

Citrate Synthase 가 없는 대장균의 생화학적 대사경로의 변환적응

이진원, 이정훈
광운대학교 화학공학과

Flux Adaptations of Citrate Synthase-Deficient *E. coli*

Jinwon Lee and Jeong Hoon Lee
Department of Chemical Engineering, Kwangwoon University

서론

미생물을 이용하여 원하는 생산물을 얻고자 할때 빈번히 부딪치는 문제중의 하나는 배양조건이나 성장속도에 따라 미생물의 대사경로가 변하여 생산물의 품질이나 종류에 일관성을 유지하기가 힘들다는 것이다. 이는 생물학적 시스템(미생물)이 외부 조건의 변화에 민감하게 반응하여 자신을 주변환경의 변화에 빨리 적응시키는 속성에 기인한다. 따라서, 미생물 내부의 생화학적 반응 경로가 외부의 조건에 따라 어떠한 규칙(logic)을 갖고 어떻게 적응해 나가는지 규명해 낸다면 이 지식은 미생물을 이용하는 공정의 설계 및 운영에 매우 유용할 것이다.

일반적으로 포도당 배양액에서 급속히 성장하는 대장균은 TCA cycle 의 효소들의 작용이 크게 억제되고 glycolytic pathway 를 통해 대부분의 탄소가 비효율적으로 소모되어 acetate 를 비롯한 여러 종류의 부산물이 생성된다고 알려져 있다. 본 연구에서는 citrate synthase 가 없는 대장균을 이용하여 glycolytic pathway 와 TCA cycle 간의 연계성 및 상호 작용에 대해 알아 보고자 한다.

citrate synthase 는 glycolytic pathway 로부터 나온 마지막 생산물인 acetate 를 TCA cycle 로 넘겨주는 교량 역할을 하는 효소로서 이의 부재시에는 위 두 사이클이 서로 독자적인 반응을 수행하게 된다. 결국 이 대장균이 정상적인 성장을 하려면 최소한 2 가지의 탄소 화합물이 필요한데 본 연구에서는 glucose 와 glutamine 또는 proline 을 사용하였다. 변형된 반응 메카니즘은 알려진 생화학적 지식을 이용하여 그림 1 과 같이 예측하여 작성하였다. 정상적인 대장균은 배양할때 이산화탄소에 의해 성장 속도에는 영향을 받지 않고 과다할 경우 억제 효과가 있는데, citrate synthase 가 없는 대장균은 이산화탄소에 의해 성장이 촉진되는 현상이 확인되어 그 특성을 밝히는데 연구의 초점을 맞추었다. 부산물의 생성 패턴으로부터 세포 내부의 효소들의 작용을 추론할 수 있었다.

실험

미생물의 종류: citrate synthase 가 없는 대장균 W620 (F⁻, thi-1, pyrD36, gltA6, galK30, rpsL129, supE44; Reissing & Wollman, 1963; Spencer & Guest, 1982) 돌연변이 종을 대상으로 실험하였다. 정상적인 대장균으로 K12 종인 JM101 (Yanisch-Perron 등, 1985) 을 이용하였다.

배양액의 조성: 대장균 W620 에 사용된 배양액은 1 l 당 K₂HPO₄ 14 g, KH₂PO₄ 6 g, MgSO₄ 0.05 g, (NH₄)₂SO₄ 1.25 g, FeSO₄ 0.001 g, Na₃(citrate)2H₂O 0.5 g, CaCl₂2H₂O 0.015 g, thiamine 0.005 g, uracil 0.035 g, glucose 2 g 을 포함하고 있다. citrate synthase 가 존재하지 않으므로 glucose

이외에 또다른 형태로 탄소를 공급하여 주어야 하는데 여기서는 주로 proline 과 glutamine 을 사용하였다 (Lakshmi & Helling, 1976). K12 종 대장균 JM101 에 대해서는 위와 기본적으로 같은 조성의 배양액을 사용했으나 uracil 과 glutamine/proline 은 제외하였다.

회분식 (batch) 발효기 실험 및 분석: 모든 장치와 배양액은 121 C 에서 25 분 간 살균시켰으며 반응기로의 주입 공기는 0.0002 mm 필터를 통과시켜 외부 미생물의 의한 오염을 막았다. 그리고 대장균 W620 은 유전자가 불안정하여 변이가 생기는 확률이 상대적으로 높아 주기적으로 스크리닝 작업을 하여 종의 순수성을 유지했다. 발효기는 1 l 크기의 Applikon fermenter 를 사용하였고, 배양온도는 37 C 를 유지했고, 대장균 농도는 UV-Spectrophotometer 를 이용하여 파장 550 nm 의 빛으로 측정하였다. 유기 부산물의 분석은 Supelco 사의 SUPELCOGEL C-610H 컬럼을 장착한 HPLC 를 사용하였다. glucose 와 glutamine 의 농도 측정은 Sigma 사에서 구입한 키트 (Kit) 를 이용하였다.

결과

citrate synthase 가 없는 대장균은 그림 1 과 같은 네트워 분석과 실험 결과로부터 glutamine/proline 대 glucose 의 몰비율이 0.15 일때 균형있는 탄소의 공급이 이루어진다는 것을 알아냈다. 배양액에 glutamine 을 사용하거나 proline 을 사용하거나 성장 속도는 차이가 없음을 확인 했다 (doubling time: 100 분). 그런데 발효기에 공급하는 공기에 3 % 의 이산화탄소를 첨가해서 배양했을 경우에는 성장 속도가 빨라져서 doubling time 이 80 분으로 되었다. 똑같은 양의 glucose 와 glutamine 배양액에서도 약간 많은 양의 대장균을 얻을 수 있었다. 이산화탄소의 양을 6 % 로 증가시켰을 때도 비슷한 효과를 관찰하였다.

HPLC 를 이용하여 부산물을 분석하였더니 pyruvate, malate, glycerate, lactate, formate, acetate 외에 미량의 화합물이 검출되었다. 공기만을 발효기에 넣어준 경우와 3 % 이산화탄소를 첨가시킨 경우의 부산물 생성 패턴이 크게 다름이 확인되었다. 이 두 경우에 최대 분비된 부산물의 양을 비교한 것이 그림 2 에 나와 있다. acetate 이외의 모든 부산물이 공기만 주어진 경우 상대적으로 많은 양이 배출되었다 (acetate 의 경우 비교를 위해 스케일을 1/10 으로 줄여 표시했음). 또 하나 특이할 만한 것은 glutamine 이 다 사용된 후에도 glucose 만 풍부히 있다면 malate 의 분비는 대장균이 stationary phase 에 들어간 후에도 지속적으로 이루어 짐이 확인 되었다. ATP yield 는 두 경우 모두 7.1 g-cell/ mol ATP 로 같음이 관찰되었다.

토론

citrate synthase 가 없는 대장균의 성장이 흡수하는 메카니즘이 다른 glutamine 이나 proline 에 영향을 받지 않는다는 것은, 이들의 성장이 glycolytic pathway 나 TCA cycle 의 역할에 보다 더 많이 영향을 받고 있다는 것을 말해 준다. 또 ATP yield 가 보통의 대장균과 비슷한 것이 관찰 되었는데, 이것은 citrate synthase 의 부재로 인해 쓸데없는 ATP 의 손실은 없다는 것을 확인해 준다.

부산물 중에서 특이할 만한 것은 formate 인데 pyruvate-formate lyase 에 의해 생성되는 것으로 알려져 있다. 이 효소는 호기성 배양에서 발현이 억제된다고 한다 (Conradt 등, 1984). 그런데 citrate synthase 가 없는 대장균은 pyruvate

의 다량 생산으로 이 효소의 발현을 촉진시켜 formate 의 분비가 가능하게 한 것으로 생각된다. malate 의 생성은 oxaloacetate 로부터 될 수도 있고 glutamine 으로부터 될 수도 있다. 탄소의 양론식을 세워보면 일부 malate 는 glucose 로부터 왔다는 것을 알 수 있고 실험으로도 확인 하였다. stationary phase 에서 malate 가 다시 흡수되어 에너지원으로 이용되는 것을 관찰할 수 있었는데 이것은 malic enzyme 에 의해 pyruvate 로 변환되는 것이 가능하다.

이산화탄소에 의해 성장속도가 달라지는 것은 citrate synthase 가 없다는 것이 대장균으로 하여금 환경의 변화에 더욱 민감해 지도록 만든 것을 추측할 수 있다. 이산화탄소의 직접적인 영향을 예측하기는 쉽지않다. 왜냐하면 이산화탄소는 한편으로는 호흡 작용의 산물이고, 또 한편으로는 대사 반응에 필요한 물질이기 때문이다. 또한 물에 녹아있는 이산화탄소는 세포막에 영향을 끼칠 수도 있기 때문이다. 그렇지만 이산화탄소의 자극 효과는 oxaloacetate 로부터 phosphoenolpyruvate 가 생성될 때에 나타날 수 있다. 또 다른 설명은 이산화탄소가 pyruvate dehydrogenase 의 활동도를 증가시킨다는 것이다. 이 효소는 세포막에 박혀 있는데 이산화탄소에 의해 막의 유동성과 통과성을 증진시켜 상대적으로 NADH 에 의한 억제 효과를 줄여 준다는 것이다.

결론적으로 (1) 정상적인 대장균과 citrate synthase 가 없는 대장균은 서로 비슷한 ATP yield 를 가지나 그 생성 루트가 다름을 부산물(formate 와 acetate)을 통해 알 수 있고, (2) 세포외 (in vitro) 연구로 알려진 pyruvate-formate lyase 와 malic enzyme 의 역할이 세포내에서도 (in vivo) 일치됨을 보였고, (3) 이산화탄소가 생화학 반응에 자극제로 역할을 할 수 있음을 관찰했다.

참고문헌

1. Amarasingham, C.R. and B.D. Davis, *J. Biol. Chem.*, **240**, 9, pp 3664-3668 (1965)
2. Conradt, H., M. Hohmann-Berger, H. Hohmann, H.P. Blaschkowski, and J. Knappe, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **228**, pp 133-142 (1984)
3. Lakshmi, T.M. and R.B. Helling, *J. Bacteriol.*, **127**, pp 76-83 (1976)
4. Majewski, R.A. and M.M. Domach, *Biotechnol. Bioeng.*, **35**, pp 732-738 (1990)
5. Reiss, J.L. et E.L. Wollman, *Ann. Inst. Pasteur*, **105**, pp 774-779 (1963)
6. Spencer, M.E. and J.R. Guest, *J. Bacteriol.*, **151**, pp 542-552 (1982)
7. Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing, *Gene*, **33**, pp 103-119 (1985)

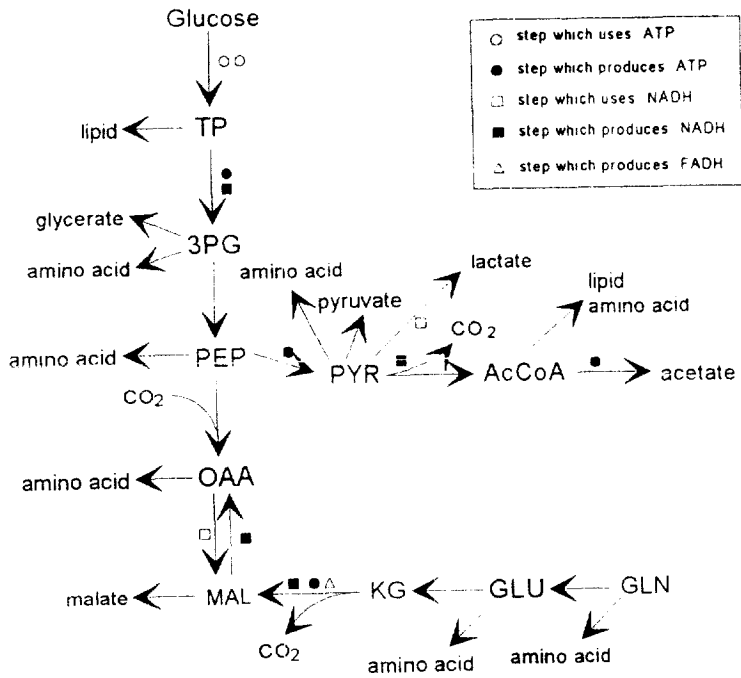


그림 1. citrate synthase 가 없는 대장균의 대사 과정

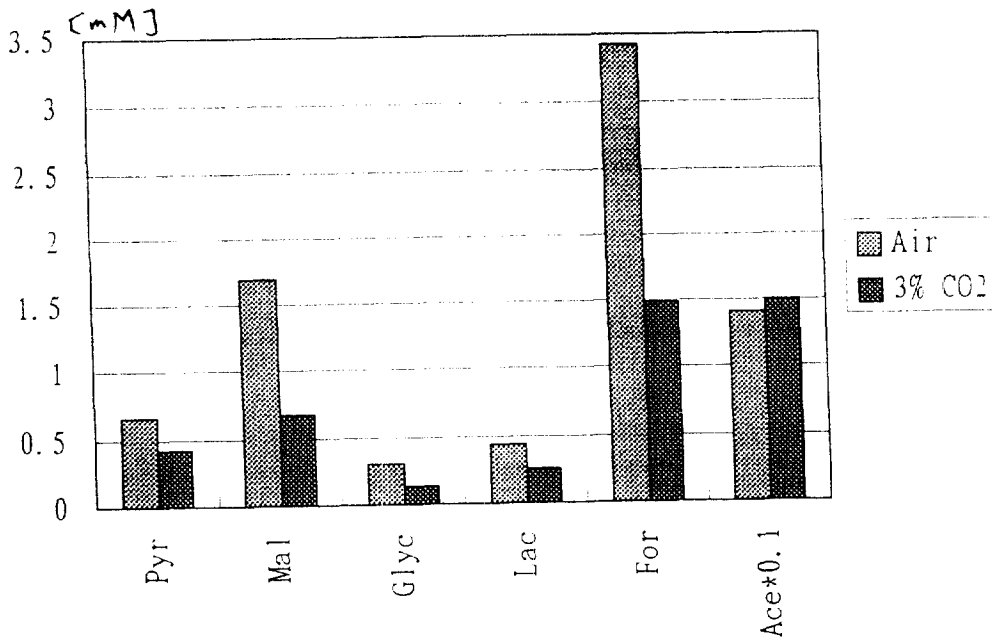


그림 2. 부산물의 최대 분비량 비교