

## Catabolic Repression 및 Derepression에 의한 효모 세포의 다당류 함량 변화와 무기 폴리 인산(제 5 보)

李 基 渥·崔 榮 吉

漢陽大學校 生物學科

## Changes in Amounts of Polysaccharides and Polyphosphates under Catabolic Repression and Derepression in Yeast(V)

Ki Sung Lee and Yong Keel Choi

Department of Biology, Hanyang University, Seoul 133, Korea

**Abstract:** The present study was designed to investigate biosynthetic patterns of polysaccharides under catabolic repression and derepression in *Saccharomyces uvarum*. Correlation coefficients between polysaccharide synthesis and polyphosphate accumulation were examined, according to the culture phase and under various phosphate concentrations (free, limited, sufficient). During catabolic derepression, biosynthesis of glycogen was enhanced rapidly and highly in the cells grown on minimal medium, compared with those grown on the complete medium. Acid soluble glycogen type was the main component of total glycogen and alkali soluble glycogen was synthesized in small amount, after 24 hr culture, at the time of almost exhaustion of sugar in the medium. Total glycogen was accumulated highly in proportion to the amount of phosphate added to the medium. It could be postulated that type "C" isoenzyme among ALPase was directly or indirectly correlated with the glucan synthesis. Mannan synthesis indicated maximal amount at the early exponential phase and stationary phase, and also acid soluble sugars at the stationary phase. Correlation coefficient between the mannan synthesis and poly-p-"C" accumulation, and also between mannan synthesis and phospholipid content indicated 0.866 and 0.726, respectively.

**Keywords:** *Saccharomyces uvarum*, Yeast, Polysaccharide synthesis, Polyphosphate accumulation, Catabolic repression and derepression, Glycogen.

일반적으로 효모세포에 존재하는 다당류는 크게 2 group으로 나눌 수 있는데, 첫째는 세포벽의 주된 성분인  $\beta$ -glucan과 mannan이 있으며, 두번째 group은 세포내 탄수화물의 저장역할을 하는 glycogen(acid soluble, alkali soluble 2가지 type 존재)과 비환원성 2당류이며, 산가용성인 trehalose(2, D-glucose residues)로 분류될 수 있다(Quain *et al.*, 1979; Shibata *et al.*, 1983).

Mannan과 glucan의 경우 세포내에서 구조 기능 이외에도, mannan은 protein과 phosphomannan-protein 복합체(Nakajima *et al.*, 1974)를 형성하고 있으며, 이

mannan-protein complex는 세포벽의 외부에 위치하여 면역의 기능 및 세포분열 조절기능을 하며, Shibata 등(1983)의 연구에서는, mannan-protein complex를 분리하여 화학적인 조성을 조사한 결과, 이 complex의 분자량은 133,000이며, 2% 정도의 포도당 잔기와 5종의 phosphate 분획으로 나누어 진다 하였다.

또한 진핵세포의 표면에 존재하는 다당류는 외부 단백질(세균, 바이러스, toxin)에 대한 receptor의 기능을 갖지만, 이들의 작용기작은 밝혀지지 않았다(Hutchins *et al.*, 1983). 세포벽의 구조 성분인 glucan중 1,6- $\beta$ -D-glucan은 yeast killer toxin의 receptor로 작용하며

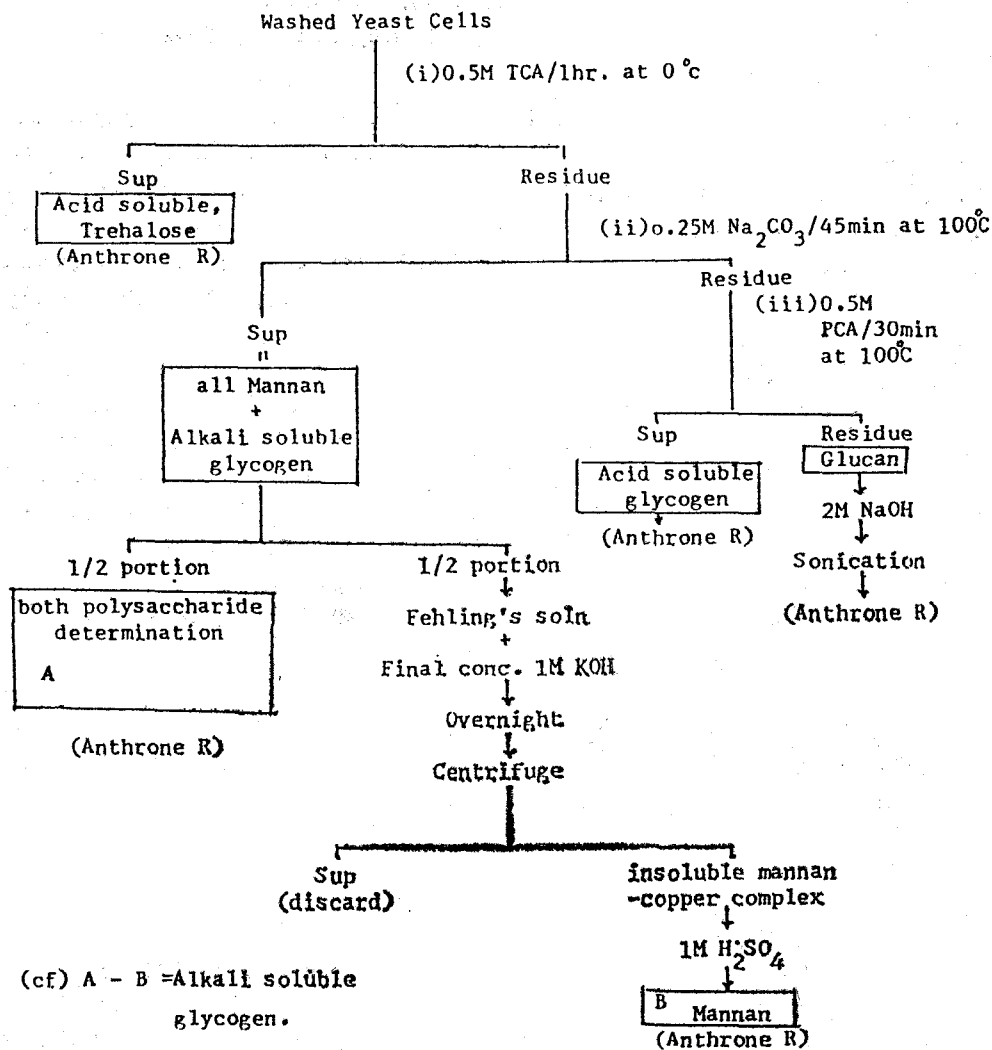
(Hutchins *et al.*, 1983), mannan과 glucan의 연결은  $\beta$ -1,6-linked oligoglucosyl residue로 이루어진다 하였다 (Fleet *et al.*, 1977).

세포내 탄수화물의 저장역할을 하는 trehalose (Panek *et al.*, 1977)와 glycogen의 축적은 발효상태로부터 산화적인 성장으로 넘어가는 전이 상태, 즉 catabolic derepression때 일어난다고 했으며, trehalose의 분해는 mitochondria에서 생성되는 energy를 이용한다 (Panek *et al.*, 1977)고 하였으나, 몇몇 효모는 ethanol oxidation이 시작된 후에 trehalose가 축적되어 정반대의 현상도 나타난다 (Costa-Carvalho *et al.*, 1978). 또, 효모 세포에서 trehalase의 활성 조절은 cAMP에 의해 작동

되는 protein kinase에 의해 불활성 형태인 cryptic form (trehalase C)이 active form (trehalase a)으로 전환되므로서 이루어진다 (Ortiz *et al.*, 1982) 하였다.

질소원 및 성장 시기에 따라 glycogen 축적 및 glycogen phosphorylase의 양의 변한다 (Becker, 1982)고 하였다.

본 실험의 경우는, catabolic repression시킨 효모세포를, 완전배지와 최소배지에서 catabolic derepression시켜, 효모세포의 polysaccharide를 분획하여 배양 시기 및 인산의 농도 (free, limited, sufficient)에 따른 다당류 합성의 변화를 조사하였다. 그리고 다당류 합성과 폴리인산과의 관계 및 세포 분열에 관련있는 세포벽



Scheme 1. Flow chart for fractionation of polysaccharides from yeast cells.

구성 다당류와 세포막 성분인 phospholipid 합성사이의 상관관계를 살펴므로, 세포벽 성분인 다당류 중 어느것의 합성이 세포막 성분인 인지질 합성과 유의한 관계가 있는 지도 조사하였다.

재료 및 방법

효모의 성장 조건 및 배지 조제

효모세포(*Saccharomyces uvarum* ATCC 9080)의 catabolic repression 및 derepression, 그리고 인산첨가 배양은 전보(Lee et al., 1985 I, II)와 동일한 방법으로 행하였다.

다당류의 분획

배양시기, 배양조건에 따라 수확된 효모세포를 Quain and Haslam(1979)이 행한 연구에서와 같이 Trevelyan and Harrison(1956)의 방법에 의해 다당류를 분획하였으며, 그 처리 순서는 Table I에 표시한 바와 같다.

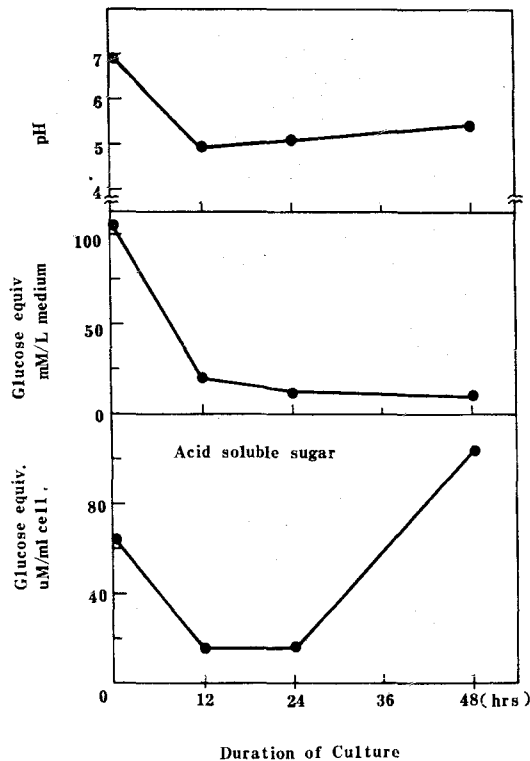


Fig. 1. Changes of pH, amount of sugar in medium and amount of acid soluble sugar fraction from *S. uvarum* cells during growth on YE medium.

결과 및 고찰

다당류 함량 변화

완전배지(YE) 및 인산농도를 달리 처리한 최소배지에서 catabolic derepression시킨 효모세포의 다당류 합성, 세포내 당의 도입 및 배지의 pH변화를 Fig. 1~6에 표시하였다.

Fig. 1,2에 나타난 바와 같이 배양기간 동안의 pH는 전반적으로 acidic하게 되었으며, 당 흡수는 배양기에 따라 거의 일정하였지만, 무기인산 결핍배지에서 배양

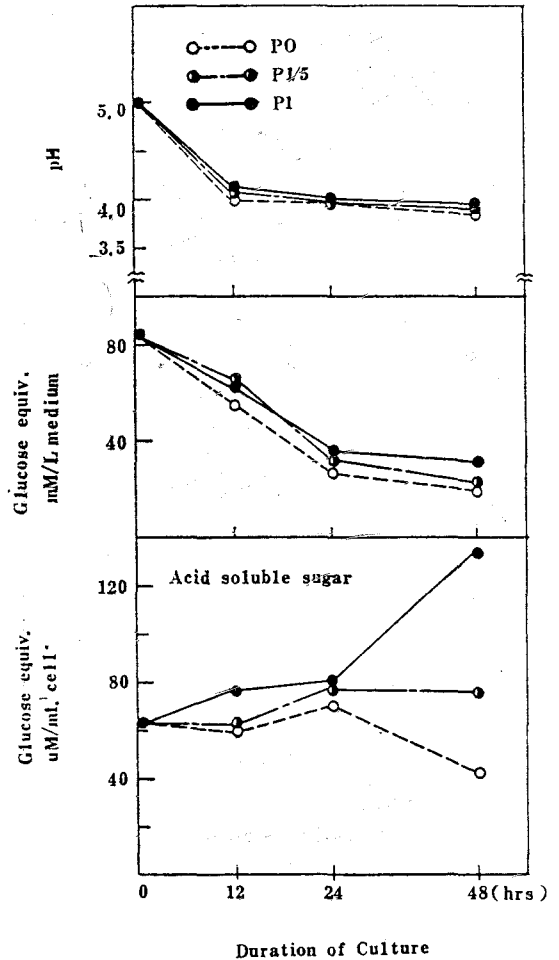


Fig. 2. Changes of pH, amount of sugar in medium and amount of acid soluble sugar fraction from *S. uvarum* cells during growth on minimal medium supplemented with Pi free (PO), Pi limited (P1/5) and with Pi sufficient (P1).

시킨 세포에서 오히려 세포내 도입이 왕성하였다. 이러한 특이한 현상은 결핍 배지에서 생육된 세포에서 ALPase, ACPase, poly-Pase가 derepression되어 효소의 활성도가 높아진 것(Lee *et al.*, 1985, I, II, III)을 고려해 보면, Pi uptake system 중 carrier 등을 통한 system이 차단된 상황에서 당의 흡수가 일어난 것이다. 이와 같은 경우, 당 흡수는 당 공급 후의 배양세포에서 급격히 감소하는 ALPase, ACPase, ATPase에 의한 것(Lee *et al.*, 1985, I, II) 보다는 계속적으로 높은 활성을 보인 poly-Pase의 기능에 의해(Lee *et al.*, 1985 III) 무기인산 결핍상태에서도 당 흡수의 compensation이 가능할 것으로 추정되어질 수 있다.

효모의 경우 당 흡수에도 ATP system뿐 아니라 무기폴리인산계를 통하여 능동수송 또는 당의 인산화 반응이 일어날 수 있다(Van Steveninck *et al.*, 1964)고 하였는데, 이와 같은 보문과 마찬가지로 본 실험에서의 경우, 당의 인산화 반응 및 당 흡수의 동시성을 고려해 볼 때, 무기인산 결핍상태에서의 당 흡수는 무기

폴리인산 계에 의한 것으로 추정할 수 있다. 또 세포내 acid soluble sugar(trehalose 포함)의 함량이 완전 배지에서 생육시킨 세포가, 최소배지에서 생육된 세포에 비하여 낮은 것은 당연할 뿐 아니라, 다른 영양물의 함유로 세포분열 활성에 따른 것으로 볼 수 있다. 또, 대체로 stationary phase때 특히 sugar가 medium내에서 거의 소비되었을 때 acid soluble sugar가 최대함량을 나타낸 것은, *S. cerevisiae*를 재료로 한 연구(Quain *et al.*, 1979)에서 동조건에서 trehalose가 세포내에서 최대 함량을 보인 것과 일치함을 보여준다.

본 실험에서 세포내 glycogen의 축적 변화를 살펴 보면(Fig. 3, 4), 전 배양 조건에서 산가용성 glycogen이 알칼리 가용성 glycogen에 비하여 훨씬 많은 축적을 보여 total glycogen의 주된 함량을 나타냈다.

완전 배지의 경우 12시간 배양까지는 거의 증가를 보이지 않았으며, 산가용성 glycogen type만 보이고, 알칼리 가용성 glycogen의 함성은 나타나지 않았으며, 또, 포도당이 소모되는 stationary phase때 glycogen의

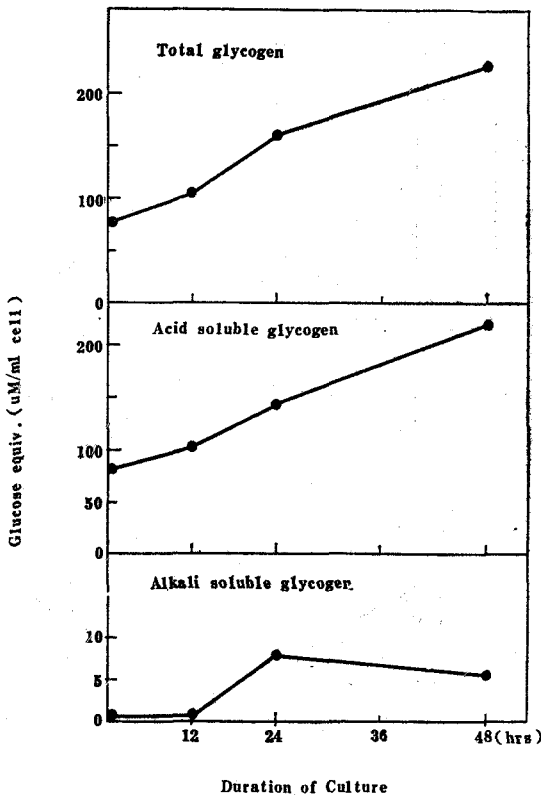


Fig. 3. Changes in amount of reserve polysaccharides (total glycogen, acid soluble and alkali soluble glycogen) during growth on YE medium.

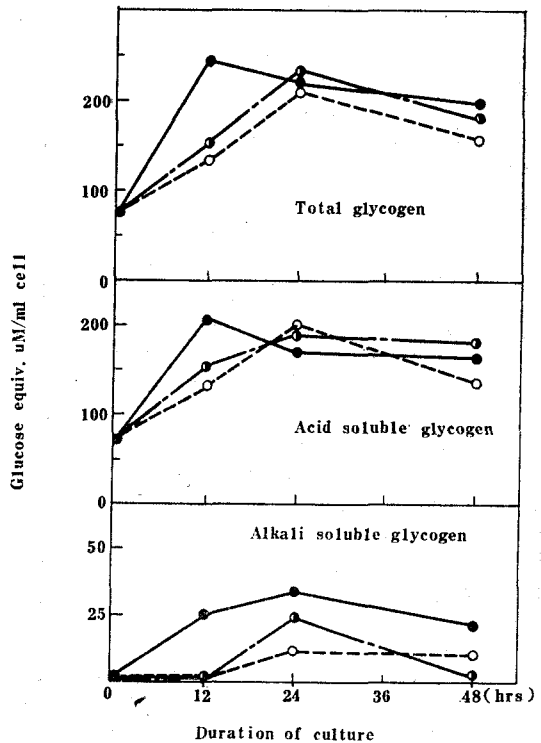


Fig. 4. Changes in amount of reserve polysaccharides (glycogen fractions) during growth on minimal medium in absence or sufficiency of Pi source. Symbols are the same as the previous Figure.

합량이 최대로 나타났다. 최소 배지의 경우에서도 당과 인산의 결핍배지에서 생육(catabolic repression)된 세포(start)에 영양 공급 후, 즉 catabolic derepression 되면서, 전 배양기를 통해 급격한 glycogen의 합성을 나타냈으며, 무기인산의 첨가 배양에 따라 총 glycogen의 축적은 높아졌으며, 알칼리 가용성 glycogen의 합성은 특이하게도 medium내의 glucose가 많이 소모된 24시간 이후에 나타났다. 이같이 catabolic derepression 되면서 당의 소모가 일어난 정체기 때까지 glycogen의 합성이 높아지는 현상은 Quain 등(1979)의 연구결과와 일치할 뿐 아니라, *S. carlsbergensis*를 재료로 glycogen의 축적과 분해에 관련된 효소의 활성도 조절 연구(Becker, 1982)에서 glycogen synthase는 constitutive enzyme이므로 정체기 때까지 지속적인 glycogen 합성이 가능하다는 연구 결과와도 유관하다.

본 연구에서도 당과 인산이 결핍된 배지에서 생육된 세포는 glycogen의 함량이 감소되었다. 그러나 당이 공급된 후에는 glycogen의 함량이 지속적으로 증가되는 현상을 보였다. 또한 최소배지와 비교하여, 완전배지에서 생육된 세포에서 포도당 소모가 일어나는 stationary phase때 최대 양적 동태를 나타낸 것은 상기의 보문과 관련이 있다. 그러나 최소 배지의 경우, 무기인산 첨가농도에 따라 거의 일정한 비율로 glycogen의 합성이 증가하는 것은, 전 배양시기를 통해 glycogen의 합성에도 배지에 존재하는 무기인산의 농도가 영향을 미치는 것으로 나타났다. 즉 이와 같은 현상은 무기인산이 결핍된 배지에서 배양된 세포(PO)는 배양함에 따라 기능적인 무기인산의 고갈 및 이미 세포질에 분포된 무기인산(poly-P-"A")마저도 거의 소모되어(Lee et al., 1985, I, II, III), 당이 흡수될 때 수행되는 인산화반응이 일부 차단되었기 때문으로 생각된다.

또 mannan과 glucan의 합성과정(Fig. 5,6)에서, mannan은 catabolic derepression되면서, 세포분열이 왕성히 일어나는 exponential phase 초기때 최대양을 나타내고, 당이 소모되는 stationary phase때도 많은 축적량을 보였다. glucan의 합성은 완전배지에서 배양했을 경우 역시 stationary phase때를 제외하고는 거의 일정한 양을 나타내었다. 이와 같이 mannan과 glucan의 합성이 catabolic derepression시 및 정체기때 일어나는 것(Fig. 5)은 Quain and Haslam(1979)의 보문과 일치한다.

그러나 mannan과 glucan의 합성에 있어, 특기할 만한 사실은 완전 배지(YE) 혹은 Pi sufficient(P1)배지에서 배양된 세포에 비해, 무기인산 결핍(PO) 또는

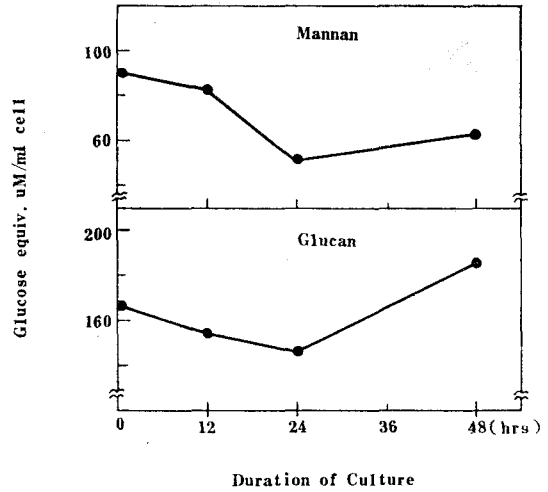


Fig. 5. Changes in amount of structural polysaccharides such as mannan and glucan during growth on YE medium.

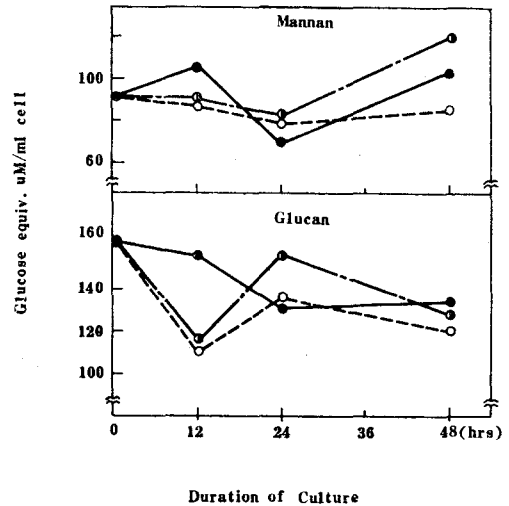


Fig. 6. Changes in amount of structural polysaccharides such as mannan and glucan during growth on minimal medium in absence or sufficiency of Pi source. Symbols are the same as the previous Figure.

저농도(P1/5) 배지에서 배양된 세포에 당을 공급했을 지라도 12시간 배양시기에 합성현상이 나타나지 않고 감소하다가 24시간 배양시 늦게 합성이 일어난 점이다. 이는 무기인산 공급 부족으로 인한 glucan, mannan의 생합성 경로가 지연된 때문으로 생각되어진다. 이를테면, 효모 세포벽 성분인 glucan의 생합성의 경우, ATP 또는 GTP와 ALPase에 의해서 glucan합성효소

가 활성이 조절된다(Shematek *et al.*, 1980)고 하였는데, 본 실험에서는 ALPase isoenzyme type중, 무기인산 결핍배지에서 생육된 세포에서 ALPase "C"가 나중에 활성을 띠는 것으로 보아(Lee *et al.*, 1985, IV), ALPase "C"가 glucan 합성에 관련이 있을 것으로 생각된다.

#### 다당류와 무기 폴리인산과의 관계

다당류 합성과 폴리인산의 축적량(전보, Lee *et al.*, 1985, I, II)과의 상관 관계를 구한 결과, mannan의 합성과 폴리인산 "C"형 사이에서 상관 계수가 0.866 ( $y=6.368 \times 10^{-3}x-0.0714$ )로 나타나, Tsiomenko 등(1975)이 *S. carlsbergensis*를 재료로 나타낸 0.813보다 더 유의한 상관지수를 보였다. 세포분열에 관련있는 mannan과 phospholipid의(Lee *et al.*, 1985, I, II) 상관 계수는 0.726( $y=0.141x+11.7503$ )로 매우 유의한 관련이 있었다.

#### 적 요

본 연구는, catabolic repression시킨 효모세포를 완전배지와 최소배지에서 derepression시켜, 배양시기 및 인산 첨가농도(free, limited, sufficient)에 따른 5종의 다당류 합성변화를 조사하였다. 그리고 다당류 합성과 무기폴리인산 축적량 및 인지질 합성 사이의 상관지수를 구하여 합성시 관련되는 유의한 정도를 검정하였다.

그 결과, 최소배지에서 catabolic derepression시킨 효모세포가, 완전배지에서 derepression시킨 세포에 비하여, glycogen의 합성이 빨리 그리고 많이 일어났고, acid soluble glycogen type이 주된 합량을 나타내었으며, alkali soluble glycogen은 당이 많이 소모된 24시간 배양 후에 소량 나타났다.

무기인산 첨가정도에 따라 total glycogen 합성이 일정한 비율로 빨리 그리고 높게 일어났다.

Glucan의 합성에는 ALPase 중 ALPase "C"가 관련할 것으로 추정되었다.

Mannan은 exponential phase초기와 정체기때, acid soluble 분획은 정체기때 최대합량을 나타내었다.

Mannan 합성과 poly-P "C"축적량 사이의 상관지수는 0.866, mannan 합성과 인지질 사이의 상관지수는 0.726으로 나타나 매우 유의하였다.

#### 문 헌

Becker, J.U. (1982): Mechanisms of regulation of

glycogen phosphorylase activity in *Saccharomyces carlsbergensis*. *J. Gen. Microbiol.* 128:447-454.

Becker, J.U., Shehata, M.I. and Mizani, S.M. (1982): Influence of nitrogen source on glycogen metabolism in *Saccharomyces carlsbergensis*. *J. Gen. Microbiol.* 128:455-461.

Costa-Carvalho, V.L.A., Panek, A. and Matton, J.R. (1978): Effects of carbon source and genetic modifications of phosphoglucosylase in trehalose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS. Microbiology letters* 4:221-224.

Fleet, G.H. and Manners, D.J. (1977): The enzyme degradation of an alkali-soluble glucan from the cell walls of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Microbiol.* 98:315-327.

Hutchins, K. and Bussey, H. (1983): Cell wall receptor for yeast killer toxin: Involvement of 1,6-beta-D-glucan. *J. Bacteriol.* 154:161-169.

Lee, K.S. and Choi, Y.K. (1985): I. Studies on the activities of ALPase, ACPase, ATPase and accumulation of volutin granules upon growth phase in *Saccharomyces uvarum*. *Kor. J. Microbiol.* 23:2 (in press).

Lee, K.S. and Choi, Y.K. (1985): II. Studies on the changes in activities of ALPase, ACPase, ATPase and synthesis of volutin granules upon phosphate concentration in *Saccharomyces uvarum*. *Kor. J. Microbiol.* 23:2 (in press).

Lee, K.S. and Choi, Y.K. (1985): III. Cytochemical observation of volutin granules and activities of tripolyphosphatase and polyphosphatase in *Saccharomyces uvarum*. *Kor. J. Mycol.* 13:141.

Lee, K.S. and Choi, Y.K. (1985): IV. Isoenzyme (ALPase, ACPase) pattern during catabolic repression and derepression in *Saccharomyces uvarum*. *Kor. J. Microbiol.* 23:3 (in press).

Nakajima, T. and Ballou, C.E. (1974): Structure of the linkage region between the polysaccharide and protein parts of *Saccharomyces cerevisiae* mannan. *J. Biol. Chem.* 249:7685-7694.

Ortiz, C.H., Maia, J.C.C., Tenan, M.N., Brazpadrao, G.R. and Mattoon, J.R. (1982): Regulation of yeast trehalase by a monocyclic, cyclic AMP-dependent phosphorylation-dephosphorylation cascade system.

Lee and Choi: Changes in Amounts of Polysaccharides and Polyphosphates in Yeast (V)

- J. Bacteriol.* 153:644-651.
- Panek, A. and Mattoon, J.R. (1977): Regulation of energy metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. Relationship between catabolite repression, trehalose synthesis and mitochondrial development. *Arch. Biochem. Biophys.* 183:306-316.
- Quain, D.E. and Haslam, J.M. (1979): Changes in glucose-6-phosphate and storage carbohydrates during catabolite depression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 113:195-198.
- Shematek, E.N., Braatz, J.A. and Cabib, E. (1980): Biosynthesis of the yeast cell wall. *J. Biol. Chem.* 255:888-894.
- Shematek, E.M. and Cabib, E. (1980): Biosynthesis of the yeast cell wall. *J. Biol. Chem.* 255:895-902.
- Shibata, N., Mizugami, K., Takano, K. and Suzuk, S. (1983): Isolation of mannan-protein complexes from viable cells of *Saccharomyces cerevisiae* X2180-1A wild type and *Saccharomyces cerevisiae* X2180-1A-5 mutant strains by the action of zymolase-60,000. *J. Bacteriol.* 156:552-558.
- Trevelyan, W.E. and Harrison, J.S. (1956): Studies on yeast metabolism, yeast carbohydrate fractions, separation from nucleic acid, analysis and behavior during anaerobic fermentation. *J. Biochem.* 63:23-33.
- Tsiomenko, A.B., Augustin, I., Vagabov, V.M. and Kulaev, I.S. (1975): The interrelationship of the metabolism of inorganic polyphosphatase and mannan in yeast (in Russian). *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, 215:478.
- Van Steveninck, J. and Booi, H.L. (1964): The role of polyphosphate in the transport mechanism of glucose in yeast cells. *J. Gen. Physiol.*, 58:43.

<Received August 8, 1985;

Accepted September 30, 1985>