

*Dunaliella tertiolecta*에 의한 acetate의 이용
—TCA cycle과 glyoxylate pathway의 활성 조사—

權 寧 命 · 李 敏 載

(서울대학교 生藥研究所 · 서울대학교 文理科大學 植物學科)

The utilization of acetate for the growth and the respiration
in *Dunaliella tertiolecta*.— Enzymes of
the tricarboxylic acid cycle and glyoxylate pathway

Kwon, Young Myung* and Min Jai Lee**

(Natural Products Research Institute* and Department of Botany,
College of Liberal Arts & Sciences**, Seoul National University)

ABSTRACT

The utilization of acetate by *Dunaliella tertiolecta* was examined, and the detections and assays of the enzymes of the tricarboxylic acid cycle and the glyoxylate pathway were described.

Acetate could not be utilized as a sole carbon source for the growth. The carboxyl carbon of acetate was incorporated more rapidly into CO₂ than the methyl carbon.

It was identified that malate, succinate, citrate and etc., were accumulated when [U-¹⁴C] acetate was supplied to the cell free homogenate.

The following enzyme activities were measured; acetothiokinase, isocitrate dehydrogenase, fumarase, malate dehydrogenase and aconitase. Though isocitratase, malate synthetase, succinate dehydrogenase and oxoglutarate dehydrogenase could not be detected, ¹⁴C from succinate was easily contributed to CO₂ and cell component.

The evidence suggested that the glyoxylate pathway was not operative and showed that the TCA cycle was the all important pathway in the oxidation of acetate to CO₂ in *Dunaliella*.

서 론

單細胞植物中 一部 藻類는 glucose나 acetate 만을 炭素源으로서 生長을 할 수 없는 것들이 있다. 이러한 현상은 細胞膜의 투과성이 낮은데 原因이 있을 수도 있고, 또 한편 glucose나 acetate를 同化할 수 있는 代謝系의 결손이나, 또는 一部酵素의 결설이나, 낮은 活性에 起因될 수도 있는 것이다(Syrett, et al., 1963; Pearce & Carr, 1967; Smith, et al., 1967; Kwon & Grant, 1971).

그런데 *Dunaliella tertiolecta*는 glucose나 acetate

를 呼吸基質로 利用하면서도 결코 生長에는 利用하지 못한다. 이것은 *Dunaliella*가 hexokinase나 HMP 또는 EMP를 갖고 있지만 glucose에 대한 낮은 투과성 때문에 일어나는 現象임이 보고되었다(Antia, et al., 1966; Kwon, 1969; Kwon & Grant, 1971). 그러나 acetate에 對한 研究는 아직 없어서 本實驗에서는 ¹⁴C-acetate의 利用과 TCA cycle, 및 glyoxylate pathway의 효소 活性을 조사하였기에 그 結果를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

培養; *Dunaliella tertiolecta* Butcher의 培養에는

medium f를 사용하였고, 배양액에는 5% CO₂를 포함하는 공기를 통과시켰으며, 400 축광의 光度를 유지시켰다(Kwon & Grant, 1971). Heterotrophy 실험에는 acetate의 농도를 0.01M~0.1M로 하였고, 배양액에는 공기를 통과시켰다. 對照實驗으로는 *Chlorella pyrenoidosa*를 사용하였다.

酵素活性의 測定; Cell free extracts(Kwon, 1969)에서 다음 酵素들의 活性를 測定하였다.

Isocitrate dehydrogenase(EC, 1, 1, 1, 42)의 活性은 isocitrate의 存在下에서 일어나는 NAD나 NADP의 환원도로 測定하였고, malate dehydrogenase(EC, 1, 1, 1, 37)의 활성은 oxaloacetate를 基質로 하였을 때 일어나는 NADH의 酸化를 測定하여 비교하였다(Ochoa, 1955). Aconitase(EC, 4, 2, 1, 3)와 fumarase(EC, 4, 2, 1, 2)의 活性은 citrate와 malate를 基質로 했을 경우 240nm에서 일어나는 흡광도 변화로 測定하였다(Racker, 1950). Acetothiokinase(EC, 6, 2, 1, 1)의 活性은 hydroxylamine을 사용한 方法으로(Hoarse, et al., 1967), oxoglutarate dehydrogenase(EC, 1, 2, 4, 2)는 Smith, et al. (1967)의 方法을 기초로하여 各各 測定하였다. Succinate dehydrogenase(EC, 1, 3, 99, 1)(Burton, et al., 1966; Neufel, et al., 1954), isocitratase(EC, 4, 1, 3, 1)(Muller, et al., 1968)와 malate synthetase(EC, 4, 1, 3, 2)(Pearse & Carr, 1967) 등의 活性도 各各 吸光度測定方法으로 조사하였다.

¹⁴C-acetate의 利用; 방사성기질의 細胞內 利用을 조사하기 위하여 Warburg 검압장치를 사용하였다. Vessel內에서 발생되는 CO₂는 hyamine hydroxide에 흡수시켜 회수하였고, 반응이 끝난 세포부유액은 ethanol로 추출해서 상등액을 알콜가용성성분으로 하였으며, 침전물은 알콜불용성성분으로 사용하였다. 각 fraction의 방사능은 liquid scintillation counter를 사용하여 측정하였다(Kwon & Grant, 1971).

한편 acetate의 대사를 구명코져 cell free homogenate에 방사성 acetate를 가지고 생성되는 방사성물질을 paper chromatography와 radioautography로 검색하였다.

paper chromatography와 radioautography; 反應이 끝난 cell free homogenate의 알콜추출액을 감압농축해서, 이것의 paper chromatogram을 만들고 다시 X-ray film을 사용해서 radioautogram을 만들었다. 방사성 spot의 판정은 Rf 및 發色反應實驗과 cochromatography로 하였다.

그리고 각 spot의 방사능은 thin end window Geiger tube로 測定하였다(Wilson & Calvin, 1955).

蛋白質定量; 細胞부유액의 단백질량은 Microkjedahl法(Newell & Dal Pont, 1964)으로, cell free homogenate의 경우는 Folin-phenol 시약법으로(Lowry, et al., 1951) 各各 定量하였다.

결 과

生長實驗; acetate는 걸코 *Dunaliella*의 生長을 촉진시키지 못하였다. 暗所에서 *Chlorella*는 acetate를 生長物質로 利用할 수 있었으나, *Dunaliella*는 전혀 증식하지 못하였다. 그리고 光下에서 acetate는 *Chlorella*의 生長을 촉진시켰으나 *Dunaliella*의 生長에는 아무런 變化를 일으키지 못하였다. 그러나 ¹⁴C-acetate의 ¹⁴C가 細胞內에 固定되기는 하였다.

酵素活性; TCA cycle과 glyoxylate pathway의 酵性素活을 調査한 結果를 보면; acetothiokinase의 活性은 비교적 약하게 측정되었고(그림-1), isocitrate dehydrogenase는 NAD를 조효소로 사용하지 못하나 NADP는 쉽게 환원시킬 수 있었다(그림-2). Malate dehydrogenase의 활성은 상당히 높았는데 이것은 基質로 oxaloacetate를 사용하였기 때문인 것 같았다(그림-3). Aconitase와 fumarase의 活性도 각각 측정되었으나 活性이 극히 낮았다(그림-4). Oxoglutarate dehydrogenase와 succinate dehydrogenase의 活性은 測定되지 못하였다. 즉 Freeze-thaw法 및 lysozyme 등으로 만든 cell-free homogenate에서도 두 酵性의 活性은 測定되지 않았으나 *Chlorella*의 경우 succinate dehydrogenase의 活性은 測定되었다.

Isocitratase와 malate synthetase 測定에는 光下에서 acetate를 첨가배양한 細胞의 cell free homogenate를 使用하고, isocitrate dehydrogenase를 불활성화 하여도 酵性素活性은 測定할 수 없었으나, acetate에서 배양된 *Chlorella*에서는 glyoxylate pathway의 두 酵性素活을 모두 測定할 수 있었다.

¹⁴C-acetate의 利用; [¹⁻¹⁴C] acetate의 ¹⁴C는 대부분 CO₂로 되었으며, [²⁻¹⁴C] acetate의 ¹⁴C는 알콜용해성 성분으로 더 많이 移行되었다(표-1). 그리고 [U-¹⁴C] succinate가 쉽게 呼吸基質로 利用될 수 있었다.

Cell free homogenate에서 [U-¹⁴C] acetate와 [U-¹⁴C] pyruvate는 各各 여러가지 物質로 變化되었으나, 방사능의 대부분은 malate, succinate와 citrate에 집

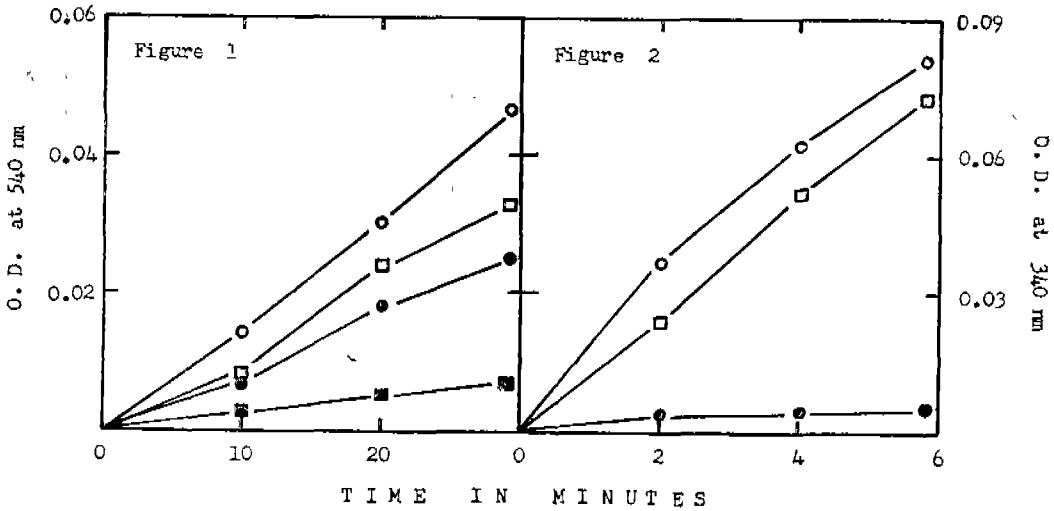


Figure 1. Assay of acetothiokinase activity

1.5ml of reaction mixture contained (μ moles): 100; phosphate buffer (pH 7.5), 0.5; Co-A, 10; $MgCl_2$, 100; hydroxylamine, 2000; acetate, and 2.95mg protein of cell free homogenate.

The reaction was stopped by adding 1.5ml of 10% $FeCl_3$ and 3.3% trichloroacetic acid in 0.7N HCl. Tubes were centrifuged and the extinction of the supernatant measured at 540nm. ○—○ complete, □—□ without ATP ●—● without Co-A, ■—■ without acetate.

Figure 2. Demonstrations of isocitrate dehydrogenase

3.0ml of final reaction mixture contained (μ moles): 200; tris buffer (pH7.6), 0.7; AMP, 10; $MgCl_2$, 10; isocitrate, 500 μ g; NAD or NADP and 0.7mg protein of cell free homogenate. ○—○ NADP and AMP, □—□ NADP only, ●—● NAD and AMP

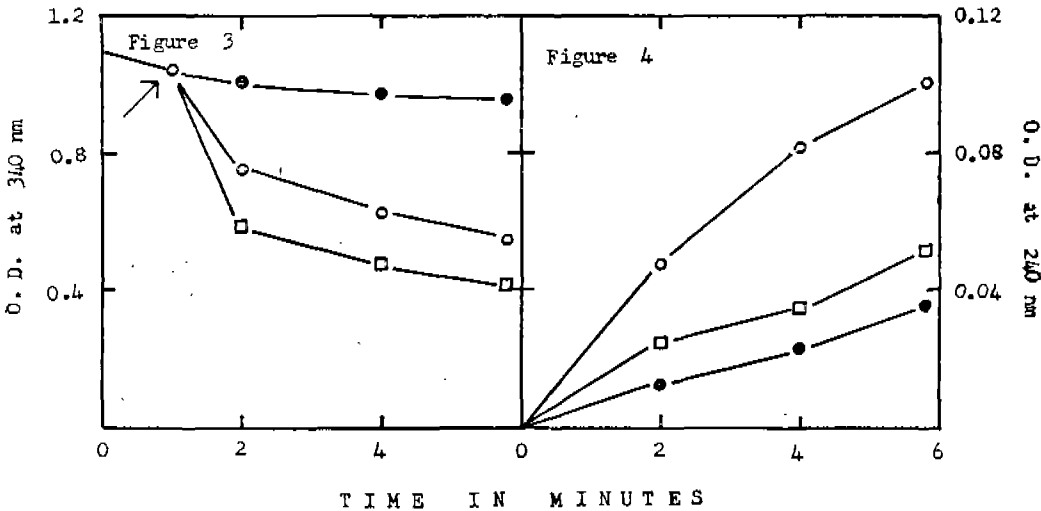


Figure 3. Assay of malate dehydrogenase.

3.0ml final reaction mixture contained (μ moles): 200; tris buffer (pH7.6), 15; $MgCl_2$, 10; oxaloacetate, 380 μ g of NADH and cell free homogenate.

○—○ 0.5mg protein of cell free homogenate
 □—□ 1.0mg protein of cell free homogenate
 ●—● without substrate

Figure 4. Demonstrations of aconitase and fumarase activities.

3.0ml reaction mixture contained: 200 μ moles; phosphate buffer (pH 7.5), 0.9mg protein of cell free homogenate and substrate.

○—○ 150 μ moles of citrate.
 □—□ 100 μ moles of malate
 ●—● without substrate

증되었다(표-2). 그러나 pyruvate의 경우는 malate의 생성보다 spot 3의 물질이 더 많이 생성되었는데, 이것은 pyruvate가 TCA cycle 이외의 대사제에도 활발하게 利用하였음을 나타내는 것이라 하겠다.

고찰

본실험은 *Dunaliella*에서 TCA cycle과 glyoxylate pathway의 存在有無를 밝히고자 行한 것이다.

acetate가 *Dunaliella*細胞에 依해서 利用될 때 C-1 炭素가 C-2 炭素보다 훨씬 많이 CO₂에 나타났고, C-2 炭素는 대부분 細胞內에 固定된다는 사실(표-1)은 acetate가 TCA cycle을 經유해서 酸化됨을 의미하는 것이다(Harley & Beevers, 1963). 그리고 Cell free homogenate에서 citrate, malate, 및 succinate 등이 acetate로부터 만들어졌고(표-2), 또한 TCA cycle 효소중 대부분의 存在가 認定된 사실 등으로 보아(그림 1, 2, 3, 4) *Dunaliella*가 완전한 TCA cycle을 갖고 있는 것이라 믿어진다. 물론 succinate dehydrogenase와 oxoglutarate dehydrogenase의 活性를 測定할 수는 없었으나, 이것은 [U-¹⁴C] succinate가 細胞內에서 쉽게 CO₂로 되었고, 그 酸化程度가 acetate나 pyruvate와 비슷한 점으로 보아(표-1) (Kwon & Grant, 1971), succinate dehydrogenase의 存在는 인정될 수 있다고 생각된다. 그리고 oxoglutarate dehydrogenase의 活性도 직접 測定하지는 못하였으나 방사능 acetate의 利用實驗으로 보아(표-1, 2) 그의 存在를 부정할 수는 없고, NAD 보다 더 예민한 반응을 하는 NAD 유도체를 사용하면 직접 酵素活性를 測定할 가능성이 있다고 사료된다.

그러나 *Dunaliella*에는 isocitratase와 malate synthatase는 存在하지 않는다고 말할 수 있겠다. 물론 glyoxylate pathway의 참여 없이도 *Beggiatoa*는 acetate를 同化할 수 있지만(Burton, et al., 1966) 이 경우에도 C-2 化合物同化에 절대적으로 필요한(Kornberg & Krebs, 1957) isocitratase와 malate synthetase는 갖고 있음이 알려졌다. 그리고 *Chlorella* (Goulding & Merrett, 1966; Goulding & Merrett, 1967)와 *Anabaena*와 *Anacystis*(Hoarse, et al., 1967) 등이 acetate를 同化할 경우에도 반드시 glyoxylate pathway의 참가가 있어야 하며, 高等植物도 acetate로부터 糖을 合成할 경우에는 glyoxylate pathway를 거쳐게 된다(Canvin & Beevers, 1961).

이상과 같이 glyoxylate pathway의 活性는 C-2 化

Table 1. Incorporations of ¹⁴C from labeled substrates into CO₂ and cell material

Substrates	dpm/mg protein			
	CO ₂	EtOH Sol	EtOH InSol	Total
[1- ¹⁴ C] Acetate	427	134	18	579
[2- ¹⁴ C] Acetate	104	238	22	414
[U- ¹⁴ C] Succinate	116	155	18	289

Each vessel contained in a total volume of 2.0ml:10 μ moles; substrates containing 6.48 \times 10⁶dpm(1-¹⁴C), 6.36 \times 10⁶dpm(2-¹⁴C) and 6.10 \times 10⁶dpm (U-¹⁴C), 1.7ml of artificial sea water, 8.34mg protein of cells and 0.1ml of hyamine hydroxide in the center well. CO₂ retained in the buffer at the completion of incubation was released by the addition of 0.1ml 10N H₂SO₄ from the side arm. Incubation time was 2hrs at 25°C. The dpm in the CO₂ fraction had been corrected for a small amount (0.4-1.2%) of contamination found in these compounds when released CO₂ on acidification.

Table 2. Analysis of some ¹⁴C-compounds which derived from labeled compounds in cell free homogenate of *Dunaliella*

Addition	Radioactive areas on the paper*						
	1	2	3	citrate	malate	6	succinate
[U- ¹⁴ C] Acetate							
Oxaloacetate	1.0	1.8	3.0	44.4	27.5	—	22.3
Glyoxylate	0.8	—	3.9	39.5	29.7	—	26.1
H ₂ O	4.6	—	6.7	38.9	30.0	—	19.8
[U- ¹⁴ C] Pyruvate							
Oxaloacetate	—	0.7	18.0	27.1	5.8	20.5	27.6
H ₂ O	1.3	1.0	12.7	60.6	9.3	9.0	6.1

*1, 2, 3 and 6 were unidentified spots.

All values were given units relative to the total radioactivity. Radioactive areas were detected by placing the paper in contact with X-ray film and were counted, on the paper, with a thin-end window Geiger tube.

2.0ml of reaction mixtures were incubated at 25C for 10min period in 0.05M phosphate buffer(pH 7.5)containing (μ moles): 10; ATP, 10; MgCl₂, 0.2; Co-A, 5; ThPP, 10; glyoxylate or oxaloacetate, 10; ¹⁴C-compound containing 2 μ Ci¹⁴C and 12.5mg protein of cell free homogenate. To stop the reaction 2.0ml of 5% acetic ethanol was added to each tubes and then the contents of the tubes were pured into 5ml of ethanol and stored overnight at 15°C.

Alcohol soluble fraction was chromatogrammed on Whatmann NO 1 paper with the butanol/propionic acid solvent.

化合物的 利用如何를 결정짓는 중요한 代謝系이나 (Syrett, et al., 1963; Syrett, et al., 1964; Harrop & Kornberg, 1966) *Dunaliella*가 acetate를 生長基質로 利用하지 못

했고, acetate 첨가배지에서도 결코 socitratase 나 malate synthetase 가 유도되지 못했으며, cell free homogenate 에서 acetate 로부터 malate 와 citrate 등이 합성될때 glyoxylate 나 oxaloacetate 의 첨가로 현저한 변화가 일어나지 않았다는 사실 등은 (표-2) glyoxylate pathway 의 不在를 의미하는 것으로 해석된다. 한편 *Dunaliella* 는 acetate 를 色素合成에 利用할 수 있는데 (Parshikov, et al., 1967) 이러한 사실은 glyoxylate pathway 의 存在를 암시할 수도 있는 것이므로 이와 같은 代謝系에 關係서는 앞으로의 研究에서 해결되어야 한다고 生覺된다.

지금까지의 고찰로부터 *Dunaliella* 에는 TCA cycle 은 存在하나 glyoxylate pathway 는 存在치 않기 때문에 外部로부터 공급된 acetate 는 TCA cycle 을 거쳐서 CO₂ 로 酸化되며 세포의 생장물질로 이용되지는 못한다고 결론하겠다.

요 약

Dunaliella 에서 TCA cycle 과 glyoxylate pathway 의 활성을 조사한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. cell free homogenate 에서 acetothikinase, isocitrate dehydrogenase, fumarase, malate dehydrogenase, 와 aconitase, 의 존재가 인정되었으나, isocitratase, malate synthetase, succinate dehydrogenase 및 oxoglutarate dehydrogenase 의 활성은 측정되지 않았다.

2. acetate 의 C-1 炭素에서 발생되는 CO₂ 는 C-2 炭素에서보다 5배나 많았으며, succinate 는 acetate 나 pyruvate 와 같은 정도로 호흡에 이용되었다.

3. acetate 는 *Dunaliella* 의 생장을 촉진시키지 못했으나, citrate, malate 와 succinate 등으로 변화될 수는 있었다.

4. 이상의 결과로 보아 *Dunaliella* 에는 TCA cycle 은 존재하지만, glyoxylate pathway 의 활성은 없는 것 같으며, 외부에서 첨가된 acetate 는 TCA cycle 을 거쳐서 주로 CO₂ 로 되는 것 같다.

REFERENCES

Antia, N.J., J. Kalmakoff and A. Watt 1966. Enolase activity in marine planktonic algae. *Can. J. Biochem.* 44. 449-54.
 Burton, S.D., R.Y. Morita and W. Miller 1966. Utilization of acetate by *Beggiatoa*. *J. Bacteriol.* 91. 1192-1200.
 Canvin, D.T. and H. Beevers 1961. Sucrose synthesis from acetate in the germinating castor bean: Kinetics and pathway. *J. Biol. Chem.* 236. 988-95.

Goulding, K.H. and M.J. Merrett 1966. The photometabolism of acetate by *Chlorella pyrenoidosa*. *J. exp. Bot.* 17. 678-89.
 Goulding, K.H. and M.J. Merrett 1967. The photoassimilation on acetate by *Pyrobotrys (Chlamydotrys) stellata*. *J. gen. Microbiol.* 48. 127-36.
 Harley, J. L. and H. Beevers 1963. Acetate utilization by maize roots. *Pl. physiol.* 38. 117-23.
 Harrop, L. C. and H. L. Kornberg 1966. The role of isocitrate lyase in the metabolism of algae. *Proc. Roy. Soc. 166. B.* 11-29.
 Hoarse, D.S., S.L. Hoarse and R.B. Moore 1967. The photoassimilation of organic compounds by autotrophic blue-green algae. *J. gen. Microbiol.* 49. 351-70.
 Kornberg H. L. and H. A. Krebs 1957. Synthesis of cell constituents from C₂-units by a modified tricarboxylic acid cycle. *Nature.* 179. 988-91.
 Kwon, Y. M. 1969. Glucose oxidation and its oxidative enzyme systems in *Dunaliella tertiolecta*. II. Evidence for glycolytic and pentose phosphate pathways in cell-free extracts. *Korean J. Bot.* 12. 63-70.
 Kwon, Y. M. 1970. Production of glycerol from glucose by *Dunaliella tertiolecta* cell-free systems. *Korean J. Microbiol.* 8. 35-40.
 Kwon, Y.M. and B.R. Grant 1971. Assimilation and metabolism of glucose by *Dunaliella tertiolecta* I. Uptake by whole cells and metabolism by cell free systems. *Pl. & Cell Physiol.* 12. 29-39.
 Lowry, D.H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall 1951. Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193. 265-75.
 Mueller, M., J. F. Hogg and C. De Duve 1968. Distribution of tricarboxylic acid cycle enzymes and glyoxylate cycle enzymes between mitochondria and peroxisomes in *Tetrahymena pyriformis*. *J. Biol. Chem.* 243. 5385-95.
 Neufeld, H. G., C. Scott and E. Stotz 1954. Purification of heart muscle succinic dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 210. 869-76.
 Newell, B.B. and G. Dal Pont 1964. Ammonia in sea water. *Nature.* 201. 36.
 Parshikov, V. N., I. G. Drokova and R. Ts. Popova 1967. Possible incorporation of glucose-¹⁴C and acetate-¹⁴C into pigments of the algae *Dunaliella salina*. *Puti. Povysheniya Intensivnosti Prod. Fotosin.* No. 2. 142-7. *In Chemical Abst.* Vol. 68. 66721w.
 Ochoa, S. 1955. Isocitric dehydrogenase system (TPN) from pig heart. *In Methods in Enzymology.* Vol. 1. Ed. by S. P. Colowick and N. O. Kaplan. Academic Press Inc. New York. pp. 699-704.
 Pearce, J. and N. G. Carr 1967. The metabolism of acetate by the blue-green algae, *Anabaena variabilis* and *Anacystis nidulans*. *J. gen. Microbiol.* 49. 301-13.
 Racker, E. 1950. Spectrophotometric measurements of enzymatic formation of fumaric and *cis*-aconitic acid. *Biochem. Biophys. Acta.* 4. 211-14.
 Smith, A. J., J. London and R. Y. Stanier 1967. Biochemical basis of obligate autotrophy in blue-green algae and thiobacilli. *J. Bacteriol.* 94. 972-83.

Mar., Jun. 1973

Kwon and Lee—Utilization of acetate for growth and respiration

- Syrett, P. J., M. J. Merrett and S.M. Bocks 1963. Enzymes of the glyoxylate cycle in *Chlorella*. J. exp. Bot. 41. 249—64.
- Syrett, P. J., S. M. Bocks and M. J. Merrett 1964. The assimilation of acetate by *Chlorella vulgaris*. J. exp. Bot. 15. 35—47.
- Wilson, A. T. and M. Calvin 1955. The photosynthetic cycle, CO₂ dependent transients. J. Am. Chem. Soc. 77. 5948—57.
- (1973. 1. 3 접수)