

다당 생산 균주에서의 탄수화물 대사에 관한 연구

: 포도당 흡수 및 대사

나 권 이 기 영

전남대학교 생물화학공학과

Carbohydrate metabolism in polysaccharide producing strains

: Uptake and metabolism of glucose

Kun Na, Ki-Young Lee

Dept. of Biochemical Eng., Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea

서론

Dils등(1)은 *E.coli*를 이용하여 산소, 글리세롤, 맥아당, 유당, 멜리비오스, 포도당의 흡수에 관하여 연구하였는데 산소의 경우는 용질의 농도차에 의하여 일어나는 수동확산(passive diffusion)에 의하여, 글리세린은 용이확산 (facilitated diffusion - 기질이 높은 농도에서 낮은 농도쪽으로 농도구배에 따라 이동한다는 점에서는 수동확산과 유사하지만 대사 에너지의 소비를 요구 하지 않는다. 이것은 그 효소적 성질에 의하여 수동확산과 구별된다), 맥아당은 충격 감수성계 (shock-sensitive system), 유당은 양성자 공동 수송계, 멜리비오스는 나트륨 공동수송, 포도당은 원자단 전달 (group translocation)에 의한다고 보고했다. 포도당 대사에 관한 연구는 Kundig등(2)에 의하여 phosphoenolpyruvate (PEP) : sugar phosphotransferase system이 원핵 세균에 폭 넓게 존재한다고 처음 기술된 후 Kaback등(3)에 의해 *E.coli*에서 PEP system의 절대 의존성이 보고되었고 glycolysis에서 PEP수율이 매우 중요하다고 강조하였다. 일반적으로 EMP경로를 통한 glucose 발효시 glucose 1mole당 2mole의 PEP를 만들어 내지만 Entner-doudoroff(ED) 경로, 오탄당인산 경로, 육탄당일인산 우회경로에서는 glucose 발효시 glucose 1mole당 1mole의 PEP를 만들어 낸다.

지금까지 보고된 연구중 다당 생산 균주에서의 포도당 흡수와 대사에 관한 연구는 다당류의 산업적 이용의 증가에도 불구하고 *E.coli*나 젖산 발효균에 비해 매우 드문 편이다. 따라서, 본 실험에서는 다당인 lactan gum을 생산하는 *Rahnella aquatillis*, Xantan gum을 생산하는 *Xantomonas campestris*, 그리고 Zooglan을 생산하는 *Zoogloea ramigera*등의 다당 생산 균주를 사용 하였으며 지금까지 가장 많이 연구된 *E.coli*를 비교 균주로 사용 하였다.

실험

다당 생산 미생물로 *Rahnella aquatillis* ATCC 55046, *Xantomonas campestris* NRRL B-1459, *Zoogloea ramigera* ATCC 25935등을 사용 하였으며, *E.coli*를 사용 하였다. 각각의 미생물은 최적 배지(*Rahnella aquatillis* ATCC 55046는 LSM, *Xantomonas campestris* NRRL B-1459는 YM, *Zoogloea ramigera* ATCC 25935는 LSM, *E.coli*는 LB배지)와 최적 온도에서 성장 하게 되며 성장

이 대수증식기 말기일때 원심분리에 의하여 미생물을 획득한다. 획득된 미생물은 Romano등(4)의 2-deoxy glucose uptake 분석법에 따라 glucose의 흡수 system 분석을 위하여 0.9% NaCl로 두번 세척한다. 세척된 미생물은 다시 0.5g/l로 현탁한 다음 5mg/l (0.015mM)의 2-deoxy glucose (Sigma)에 일정하게 인식된 2-deoxy- 14 C]glucose (Sigma)를 첨가한 용액(0.5 μ Ci/ μ mol) 0.217ml, 6-deoxy glucose (Sigma) 0.02M 0.4ml, MgCl₂ 0.1M 0.12ml, 0.1M phosphate buffer (pH 7) 0.466ml이 들어있는 배지에 2.8ml를 첨가한다. (단 실험목적에 따라 6-deoxy glucose를 첨가 하지 않을때에는 그만큼 phosphate buffer를 더 첨가한다)

결과 및 토의

Fig.1 은 6-deoxy glucose가 존재할때와 존재하지 않을때 *Rahnella aquatillis*의 2-deoxy glucose uptake에 관한 결과이다. 2-deoxy glucose는 6-deoxy glucose가 존재함에도 불구하고 존재 하지 않을때에 비해 약 90% uptake되었다. 이러한 결과는 *E.coli*를 이용한 실험 결과인 Fig. 2에서도 보여 준다. 이것은 PEP : PTS system의 경우에는 glucose의 6번째 탄소위치에서 free hydroxyl group이 결핍된 6-deoxy glucose를 uptake 할 수 없다는 Romano등(5)의 주장에 비춰 볼때 *Rahnella aquatillis* 와 *E.coli*의 경우 glucose는 phosphotransferase system으로 uptake 된다고 할수 있다. Fig. 3는 *Xantomonas campestris*, *Zoogloea ramigera*의 경우인데 측정된 2-deoxy glucose의 양이 앞의 두 미생물에 비해 현저하게 낮으므로 이 실험만 가지고는 위의 결과를 예측하기에는 부족하였다. Fig. 4은 *Rahnella aquatillis*, *Xantomonas campestris*, *Zoogloea ramigera*의 2-deoxyglucose의 측정된 양을 비교한 것이다. *Rahnella aquatillis* 에 비해 *Xantomonas campestris*와 *Zoogloea ramigera*의 경우에는 적은 양이 측정되었음을 알 수 있었다. 따라서 *Rahnella aquatillis*의 경우는 PEP:PTS로 glucose를 uptake함을 알 수 있다. 결국 *Rahnella aquatillis*의 경우 glucose의 glycolysis를 통한 pyruvate로의 전환시 Embden-Meyerhof-Parnas 경로를 통한다고 볼 수 있다. 이 결과는 혐기성 미생물과 통성 혐기성 미생물은 glucose가 pyruvate전환될때 Embden-Meyerhof-Parnas 경로를 통한다고 하는 Romano등 (5)의 주장과 일치한다(*Rahnella aquatillis*의 경우 통성 혐기성 미생물임). Fig. 5는 *Xantomonas campestris* 와 *Zoogloea ramigera* 배지에 PEP를 첨가 하여 실험을 행한 결과이다. PEP를 첨가 하지 않을때에 비해 첨가한 경우 2-deoxyglucose 축적이 약간은 증가 하였지만 거의 비슷한 수준이었다. 이는 Romano등이 PEP:PTS로 glucose를 uptake하는 *Streptococcus salivarius*로 실험한 결과와 비교해 보면 그 차이를 알 수 있다(5). 결국, *Xantomonas campestris*와 *Zoogloea ramigera*에서는 glucose uptake시 PEP:phosphotransferase system이 존재하지 않으며 glycolysis를 통한 pyruvate 전환시 Embden-Meyerhof-Parnas 경로가 아닌 Entner-Doudoroff 경로 또는 오탄당 인산회로를 통한다고 생각할 수 있다. 하지만 xantan과 zooglan은 다당구조에 pyruvate잔기가 붙어 있는 걸로 보아 pyruvate를 생산 할 수 없는 오탄당-인산회로보다는 Entner-Doudoroff 경로를 경유한다고 생각 할 수 있다. *Xantomonas campestris*와 *Zoogloea ramigera*의 경우 호기성 미생물이라고 알려져 있는데 (6), 이는 호기성 미생물의 경우 glucose의 pyruvate 전환시 Embden-Meyerhof-Parnas 경로 보다는 Entner-Doudoroff 경로를 통한다고 주장과 일치하며 특히, *Xantomonas campestris*의 경우는

Gottshalk 등(7)의 주장과 일치한다. Fig. 6는 EMP 경로를 통하여 glucose를 pyruvate로 전환시키는 경우인 *Rahnella aquatillis*가 glucose로부터 lactan gum을 생산하는 전형적인 그림으로 수율이 약 26.7% 인 반면, *Xantomonas campestris*의 xantan gum 생산 수율은 약 66%였으며 *Zoogloea ramigera*의 경우 zooglan 수율은 약 60%였다.

감사

이 논문은 1995년도 교육부 학술연구조성비(생물화학공학)에 의하여 연구되었으므로 이에 감사 드립니다.

참고문헌

1. Dils, S. S., Apperson, A., Schmidt, M. R., and Saicr, M. H. 1980. Carbohydrate Transfort in Bacteria. *Microbiol Rev.* 44 : 385
2. Kundig, W. S., Ghosh, and S. Roseman 1964. Phosphobound histidine in a protein as an intermidiate novel phospho-transferase system. *Proc. Nat. Acad. U.S.A.* 52 : 1067-1074
3. Kaback, H. R., 1968. The role of the phosphoenolpyruvate phosphotransferase system in the transfort of sugar by isolated membrane preperations of *E. coli*. *J. of Biol. Chem.* 243 : 3711-3724
4. Romano, A. H., Eberhard, S. J., Dngle, S. L., and Mcdowell, T. D. 1970. Distribution of phosphoenolpyruvate : glucose phosphotransferase system in bacteria. *J. Bacteriol.* 104 : 808-813
5. Romano, A. H., Trifone, J. D., and Maryanne, B. 1979. Distribution of phosphoenolpyruvate : glucose phosphotransferase system in fermentative bacteria. *J. Bacteriol.* 139 : 93-974.
6. Kreig, N.R., " Bergey's manual of systematic bacteriology", vol 1, 513 Wiliam & Wilkins Baltimore MD USA(1984)
7. Gottshalk, G., " Bacterial Metabolism ", New York, Heidelberg and Berlin : Springer-Verlag (1979)

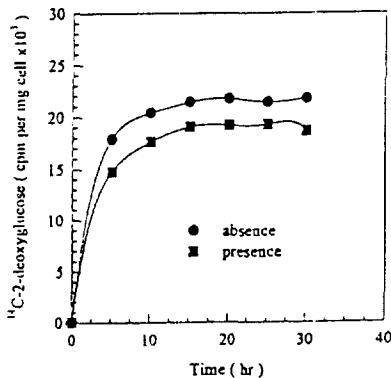


Fig. 1. Effect of 6-deoxyglucose (2×10^{-2} M) on uptake of ^{14}C -2-deoxyglucose ($0.2 \mu\text{Ci}/\mu\text{mole}$) by *Rahnella aquatillis*.

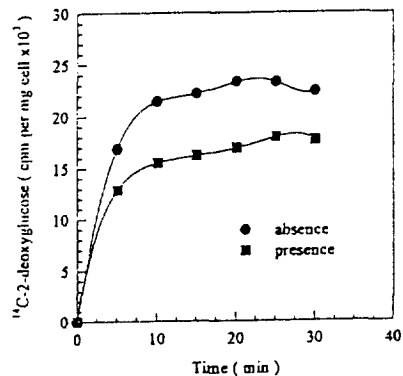


Fig. 2. Effect of 6-deoxyglucose (2×10^{-2} M) on uptake of ^{14}C -2-deoxyglucose by *E. coli*.

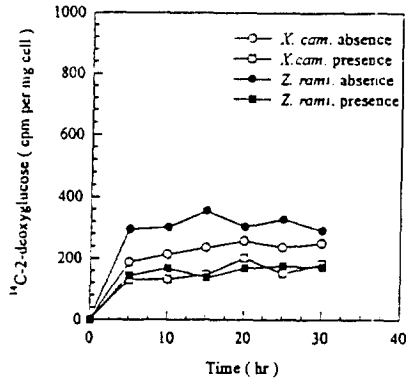


Fig. 3. Effect of 6-deoxyglucose ($2 \times 10^{-2} M$) on uptake of 2-deoxyglucose ($0.2 \mu Ci/\mu mole$) by *X. campestris* or *Z. ramigera*.

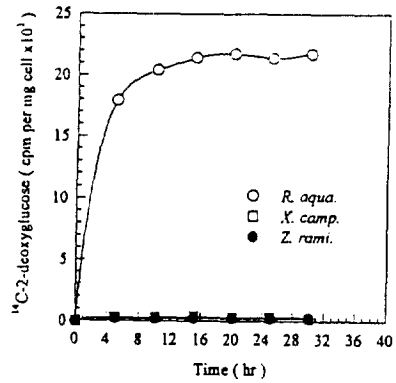


Fig. 4. Uptake of 2-deoxyglucose by polymer producing strains. Cells of *R. aquatilis*, *X. campestris* or *Z. ramigera*.

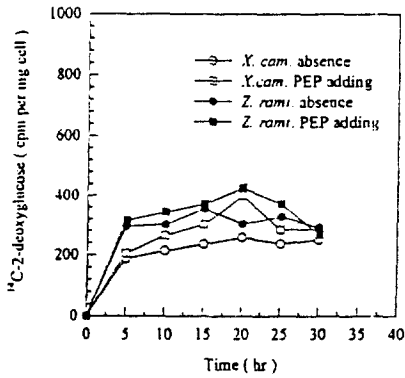


Fig. 5 Effect of Phosphoenolpyruvate(PEP) on uptake of ¹⁴C-2-deoxyglucose by *X. campestris*. or *Z. ramigera*.

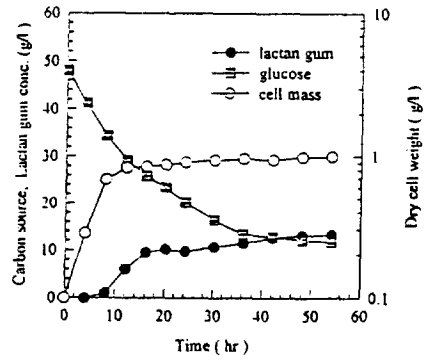


Fig. 6 Kinetics of fermentation of lactan gum on glucose.