의예과

Studies on the Carotenoid Pigment of Ubiquinone Producing Strain *Rhodopseudomonas capsulata* H161

Eun-Sook Lee

Department of Preparatory Oriental Medicine, Kyungsan University

Abstract

The photosynthetic bacteria, *Rhodopseudomonas capsulata* H161, were grown anaerobically in the Modified Ormerod medium for 5 days. The optimum temperature and pH for growth and carotenoid pigment of the organism were observed at 30°C, and around pH 7.4, respectively. The optimum condition of producing the carotenoid pigment, light intensity 5,000 lux. The photosynthetic bacteria, *Rhodopseudomonas capsulata* H161, produced large amount of carotenoid pigment, which were identified to 4 carotenoid components containing; spheroidene, rhodovibrin, spirilloxanthin, lycopene.

Key words : *Rhodopseudomonas capsulata*, carotenoid pigment.

서 론

광합성 세균은 광합성 색소의 성질에 따라 자색세균과 녹색세균의 두 군으로 엄격히 구별된다^{1,6)}. 자색세균은 여러 종류의 carotenoid와 bacteriochlorophyll이라는 일종의 엽록소를 가지고 있다. 녹색세균은 chlorobium chlorophyll이라는 엽록소와 carotenoid를 가진다. 녹색세균은 Chlorobiaceae과에 속하는 절대 혐기성균이며 CO₂를 탄소원으로 하고 H₂S를 전자공여체로 하여 광합성을 한다.

광합성 세균은 식품공업분야에서 고농도의 유기 폐수를 폭기시키지 않는 상태에서 효율적으로 처리하여, 이때 생성되는 균체는 단세포 단백질의 형태로 고영양 식품이나 사료로 이용하고 있다⁷⁾. 또 광합성 세균으로부터 얻은 ubiquinone은 심장병, 고혈압, 근무력증 및 빈혈 치료에 유효하여 의학분야에서도 주목하고 있다. 특히 강심제로 사용되는 ubiquinone과 빈혈증 치료제인 vitamin B₁₂함량이 다른 생물 조직에 비하여 월등히

높기 때문에 광합성 세균의 유용성이 증가되고 있다.

광합성 세균에 다량 축적되어 있는 carotenoid색소는 천연색소 자원으로 식품공업의 식품착색, 제약공업의 당의 제피 색소 등으로 유망시 되고 있다^{8,9)}.

광합성 세균의 carotenoid색소 생합성 과정은 Fig. 1과 같다^{10,12)}. 광합성 세균은 혐기적 조건에서 carotenoid색소 생성과 생육이 이루어진다^{13,14)}.

본 연구에서는 ubiquinone생성 *Rhodopseudomonas capsulata* H161의 carotenoid색소 생성에 관하여는 최적 조건들을 검토하여 최대의 carotenoid 생성량을 얻고자 한다.

실험재료 및 방법

1. 균 주

한강유역의 폐수에서 채취한 시료에서 분리, 동정한 *Rhodopseudomonas capsulata* H161 을 사용하였다.

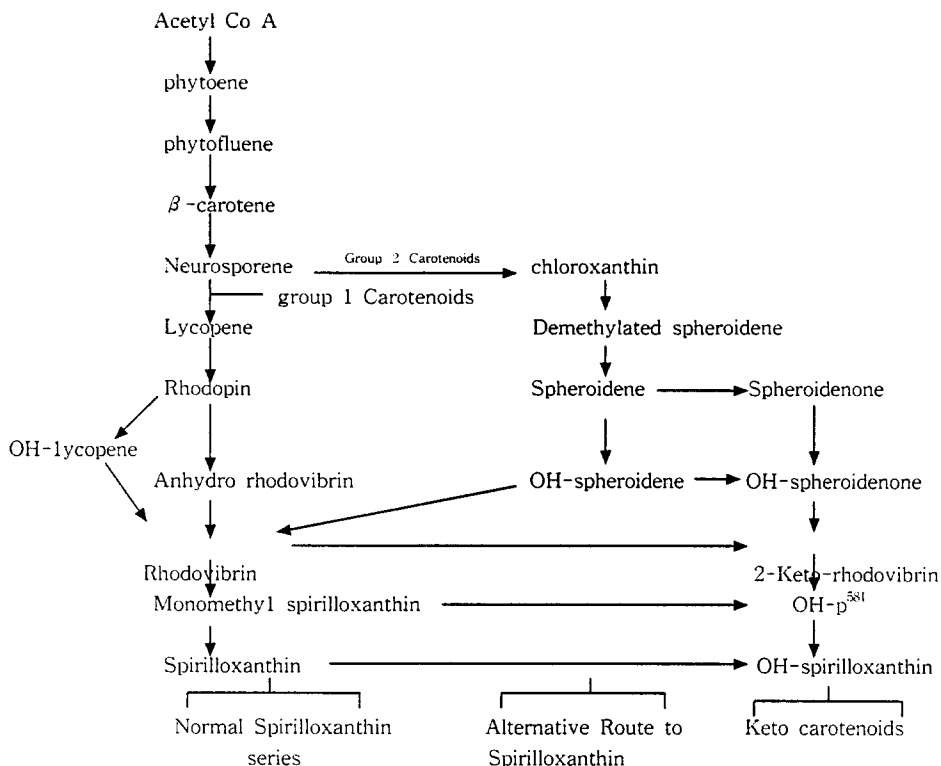


Fig. 1. Postulated pathway of carotenoids biosynthesis in photosynthetic bacteria.

Table 1. Classification of photosynthetic bacteria

Rhodospirillales	Rhodospirillineae	Rhodospirillaceae - <i>Rhodospirillum</i> <i>Rhodopseudomonas</i> , <i>Rhodomicrobium</i> .
		Chromatiaceae - <i>Chromatium</i> , <i>Thiospirillum</i> , <i>Thiocystis</i> , <i>Thiocapsa</i> , <i>Lamprocystis</i> , <i>Thiodictyon</i> , <i>Amoebobacter</i> , <i>Ectothiorhodospira</i> , <i>Thiosarcina</i> , <i>Thiopcdia</i> ,
	Chlorobiineae	Chlorobiaceae - <i>Chlorobium</i> , <i>Prosthecochloris</i> , <i>Pelodictyon</i> , <i>Clathrochloris</i> . Chloroflexaceae - <i>Chloroflexus</i>

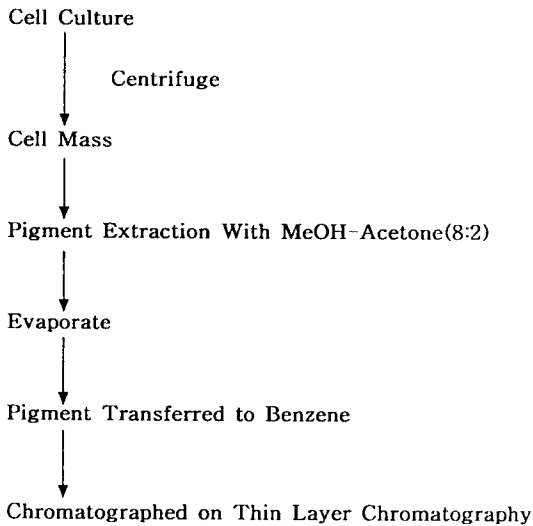
2.균주의 배양 및 균체의 회수

Table 2와 같은 조성의 배지 200ml를 Roux culture bottle에 넣고 선정된 광합성 세균을 접종, 30℃ 혐기적 광조건 상태에서 48시간 배양한 후 이것을 seed로 하여 inoculum size 5%로 접종, 혐기적 및 광조건 상태에서 5일간 배양하였다. 배양이 끝난 배양액을 660nm에서

O.D. 측정으로 균생장 측정후 8,000×g에서 10분간 원심분리하여(Hitachi 20PR-52 Automatic High Speed Refrigerated Centrifuge) 균체를 회수하고 생리 식염수로 2~3회 세척한 다음 균체를 동결건조하여 O. D.에 따른 건조균체량(dry cell weight :DCW)을 결정하였다. 빛의 공급은 40w 형광등을 좌, 우에 배치시켜 필요한 광도에 따라 일정한 거리를 유지시켜 가면서

Table 2. Medium composition for carotenoid formation by the isolated photosynthetic bacteria

Na-Malate	5 g /l
KH ₂ PO ₄	0.5
K ₂ HPO ₄	0.5
(NH ₄) ₂ · HPO ₄	0.8
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.04
MnSO ₄ · 4H ₂ O	0.004
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.005
Na-Glutamate	2.0
Yeast extract	1.8
pH 7.4	

**Fig. 2. Isolation procedure of carotenoid pigment of *Rhodopseudomonas capsulata* H161.**

공급하였다. 광도 측정은 Lux.Meter (Hitachi, LM, 24-TD)를 사용하였다. 일정온도의 제공을 위해서 항온실에서 생육최적 온도 및 일정한 배양온도를 조절한 뒤, 공급하였고, 배양기 용량의 전량에 해당하는 배지를 충전함으로써 혐기적인 배양상태를 유지했다.

3. Carotenoid의 추출 및 분리¹⁶⁾

원심분리된 균체를 MeOH-acetone(8:2)용액 중에 넣고 1시간 동안 교반하여 용출한 후 상정액을 따로 모으고, 한 번더 균체에 MeOH-acetone(8:2)을 가하여 용출된 액을 합한 다음 감압증류기로 감압농축하였다. 이 때 얻어진 색소를 벤젠에 용해시켜 TLC용 시료로 하였다.

TLC는 benzene-acetone(93:7)을 전개용매로 하였

으며, 분리되는 band를 acetone, n-hexane, EtOH 등의 용매로 용출하여 spectrophotometer에서 scanning한 후 표준 carotenoid와 비교 검토하였다. TLC는 silica gel 60G(Merk제품)를 20×20cm plate에 250μm 두께로 하여 TLC plate를 제조하여 사용하였다. Silica gel이 도포된 plate는 105℃로 조절된 항온 건조기에서 30분간 건조 및 활성화시킨 뒤 제습기에 보관 사용하였다. TLC를 통해 분리된 각 carotenoid 색소중 순수화를 요하는 경우는 TLC를 한번더 행하여 정제시켰다. 용제에 전이된 carotenoid색소는 N₂ 가스로 bubbling시켜 carotenoid 색소만 남게 하였다¹⁷⁾. Carotenoid 색소는 열, 빛, 산소 등에 민감하게 변화하므로 추출과정에서 TLC 정제까지 연속적인 실험을 행하였다.

4. Carotenoid 색소의 정량

Carotenoid 색소의 정량은 Cohen - Bazire의 방법¹⁸⁾을 이용하였고, 정량에 이용된 식은 다음과 같다.

$$X = \frac{Ey}{E^{1\%}_{1\mu m} \times 100}$$

X : g of carotenoid

y : ml of solution given on extinction

E : O. D. value

E^{1%}_{1μm} : Specific extinction coefficient

O.D. 값은 Baush & Lomb사 Spectronic 700으로 600~350nm, Hisens, Absorbance 0.00~0.200의 조건에서 측정하였다.

정량에 이용된 각 carotenoid 색소의 E^{1%}_{1μm}는 Table 3과 같다.

본 실험에서는 1,000ml 배양액에서 나온 건조균체의 g당 색소 생성량으로 환산정량하였다.

Table 3. Absorption maxima extinction coefficient of carotenoids

Carotenoids	E ^{1%} _{1μm}
Spheroidene	2,600
Rhodovibrin	2,700
Spirilloxanthin	2,470
Lycopene	3,450

Table 4. Identification of carotenoids of the selected strain H161 by TLC

R _f value	Absorption maxima (nm)						Content Identification	
	Acetone			n-Hexane				
0.43	518	486	460	514	480	455	+	Spirilloxanthin
0.50	518	486	460	514	480	455	++	Rhodovibrin
0.46	487	455	429	483	452	428	+++	Spheroidene
0.93	505	474	448	502	470	445	±	Lycopene

Carotenoids were extracted with methanol-acetone(3:1) from the living cells, and spotted on TLC plate of silica gel G60, then developed by benzene-acetone(97:3).

실험결과 및 고찰

1. Carotenoid색소 성분

Rhodospseudomonas capsulata H161을 5일간 배양한 후 생산된 균체로부터 carotenoid조성을 알기 위해 carotenoid 색소를 추출한 뒤 TLC 및 PPC¹⁹⁾에 의하여 전개한 후 분리되는 band를 모아서 가시영역의 흡수파장을 조사한 결과는 Table 4와 같다. 주된 carotenoid는 spheroidene이었으며 다음으로는 rhodovibrin이었고 spirilloxanthin도 소량 검출되었다. 따라서 본 균주는 carotenoid 생합성 경로는^{20,21)} alternative spirilloxanthin series임을 알 수 있다.

2. 빛의 광도에 따른 carotenoid 색소 생성

광합성 세균은 빛을 중심으로 성장하므로 광도에 따른 carotenoid 색소 생성을 조사하였으며 결과는

Table 5. Effect of light intensity on carotenoid formation by *Rhodospseudomonas capsulata* H161

Light intensity (Lux)	Cell growth (O. D. 660)	Carotenoid content ($\mu\text{g-dry wt. / l}$)
6,000	1.86	140
5,000	2.4	180
3,000	0.64	48
1,000	0.48	32

Cultivation : Temp. 30 , pH 7.4, anaerobic under light, 5 days.

Table 6. Effect of pH on the carotenoid formation by *Rhodospseudomonas capsulata* H161

pH	Cell growth (O. D. 660)	Carotenoid content ($\mu\text{g-dry wt. / l}$)
8.4	1.78	136
7.4	2.30	176
6.4	1.46	112

Cultivation : Temp. 30, anaerobic under light, 5 days.

Table 7. Effect of temperature on the carotenoid formation by *Rhodospseudomonas capsulata* H161

Temperature (°C)	Cell growth (O.D.660)	Carotenoid content ($\mu\text{g-dry wt. / l}$)
25	0.72	56
30	2.28	176
35	1.55	120

Cultivation : pH7.4, anaerobic under light, 5 days.

Table 5와 같다. 생육 최적 광도는 5,000Lux 였으며 전체 carotenoid 생성량도 5,000Lux가 최대였다.

3. pH에 따른 carotenoid 색소 생성

배지의 pH가 carotenoid 색소 생성에 미치는 영향에 대해 조사한 결과는 Table 6과 같다. 생육 최적 pH인 pH 7.4에서의 carotenoid색소 생성량은 균체 생산에 비해하였다.

4. 배양온도에 따른 carotenoid 색소 생성

배양온도가 carotenoid색소 생합성에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 7과 같다. 생육 최적 온도인 30°C에서 carotenoid 생성량이 최대치를 보였다.

요 약

Rhodospseudomonas capsulata H161에 다량 축적되어 있는, 천연 색소 자원으로 중요한 carotenoid 색소 생성조건을 검토하기 위하여 본 실험을 행하였다.

Rhodospseudomonas capsulata H161이 생성하는 주된 carotenoid는 spheroidene, rhodovibrin, spirilloxanthin, lycopene이었다. 본 균주는 anaerobic light, 온도 30°C, pH 7.4, 광도 5,000Lux에서 5일간 배양하였을 때 균체 생성과 carotenoid 생성량이 최대치를 보여주었다.

참고문헌

1. 星野 八洲雄 : 光合成細菌の分類. *發酵と工業*, **36**, 552 (1978).
2. Pfenning, N. : *Rhodopseudomonas acidophila*, Sp.N., a new species of the budding purple nonsulfur bacteria. *J. Bacteriol.*, **99**, 597 (1969).
3. Duchow, E. and Douglas H. C. : *Rhodomicrobium vanielii*, A New Photoheterotrophic Bacterium. *J. Bacteriol.*, **58**, 409 (1949).
4. Doelle, H. W. : Photosynthesis and photometabolism in Bacteriol Metabolism. **84** (1975).
5. Hutner, S. H. : Organic growth essentials of the aerobic nonsulfur photosynthetic bacteria. *J. Bacteriol.*, **52**, 213 (1946).
6. Carr, N. G. and Exell, G. : Ubiquinone concentrations in Athiorhodaceae grown under various environmental conditions. *J. Biochem.*, **96**, 688 (1965).
7. 金林正雄 : 光合成細菌의 菌體成分. *發酵と工業*, **36**, 934 (1978).
8. 平山修 : *發酵と工業*, **36**, 563~573 (1978).
9. 平山修, 原奈美子, 田中彰, 岡章次 : *日農化誌*, **50**, 41~47 (1976).
10. Hward, G., Anthony, S. P. P., LEO, V. : Bacterial Photosynthesis, The Antioch Ptes Yellow Spring, OHIO, 501~510 (1963).
11. Jensen, S. L., Jensen, A. : Recent Progress in Carotenoid Chemistry, Pergemon Press, 'Progress in the Chemistry of Fat & Other Lipids. Oxford, **VII** Part2, 136-137 (1965).
12. Daives, B. H. : Carotenoids, University College of Wales, Aberystwyth, Wales, 108-124 (1976).
13. Synnove, L. J., Arne, J. : Methods in Enzymology **IV**, 586-601 (1975).
14. Synnove, L. J. : The Photosynthetic Bacteria, (Layton Sistro)Plenum Press, New York, **235** (1978).
15. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 8th., The Williams & Wilkins Company, Baltimore, 24-75 (1974).
16. 平山修, 安東榮二, 和林克眞, 原奈美子 : 光合成細菌 *Rhodopseudomonas capsulata*의 色素生成と培養條件. *日農化誌*, **48**, 97 (1974).
17. Bonnet, R., Spark, A. A. and Weedon, B. C. L. : *Acta., Chem.*, **18**, 1793 (1964).
18. 平山修, 安東榮三, 和林克眞, 原奈美子 : *日農化誌*, **48**, 97-104 (1974).
19. 平山修, 原奈美子, 田中彰 : 光合成細菌 *Rhodopseudomonas sphaeroides* S株의 色素成分ならびに色素生成におよぼす無機鹽의影響. *日農化誌*, **50**, 41 (1976).
20. Lascelles, J. and Hatch Thomas P. : Bacteriochlorophyll and Heme synthesis in *Rhodopseudomonas sphaeroides* : possible role of heme in regulation of the branched biosynthetic pathway, *J. Bacteriol.*, **98**, 712 (1969).
21. Liaaen, J. S. : Biosynthesis and function of carotenoid pigments in microorganisms, *Annual Review of Microbiology*, **19**, 163 (1965).

(1997년 10월 14일 접수)