

*Saccharomycopsis lipolytica*의 산 생산에 미치는 Itaconate의 영향

남궁 석·조석금*

서울보건전문대학 식품영양학과, *안양공업전문대학 식품영양학과

Effect of Itaconate on Acid production of *Saccharomycopsis lipolytica*

Sok NamKung and Seok-Gum Cho

Dept. of Food and Nutrition, Seoul Health Junior College, Seoul, 100-013, Korea

*Dept. of Food and Nutrition, Anyang Technical College, Anyang, Kyengki, 171, Korea

Abstract

Effect of itaconate upon citrate and isocitrate production of *Saccharomycopsis lipolytica* were investigated. The percent inhibition of isocitrate lyase activity was about 80% at 0.8 mM itaconate concentration, with K_i value of 0.17 mM in the cleavage reaction. Inhibitory effect of itaconate at 20 mM on *S. lipolytica* growth was significant on n-hexadecane medium, whereas almost no inhibitory effect on glucose medium. Increasing itaconate concentration in n-hexadecane medium improved isocitrate production up to 80% but no difference was found in glucose medium.

서 론

*Saccharomycopsis lipolytica*는 절대호기성 출아효 모로서 당질뿐만 아니라 유지류의 자화성이 우수하고, 특히 n-alkane의 자화성은 이 효모의 특징이다.¹²⁾ 한편 Tabuchi 등³⁶⁾이 본 효모가 citrate와 isocitrate를 배지중에 축적한다고 보고한 이래 산 생산에 관한 많은 연구가 진행되어^{7,8)} 이 효모는 *Aspergillus niger* 대신에 citrate 생산 균주로서 공업적으로도 이용 가능하게 되었다.

Glyoxylate 회로는 곰팡이¹⁰⁾, 세균¹¹⁾, 조류¹²⁾, 고등식물의 종자¹³⁾ 및 선충류¹⁶⁾등이며, 미생물이 C₂화합물 또는 궁극적으로 C₂화합물로 전환되는 기질을 탄소원으로 이용하여 생육할 때에는 TCA회로의 중간체를 보충하기 위하여 이 회로가 절대적으로 필요하다.²⁾ 이와같이 TCA회로와 glyoxylate 회로의 공통적 대사산물인 threo-D₃-isocitrate를 succinate와 glyoxylate로 분열하는 반응을 촉매하는 branch point 효소인 isocitrate lyase(threo-D₃-isocitrate

lyase, EC 4.1.3.1)는 glyoxylate 회로의 지표 효소로서 중요하다.¹⁷⁾

Itaconate는 세균¹⁸⁾과 고등식물 종자¹⁹⁾ isocitrate lyase의 강한 저해제로서 효소의 개열반응시 succinate가 먼저 해리된 후 glyoxylate에 결합하여 저해한다고 알려져 있다. 그러므로 itaconate는 isocitrate lyase, 즉 glyoxylate회로로 대사되는 생육세포를 특이적으로 저해하여 citrate와 isocitrate의 생산량에 변화를 가져올 가능성이 있다. 이러한 관점에서 저자등은 itaconate가 citrate와 isocitrate의 생산량에 미치는 영향을 조사하기 위하여 몇가지 기초실험을 행하여 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

사용균주 및 기본배지

본 연구에 사용된 균주는 *Saccharomycopsis lipolytica* IFO 1209를 사용하였다.

완전배지는 Matsuoka²⁾ 등이 사용한 배지, glucose 배지와 n-hexadecane 배지는 저자²⁰⁾ 등이 사용한

산 생산용 배지를 사용하였다. 모든 배지는 121°C에서 15분간 살균하였다.

배양과 발효조건

Citrate와 isocitrate의 생산은 산 생산배지(100ml / 500ml 용 진탕 flask)에서 배양온도 30°C, 진탕속도 120 strokes / min, 진폭 7cm의 조건에서 진탕배양하였다. 1ml의 완전배지에서 1일간 배양한 seed culture는 glucose배지에 접종하였다. 한편 2%(v/v) n-hexadecane, 2% peptone, 1% yeast extract 조성의 배지에서 배양한 seed culture는 n-hexadecane 배지에 접종하여 배양하고 pH 4 이하로 내려갈 때 살균한 CaCO₃ 1g을 첨가하였다.

분석방법

Citrate와 isocitrate는 먼저 1N HCl용액으로 2배로 희석하여 잔존 CaCO₃를 용해한 후 4,000×g에서 10분간 원심분리하고 glass paper(GS 25 Toyo Roshi Co.)로서 여과한 후 각각 Stern²¹의 Pentabromoacetone 방법과 isocitrate dehydrogenase를 사용한 방법에 따라서 측정하였다.

균의 생육도는 1NHCl 용액으로 산성화한 배양액을 탄소원이 glucose 배지일 때에는 탈이온수로 희석하고, 그리고 n-hexadecane 배지는 혼합유기 용매(n-butanol : ethanol : chloroform=10 : 10 : 1, v/v)로 적정 희석하여 660nm에서 흡광도를 측정하여 균의 생육도로 하였다. 건조균체량은 660nm에서 흡광도를 측정한 후 건조균체량으로 환산하였다.

세포의 Toluene 처리

in situ에서 isocitrate lyase활성을 측정하기 위하여 먼저 세포를 toluene 처리하였다²². 즉 원심분리(5,000×g, 5분)하여 집균한 효모세포를 75mM imidazole HCl 완충액(pH 7.0), 0.1 M KCl, 10mM MgCl₂ 조성의 혼합액으로 희석하여 OD₆₆₀가 약 10이 되도록 현탁하였다. 2ml의 세포현탁액을 시험관에 취한 후 toluene ethanol-Triton X-100(1 : 4 : 0.02, v/v/v)혼합액 0.1ml를 첨가하고, vortex mixer로서 5분간 연속적으로 교반하여 투과성으로 만들었다. Toluene처리 전후는 교반중 발열에 의한 실험을 방지하기 위하여 현탁액을 냉각(氷冷)하였다.

효소활성 측정

Isocitrate lyase활성의 측정은 67mM potassium phosphate 완충액(pH 6.85), 5mM MgCl₂, 1.7mM dithiothreitol, 3.3mM DL-isocitrate 조성의 반응혼합액에 toluene 처리한 세포현탁액을 1.0~0.2ml 가하여 전량을 3ml로 하였다. 반응은 30°C에서 isocitrate를 첨가함으로써 시작되었고, 반응후 100%(w/v) trichloroacetic acid 용액 0.6ml 첨가하여 반응을 정지시켰다. 반응 정지후 냉각하고 원심분리(4,000×g, 5분, 4°C)로 균체를 제거한 상정액의 glyoxylate 농도를 Khan 등¹³의 방법에 따라 E₃₂₀에서 비색정량하였다.

결과 및 고찰

Isocitrate lyase의 유도

Glucose 배지와 n-hexadecane 배지에서 효소의 생성상태를 조사한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 탄소원으로 glucose를 사용한 배지에서 생육한 균주의 효소활성은 억제된 낮은 level로 존재하였지만 n-hexadecane을 사용한 배지에서는 효소활성이 배양 2일까지 거의 직선적으로 증가하여 최고치에 도달하였고, 그 후 활성이 빠르게 감소한 후 완만한 감소를 나타내었다.

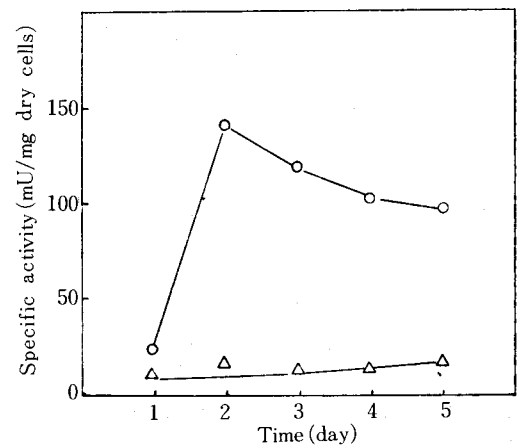


Fig. 1. Time course of isocitrate lyase specific activity in glucose medium and n-hexadecane medium.

Symbols: -○- n-hexadecane medium, -△- glucose medium.

따라서 이 효소는 유도성 효소이며 isocitrate lyase, 즉 glyoxylate 회로가 n-hexadecane의 대사에는 필수적이다^{3),23)}.

Itaconate에 의한 isocitrate lyase의 저해

Itaconate와 phosphoenolpyruvate는 isocitrate lyase의 강한 저해제로 알려져 있다^{18),24)}. n-Hexadecane 배지에서 2일간 배양한 다음 toluene를 가하고 5분간 반응시킨 후 효소활성을 측정하여 저해율을 조사한 결과 Fig. 2에서 보는 바와같이 itaconate는 in situ에서 이 효소의 활성을 강하게 저해하며 0.83mM(점선) 농도에서는 약 80%의 저해율을 나타내었다. 반면에 phosphoenolpyruvate는 같은 농도에서 10% 이하의 저해율을 나타내었다.

n-hexadecane배지에서 2일간 배양한 후 toluene 처리하며 투과성으로한 세포를 사용하여 itaconate의 여러가지 농도에서 기질 농도를 변화시키면서 isocitrate의 개열반응 속도를 측정하고 Lineweaver-Burk plot한 결과 Fig. 3와 같이 itaconate는 개열반응에서 직선적인 불경쟁적 저해를 나타내었으며 저해상수 K_i 값은 intercept replot로부터 0.18mM이었다. 세균¹⁸⁾과 고등식물 종자²⁴⁾에서의 개열반응에 대한 저해양식은, 세균은 직선적인 불경쟁적 저해를 고등식물 종자는 직선적 비경쟁적 저해를 나타낸다고 보고되었다. 그러므로 본 결과는 고등식물 종자

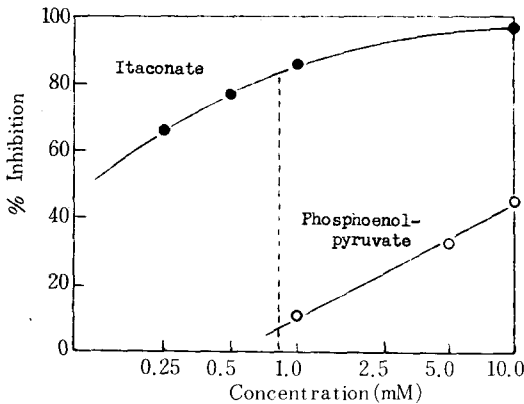


Fig. 2. Inhibition of isocitrate lyase activity by itaconate.

Toluen treated cells were prepared from cells grown for 2 days in n-hexadecane medium. The reaction of isocitrate lyase were conducted at 30°C in presence of itaconate and phosphoenolpyruvate, and the percent inhibition were measured relative to a control to which no inhibitor was added.

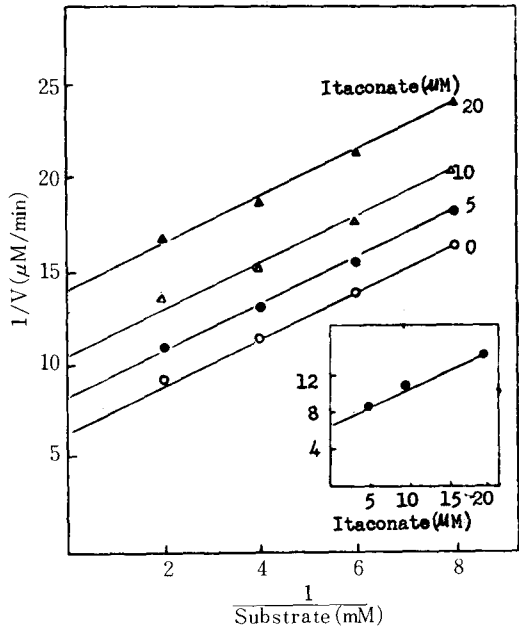


Fig. 3. Lineweaver-Burk plot for the inhibition of isocitrate cleavage by itaconate in toluene treated cells.

The inset shows a replot of the intercept. Toluene treated cells grown in n-hexadecane medium for 2 days.

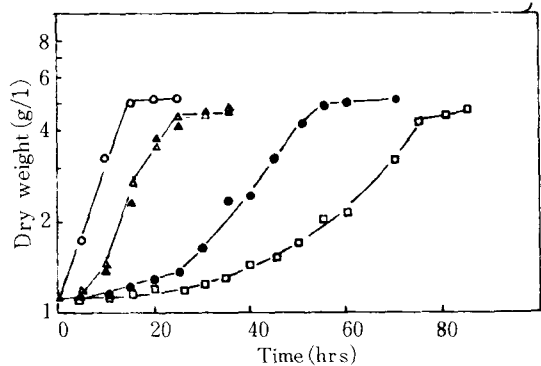


Fig. 4. Effect of itaconate upon growth of cells.

Symbols : -△- glucose medium, -▲- glucose medium plus 20 mM itaconate, -○- n-hexadecane medium, -●- n-hexadecane medium plus 10 mM itaconate, -□- n-hexadecane medium plus 20 mM itaconate.

보다는 세균의 결과와 일치하였다.

균의 생육에 대한 itaconate의 영향

glucose배지와 n-hexadecane배지에 itaconate를 여러가지 농도로 첨가하여 균의 생육도를 조사한 결과는 Fig. 4와 같다. glucose배지에 20mM itaconate

를 첨가하여도 균의 생육에는 거의 영향을 미치지 않았지만 n-hexadecane배지에서는 itaconate의 첨가량을 20mM까지 증가시키기에 따라 균의 생육은 심하게 저해되었다.

이 결과는 glucose배지에서 isocitrate lyase가 거의 생산되지 않지만 n-hexadecane배지에서는 이 효소가 유도되기 때문에 생각되며 (Fig. 1), McFadden 등¹⁶⁾은 *Pseudomonas indigofera*가 itaconate에 의해 탄소원으로서 glucose를 사용한 배지에서는 생육에 거의 영향을 미치지 않지만 ethanol을 사용한 배지에서는 생육을 저해한다고 보고한 바 있다.

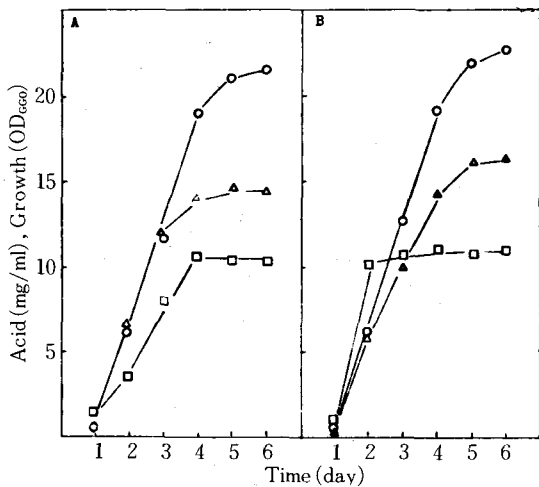


Fig. 5. Production of citrate and isocitrate in glucose medium(A) and n-hexadecane medium(B).

Symbols: -○- citrate, -△- isocitrate, -□- OD₆₀₀

Table 1. Effect of itaconate upon production of citrate and isocitrate

Itaconate conc. (mM)	Isocitrate / Total acid	
	n-hexadecane	Glucose
0	0.40	0.46
10	0.57	0.48
20	0.69	0.48
30	0.78	0.45
40	0.80	0.46
50	0.79	0.46

Cells were grown at 30°C for 5 days in n-hexadecane medium and glucose medium containing specified itaconate concentration.

산 생산에 대한 itaconate의 영향

탄소원으로써 glucose와 n-hexadecane을 사용한 배지에서의 균체생육과 산 생산을 Fig. 5에 나타내었다. isocitrate의 생산량은 일반적으로 citrate의 20~30% 정도 생산한다고 알려진 바와 같이⁵⁾ citrate의 생산량 보다 적었으며, citrate와 isocitrate의 생산량은 glucose배지 보다 n-hexadecane배지에서 많았다.

균체를 itaconate를 첨가한 두 배지에서 배양하여 총산에 대한 isocitrate의 생산비율을 조사한 결과 Table 1에서 보는 바와 같이 n-hexadecane배지에서는 itaconate의 농도를 40mM까지 증가시키기에 따라 isocitrate의 생산비율은 약 80%까지 증가하였으나 glucose배지에서는 isocitrate의 생산 비율에 변화가 없었다. 한편 총산의 생산량과 생산속도는 itaconate를 첨가하여도 두 배지에서 모두 전혀 변화가 없었다. Matsuoka 등²⁾은 isocitrate lyase활성이 야생형 균주의 약 30%인 결손변이 균주가 야생형 균주보다 탄소원으로 n-hexadecane을 사용한 배지에서 isocitrate 생산이 많았다고 보고하여 효소의 활성에 따라 isocitrate의 생산비율이 다를 수 있음을 시사한 바 있다. 그러므로 Isocitrate lyase의 활성을 저해하면 n-hexadecane배지에서 isocitrate의 생산비율이 크게 증가한 결과는 isocitrate와 citrate의 생산비율이 isocitrate lyase활성의 변화에 감수성이기 때문으로 사료된다.

요 약

*Saccharomycopsis lipolytica*의 citrate와 isocitrate의 생산에 미치는 itaconate의 영향을 조사하였다.

Itaconate는 isocitrate lyase의 활성을 저해하며 저해율은 0.8mM 농도에서 약 80% 이었고, 개별반응에서는 직선적인 불경쟁적 저해를 나타내었으며 저해상수 K_i 값은 0.18mM이었다. Itaconate는 glucose배지에서는 균의 생육에 영향을 미치지 않았지만 n-hexadecane 배지에서는 균의 생육을 심하게 저해하였다.

한편 itaconate의 첨가량을 증가시키기에 따라 총산에 대한 isocitrate의 생산 비율은 n-hexadecane배지에서는 약 80%까지 증가하였으나 glucose배지에서는

서는 거의 변화가 없었다.

문헌

1. Esser, K. Stahl, U : Cytological and genetic studies of the life cycle of *Saccharomycopsis lipolytica*, *Mol. Gen. Genet.*, **146**, 101(1976)
2. Matsuoka, M. Ueda, Y. Aiba S : Role and control isocitrate lyase in *Candida lipolytica*, *J. Bact.*, **144**, 92(1980)
3. 阿部父三, 田淵武士, 田中優行 : 酵母9有機酸醱酵に関する研究(第3報), *日農化*, **44**, 493(1970)
4. 田中優行, 田原康孝, 田淵武士, 阿部父三 : 酵母9有機酸醱酵に関する研究(第4報), *日農化*, **44**, 499(1970)
5. 田淵武士, 田中優行, 田原康孝, 阿部父三 : 酵母の有機酸醱酵に関する研究(第5報), *日農化*, **44**, 562(1970)
6. Tabuchi, T., Igoshi, K. : Regulation of enzyme synthesis of the glyoxylate, the citric acid, and the methylcitric acid cycles *Candida lipolytica*, *Agr. Biol. Chem.*, **42**, 2381(1978)
7. Akiyama, S., Suzuki, T., Sumino, Y., Nakao, Y., Hukuda, H. : Induction and citric acid productivity of fluoracetate sensitive mutant strains of *Candida lipolytica*, *Agr. Biol. Chem.*, **37**, 879(1973)
8. Hattori, K., Yokoo, S., Imada, O. : Effect of ammonia ion on the ratio of citric acid to d-isocitric acid formed from n-paraffin, *J. Ferment. Technol.*, **52**, 542(1974)
9. Furukawa, T., Ogino, T., Matsuyoshi, T. : Fermentative Production of citric acid from n-paraffins by *Saccharomycopsis lipolytica*, *J. Ferment. Technol.*, **60**, 281(1982)
10. Johanson, R. A., Hill, J., McFadden, B. A. : Isocitrate lyase from *Neurospora crassa*. I. Purification, Kinetic mechanism, and interaction with inhibition, *Biochim. Biophys. Acta*, **364**, 341(1974)
11. McFadden, B. A., Rao, G. R., Cohen, A. L., Roche, T. E. : Isocitrate lyase from *Pseudomonas indigofera*. V. Subunits and terminal residues and the relation to catalytic activity, *Biochemistry*, **7**, 3574(1974)
12. John, P. C. L., Syrett, P. T. : The Purification and properties of isocitrate lyase from *Chlorella*, *Biochim. J.*, **105**, 409(1967)
13. Khan, F. R., Sallemuddin, M., Siddgi, M., McFadden, B. A. : Genetics and function of isocitrate lyase in *Coprinus*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **183**, 13(1977)
14. Heiss, U., Rothstein, M. : Isocitrate lyase from the free-living *Nematode*, *Biochemistry*, **13**, 1796(1974)
15. Colona, W. J., Mcfadden, B. A. : Isocitrate lyase from parastic and free-living *Nematodes*, *Arch. Biochem. Biophys. Acta*, **170**, 608(1975)
16. Mcfadden, B. A., Purohit, S. : Itaconate, and isocitrate lyase-directed inhibition in *Pseudomonas indigofera*, *J. Bacteriol.* **131**, 16(1977)
17. Laporte, D. C., Walsh, K., Koshland, D. E., Jr. : The brench point effect, *J. Biol. Chem.*, **259**, 14068(1984)
18. Williams, J. O., Roch, T. E., McFadden, B. A. : Mechanism of action of isocitrate lyase from *Pseudomonas indigofera*, *Biochemistry*, **10**, 1384(1971)
19. Rithenhous, J. W., McFadden, B. A. : Inhibition of isocitrate lyase from *Pseudomonase indigofera* by itaconate, *Arch. Biochem. Biophys.*, **163**, 79(1974)
20. 조석금, 정동효 : Heterothallic *Saccharomycopsis lipolytica*의 유성생활환의 유전적 해석, *한국농화학회지*, **29**, 3(1986)
21. Stern, J. R. : *Method in Enzymology*, 3. p.425, S.P. Colowick, N. O. Kaplan, eds., Academic Press, New York(1967)
22. Serrano, R., Gancedo, J. H., Cancedo, C. : Assay of yeast enzymes *in situ*, *Eur. J. Biochem.*, **34**, 479(1973)
23. Kornberg, H. L. : The role and control of the glyoxylate cycle in *Escherichia coli*, *Biochem. J.*, **99**, 1(1966)
24. Khan, F. R., McFadden, B. A. : Isocitrate lyase from *Flax*, *Plant Physiol.*, **70**, 943(1982)

(Received August 31, 1988)