

Chlorella ellipsoidea 葉綠體膜의 磷脂質 및 脂肪酸 代謝에 미치는 抗生劑의 效果

김연심 · 서광석* · 이종삼

성신여자대학교 자연과학대학 생물학과, *경기전문대학 환경공업과

Effect of Antibiotics on the Phospholipid and Fatty Acid Metabolism of Chloroplast Envelope in *Chlorella ellipsoidea*

Yeon-Sim Kim, Kwang-Seok Seo* and Chong-Sam Lee

Department of Biology, College of Natural Sciences, Sungshin Women's University

*Department of Environmental Engineering, Kyunggi Junior College

ABSTRACT

The effects of amphotericin B (150 µg/ml) and cycloheximide (10 µg/ml) on the biosynthesis of phospholipid and their fatty acid composition in chloroplast isolated from *Chlorella* were analyzed to compare with control. The levels of total lipid, phosphatidylethanolamine (PE), and phosphatidylcholine (PC) in the group treated with antibiotics were decreased. However, the biosynthesis of phosphatidylinositol (PI) was not affected by antibiotics. The major fatty acid in chloroplast envelope was linolenic acid (27.71%) in control and stearic acid (21.59%) in the group treated with amphotericin B. It was showed that the group treated with cycloheximide contained more unsaturated fatty acid than the control.

Keywords: *Chlorella*, antibiotics, fatty acid, phospholipid chloroplast envelope.

I. 서 론

모든 생체막은 지질과 단백질 구조(lipoprotein structure)로 되어 있으며,⁹⁾ 특히 이들 구성성분 중 지질은 막 전체 무게의 20~30%를 차지한다.²³⁾ 또한 막 지질은 수용성 물질의 투과를 저해하고 막을 구성하고 있는 단백질의 기질(matrix)로 작용한다.⁶⁾ 이외에 지질의 기능은 막의 투과성, 유동성 및 막에 분포된 효소의 활성도를 조절하여 세포의 대사를 촉진시킨다.^{34, 35)}

엽록체에는 translocator가 존재하여 대사물질을 운반하고,^{16, 18)} 엽록체 막의 주요 구성성분인 당 지질 등 여러 가지 물질의 생합성이 일어나는 부위이며,⁸⁾ 활성화한 long-chain acyl coenzyme A synthetase가 함유되어 있다.

엽록체 막은 생체막 지질의 포화 정도나 탄소수에 따라서 유동성이 결정된다. 엽록체 막의 인지질은 세포질의 지질조성 중 주요 요소이고, 이들

인지질로는 phosphatidylethanolamine(PE), phosphatidylcholine(PC), phosphatidylinositol(PI)이 있다.³¹⁾

인지질은 온도변화^{17, 24, 28)} 광선의 존재 유무,³⁷⁾ 배지조성 변화,³⁶⁾ NaCl농도³²⁾ 등에 기인해서 인지질의 함량과 지방산 조성변화에 영향을 받는다. 특히 인지질은 여러 가지 항생제에 의해 영향을 받는데 그 효과에 관한 연구도 많이 이루어졌다.^{3, 12, 20, 42, 46)}

*Saccharomyces cerevisiae*에 cycloheximide(10 µg/ml)를 처리하면 현저한 생장 억제현상을 볼 수 있다.¹⁴⁾ 또한 녹조류나 규조류에서는 cycloheximide에 의한 생장 억제현상을 볼 수 있으나, 남조류에서는 그 효과가 적게 나타난다.²⁰⁾

*S. cerevisiae*를 cycloheximide(1~5 µg/ml)를 첨가한 배지에서 생육시키면 당발효에 현저한 저해현상이 관찰된다.¹⁴⁾ 또한 포유류의 tumor cell은 nucleotide reductase를 억제하여 DNA합성이 현저히 억제되므로 단백질의 합성도 저해된다.³⁾

단세포 녹조류인 *Chlorella* 세포도 15 μ M cycloheximide를 처리하면 이와 비슷한 저해현상이 관찰되어 단백질은 물론 DNA와 RNA의 합성에도 현저한 억제작용을 볼 수 있다.⁴⁶⁾ Van Zutphen 등⁴⁴⁾은 amphotericin B를 egg lecithin에 처리하면 막의 투과성을 변화시키고 막의 손상을 유발하여 생장을 억제시키고 세포의 용해를 유발한다고 하였다.

Amphotericin B를 liposome과 *Achoeplasma laidawii*에 처리하면 sterol과 결합하여 막공을 형성하므로 막 투과성의 변화를 유발하고 이로 인한 세포내 물질대사의 변화가 초래되어 막을 구성하는 인지질의 조성변화를 일으킨다.²¹⁾

이와 같이 여러 가지 환경조건이 세포대사에 미치는 영향에 관한 보고는 많이 되어 있으나 막계를 구성하는 인지질의 함량 및 그의 지방산 조성변화와 항생제와의 상호작용을 관찰한 보고는 거의 없다.

본 연구는 DNA합성 및 단백질 합성을 저해하는 cycloheximide와 막공을 형성하여 막의 투과성을 변화시킴으로써 세포내 물질대사에 변화를 초래하는 amphotericin B를 처리한 배지에서 생장한 *Chlorella ellipsoidea*의 엽록체 막을 분리하여 이들 막의 인지질 함량과 지방산의 변화를 대조구와 비교 분석하여 항생제가 인지질 대사에 미치는 효과를 확인하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. *Chlorella* 배양

Cycloheximide 10 μ g/ml(Sigma)와 amphotericin B 150 μ g/ml(Sigma)를 처리한 M4N배지⁴¹⁾에 *Chlorella*를 접종하였다. 배양기간 중 25°C에서 CO₂가 포함된 공기를 통기하면서 2 K lux의 광량을 지속적으로 조사하였다. 배양기간 동안 세포 생장은 packed cell volume을 측정하였다.

2. 엽록체의 분리

배양 초와 배양 중간기에 세포를 수확하여 이들 세포에서 엽록체의 분리는 Lyttleton³⁰⁾의 방법을 다소 수정하여 사용하였다. 즉, 수확한 세포를 0.002 M K₂SO₄로 2~3회 세척한 후 0.5 M phosphate buffer (pH 7.5, 0.4 M NaCl함유)에 현탁하여 sonicator(Sonics & Ins model VC 250B)로 마쇄시켰다. 마쇄된 세포를 500 g에서 4분간 원심분리(Sorvall RC-5B)하여 上澄液을 취하고 얻어진 침전물에 0.5 M phosphate buffer를 넣고 현탁시킨 후 다시 원심분리하여 上澄液을 모았다. 上澄液을 취하여 1,100 g에서 4분

간 원심분리하여 얻어진 上澄液을 1,200 g에서 10분간 다시 원심분리하여 침전된 엽록체를 다음 실험에 사용하였다.

3. 엽록체막의 분리

분리한 엽록체에서 엽록체 막 분리는 Poincelot³⁸⁾의 방법을 이용하였다. 수확한 엽록체를 0.5 M phosphate buffer에 현탁시켜 sonicator로 마쇄시키고 동량의 0.5 M phosphate buffer(pH 7.5, 0.4 M NaCl, 30% sucrose 함유)를 첨가한 후 2,000 g에서 4분간 원심분리하여 上澄液을 취하였다. 0.5 M phosphate buffer(pH 7.5, 0.4 M NaCl, 30% sucrose 함유)와 上澄液으로 얻어진 현탁액으로 sucrose gradient를 형성하고 초원심분리기(Sorvall ULTRA pro 80) 73,000 g에서 60분간 원심분리 하였다. 이어서 30%와 15% sucrose gradient 사이의 황색층을 뽑아내어 다시 초원심분리기로 47,000 g에서 60분간 원심분리하여 엽록체 막을 추출하였다.

4. Total lipid의 추출

엽록체 막을 조성하고 있는 지질의 추출은 Bligh와 Dyer⁴²⁾의 방법을 이용하였다. 분리한 막에 chloroform/methanol 혼합액(1:2, v/v)을 첨가하여 30분간 강하게 흔든 후 증류수를 첨가하여 혼합시킨 후 방치하여 분리시켰다. 분리된 chloroform과 methanol층 중 아래층인 chloroform층을 Whatmann No. 1 filter paper에 여과시켜 total lipid를 추출하였다. 상층인 methanol층에 chloroform를 첨가하여 혼합시킨 후 분리된 chloroform층을 동일 여과지에 여과시켰다. 추출한 total lipid를 40~50°C incubator에서 건조시켜 함량을 측정하였다.

5. 인지질의 분리와 동정

Turner와 Rouser의 방법⁴³⁾에 따라 엽록체 막에서 추출한 total lipid에 함유되어 있는 PE, PC, PI를 thin layer chromatography(TLC, Desaga)를 이용하여 분리 추출하였다. TLC는 glass plate(20×20 cm)에 silica gel(Merck, 60G)를 0.25 mm 두께로 입혀서 건조한 다음 사용 직전에 110~120°C의 dry oven에서 30~60분간 활성화시켜 사용하였다. 전개는 two-one dimension방법으로 수행하였으며, 1차 전개용매는 chloroform/methanol/28% ammonia water(65:25, 5 v/v)를 혼합해서 사용하였다. 2차 전개용매는 chloroform/acetone/methanol/acetic acid/distilled water(3:4:1:1, 0.5 v/v)를 혼합해서 사용하였다. 전개된 total lipid에서 각각의 인지질은

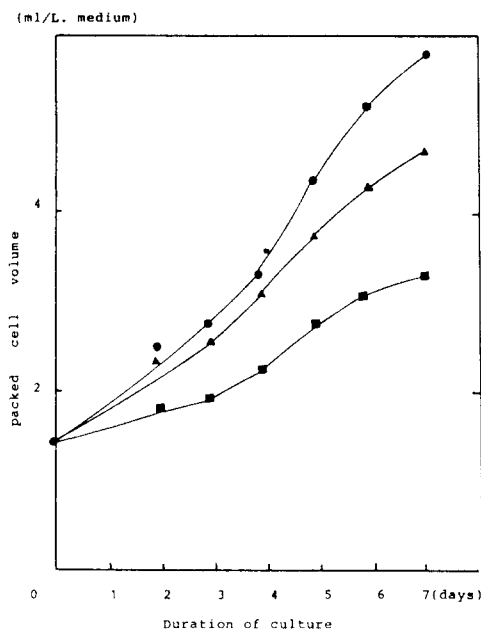


Fig. 1. Growth ratio of *Chlorella ellipsoidea* treated with antibiotics during the cultivation. (●-●) Control; (■-■) Amphotericin B; (▲-▲) Cycloheximide.

표준품(Sigma)과 비교 동정하였으며 PC의 경우는 Drogendro시약을, PI는 periodate shift시약을, PE는 saturated butanol에 0.2% ninhydrin을 용해한 시약을 발색제로 이용하였다.⁴⁰⁾

6. 지방산의 methyl ester화

지방산의 조성과 양적 변화를 분석하기 위해 Allen과 Good의 방법¹⁾에 따라 PE, PC, PI를 methyl ester화 시켰다. TLC plate에서 분리한 인지질에 5% 황산을 함유한 methanol과 internal standard인 heptadecanoic acid(Sigma)를 첨가하여 68~70°C incubator에서 120분간 방치한 뒤 냉각하여 증류수를 넣고 진탕하였다. 이어서 hexane을 넣고 강하게 흔들어서 hexane층을 분리하였으며, 이 분리조작을 3번 반복하였다. 추출한 hexane층에 포화된 sodium bicarbonate를 넣고 진탕하여 hexane층을 건조시켜 각 인지질의 fatty acid methyl ester의 함량을 측정하였다.

7. 지방산 조성분석

Gas chromatography(GC, Varian 3300)를 이용하여 인지질을 분석하였다. 지방산의 동정은 palmitic

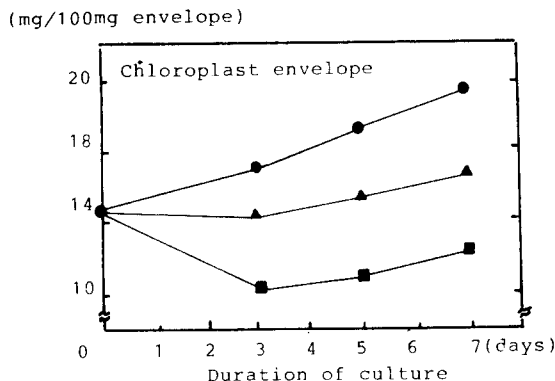


Fig. 2. Changes in contents of total lipid in chloroplast envelope of *Chlorella ellipsoidea* treated with antibiotics during the cultivation. (●-●) Control; (■-■) Amphotericin B; (▲-▲) Cycloheximide.

acid(16:0), stearic acid(18:0), oleic acid(18:1), linoleic acid(18:2), linolenic acid(18:3)의 표준품(Sigma)과 비교하여 결정하였다. 사용한 G.C. detector는 H₂-frame ionization detector이며 stainless steel column(3 mm×3 m)에 15% DEGS(diethylglycolsuccinate)를 충전하여 이용하였다. Injection port temperature는 230°C로, column temperature는 150°C를 유지시켰고, detector oven temperature는 250°C로 하였으며, carrier gas는 질소가스를 분당 30 ml 유속으로 주입하여 분석하였다.

III. 결 과

1. Chlorella 세포의 성장

배양기간 동안의 대조구와 처리구의 세포의 성장은 Fig. 1에 표시하였다.

대조구는 배양 초기보다 배양 말기에 4.1배의 성장 증가를 나타내었다. Amphotericin B(150 µg/ml) 처리구는 배양 초에 비해 배양 말기에 3.4배 증가하였고, cycloheximide(10 µg/ml) 처리구는 2.4배의 증가를 보였다. 이와 같은 결과로 미루어 보아 대조구에 비하여 amphotericin B 처리구는 17.07%, cycloheximide 처리구는 41.46%의 성장 억제율을 나타내었다. 그러므로 저해효과는 amphotericin B 처리구 보다 cycloheximide 처리구에서 뚜렷하게 관찰되었다.

2. Total lipid의 함량 변화

엽록체 막의 total lipid 함량 변화는 Fig. 2에 표

Table 1. Changes in contents of phospholipid in chloroplast envelope of *Chlorella ellipsoidea* treated with antibiotics during the cultivation

Treatment Phospholipid	0			3			5			7		
	Control	Control	Ampho.	Cyclo.	Control	Ampho.	Cyclo.	Control	Ampho.	Cyclo.		
Phosphatidyl-ethanolamine	1.73	1.91	1.27	0.71	2.28	1.08	0.88	2.75	1.23	1.18		
Phosphatidyl-choline	2.26	2.91	1.70	0.88	3.31	1.98	0.81	3.83	2.25	0.83		
Phosphatidyl-inositol	0.12	0.19	0.23	0.20	0.23	0.27	0.33	0.33	0.38	0.42		
Total	4.11	5.01	3.20	1.79	5.82	3.33	2.02	6.91	3.86	2.43		

mg/100 mg chloroplast membrane. Ampho. : Amphotericin B, Cyclo : Cycloheximide.

(mg/100 mg envelope)

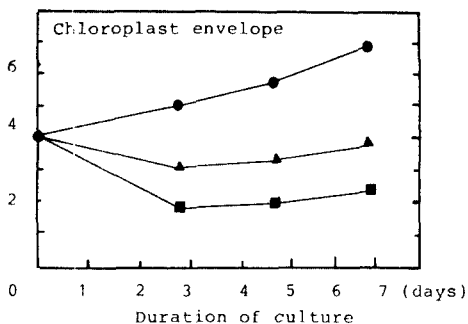


Fig. 3. Change in contents of total fatty acid methyl ester in chloroplast envelope of *Chlorella ellipsoidea* treated with antibiotics during the cultivation. (●-●) Control; (■-■) Amphotericin B; (▲-▲) Cycloheximide.

시하였다.

대조구는 배양초기에 비하여 지질 합성이 배양 3일에 18.48%, 5일에 36.97%, 7일에 52.77%의 함량 변화로 평균 36.07%의 증가를 보인 반면, amphotericin B 처리구에서는 대조구에 비하여 배양 3일에 18.47%의 지질합성 감소현상을 보였고, 배양 5일과 7일에는 23.18%와 24.20%로 계속적인 저해를 나타내어 생육기간 동안 21.95%의 억제효과가 관찰되었다.

또한, cycloheximide 처리시에는 배양 3일에 44.40%의 높은 감소율을 보였고, 배양 5일에는 48.44%, 배양 7일에는 46.74%의 저해현상을 보여 생육기간 동안 46.53%의 감소율이 조사되었다. 그러므로 생장기간 동안 엽록체 막 100 mg 당의 total lipid 평균량은 대조구의 경우 16.09 mg이며 대조구에 비해

amphotericin B 처리구는 13.22 mg으로 17.84%, cycloheximide 처리구는 10.06 mg으로 37.48%의 억제현상이 관찰되었다. 이로써 항생제 처리시 *Chlorella* 엽록체막의 total lipid의 양적 동태는 amphotericin B 처리구 보다 cycloheximide 처리구에서 억제효과가 더욱 현저하였다.

3. Total fatty acid methyl esters의 양적 변화

Fig. 3에 나타난 바와 같이 대조구의 total fatty acid methyl ester의 양적동태는 배양 3일에 21.90%, 5일에 41.61%, 7일에 68.13%로 생육기간 동안 43.88%의 증가를 보였다. Amphotericin B 처리구는 대조구에 비해 배양 3일, 5일, 7일에 각각 36.13%, 42.78%, 44.14%의 감소현상을 나타내 생육기간 동안 41.02%의 감소율을 보였고, cycloheximide 처리구의 경우는 배양 3일, 5일, 7일에 각각 64.27%, 65.29%, 64.83%로 평균 64.80%로 감소하는 경향이 나타났다.

4. 여러 가지 인지질의 함량 변화

Table 1에 인지질의 함량 변화를 나타내었다.

Table 1에 나타난 바와 같이 PE는 대조구의 경우 배양초기에 비해 배양말기에 평균 33.72%의 함성 증가를 보였다. 반면, amphotericin B 처리구는 대조구에 비해 배양 3일, 5일, 7일에 각각 33.51%, 52.63%, 55.27%의 억제현상을 보여 배양기간 동안 47.14%의 저해율이 조사되었다. Cycloheximide 처리구도 대조구에 비해 배양 3일, 5일, 7일에 각각 62.83%, 61.40%, 57.09%의 저해효과를 나타내 생육기간 동안 60.44%의 감소율로 항생제에 의한 PE 함성이 억제됨이 관찰되었다.

Table 1에 제시한 바와 같이 PC는 대조구의 경우

Table 2. Changes in contents of fatty acid methyl esters of phosphatidylethanolamine in chloroplast envelope of *Chlorella ellipsoidea* treated with antibiotics during the cultivation

Duration of culture (days)	0			3			5			7		
	Control	Control	Ampho.	Cyclo.	Control	Ampho.	Cyclo.	Control	Ampho.	Cyclo.		
Palmitic acid (16 : 0)	16.43	21.16	5.35	12.76	26.00	15.16	12.24	34.17	13.77	18.52		
Stearic acid (18 : 0)	—	0.41	31.82	11.90	3.57	23.05	21.50	4.00	3.09	—		
Oleic acid (18 : 1)	27.40	5.55	4.43	16.77	8.76	1.70	9.22	2.34	10.18	8.36		
Linoleic acid (18 : 2)	—	0.09	—	—	0.07	0.96	9.77	10.39	13.54	10.27		
Linolenic acid (18 : 3)	30.15	38.68	25.26	18.07	35.54	20.65	10.60	27.18	28.60	18.24		
Unknown	26.02	34.11	33.14	40.50	26.06	38.48	36.67	21.92	30.82	44.61		
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00		

Ampho. : Amphotericin B, Cyclo. : Cycloheximide.

배양기간 동안 평균 48.23%의 인지질 합성 증가율을 보였다. 반면, amphotericin B 처리구는 대조구에 비해 배양 3일, 5일, 7일에 41.58%, 40.18%, 41.25%의 감소로 생육기간 동안 41.00%의 감소율이 확인되었고, cycloheximide 처리구는 대조구에 비해 배양 3일, 5일, 7일에 69.76%, 75.53%, 78.33%의 저해효과로 생육기간 동안 74.54%의 상당한 억제율을 보였다.

Table 1에서와 같이 PI는 대조구에 비해 항생제 처리구에서의 합성율이 더욱 증가하는 것이 관찰되었다. 대조구의 경우 배양초기에 비해 배양말기에 2.75배 증가하였고, amphotericin B 처리구의 경우는 3.17배, cycloheximide 처리구는 3.5배의 PI합성 증가가 관찰되었다.

결론적으로 엽록체 막 100 mg당 PE의 평균량은 2.17 mg이며, amphotericin B 처리구는 1.33 mg이며 cycloheximide 처리구는 1.13 mg으로 각각 대조구에 비하여 38.71%, 47.93%의 억제율을 보였다. PC의 평균량은 3.08 mg이며 대조구에 비해 amphotericin B 처리구는 2.05 mg으로 33.44%, cycloheximide 처리구는 1.20 mg으로 61.04%로 PE, PC 생합성에 cycloheximide의 저해효과가 더욱 뚜렷한 것으로 나타났다. PI의 평균량은 대조구의 경우 0.22 mg이며 amphotericin B와 cycloheximide 처리구는 대조구에 비해 13.64%와 22.73%의 PI합성 증가가 조사되었다. 위와 같은 결과로 보아 막에 대한 항생제의 작용성을 보면 amphotericin B는 인지질 생합성에 큰 영향을 미쳤고, amphotericin B는 PE합성을, cy-

cloheximide는 PE와 PC합성을 저해하였다. 그러나 PI생합성에는 거의 항생제의 억제작용이 없음이 조사되었다.

5. 인지질의 지방산 분석

엽록체막의 PE, PC, PI형성에 이용된 지방산 조성 및 양적동태를 Table 2~4에 나타내었다. Table 2에서 보는 바와 같이 PE의 지방산 조성은 대조구의 경우 배양초기에 oleic acid와 linolenic acid가 각각 27.40%와 30.15%가 이용되었다. 배양 3일, 5일, 7일에 palmitic acid와 linolenic acid가 PE 생합성에 주요 지방산으로 분석되었다. 배양 3일, 5일, 7일에 palmitic acid는 21.16%, 26.00%, 34.17%로, linolenic acid는 38.68%, 35.54%, 27.18%로 확인되었다. Amphotericin B 처리구는 배양 3일, 5일에 stearic acid는 31.82%, 23.05%로, linolenic acid는 25.26%, 20.65%의 지방산 조성을 보였다.

배양 7일에도 palmitic acid가 13.77%, linoleic acid는 13.54%, linolenic acid는 28.60%가 인지질 합성에 도입되었다. Cycloheximide 처리구는 배양 3일, 5일, 7일에 palmitic acid가 12.76%, 12.24%, 18.52%가 이용되었고, 배양 5일에 stearic acid가 21.50%로 배양 3일과 7일에는 linolenic acid가 18.07%와 18.24%로 조사되었다. PC는 Table 3에 나타난 바와 같이 대조구의 경우 배양초기에 stearic acid와 linolenic acid가 관여하였다. 배양 5일과 7일에는 palmitic acid가 15.74%와 21.54%로, linolenic acid는 30.13%와 33.56%로 증가를 나타낸 반면, amphotericin

Table 3. Changes in contents of fatty acid methyl esters of phosphatidylcholine in chloroplast envelope of *Chlorella ellipsoidea* treated with antibiotics during the cultivation

Duration of culture (days)	0			3			5			7			
	Treatment	Control	Ampho.	Cyclo.	Control	Ampho.	Cyclo.	Control	Ampho.	Cyclo.	Control	Ampho.	Cyclo.
Fatty acid	Control	Control	Ampho.	Cyclo.	Control	Ampho.	Cyclo.	Control	Ampho.	Cyclo.	Control	Ampho.	Cyclo.
Palmitic acid (16 : 0)	10.65	14.51	17.94	6.17	15.74	18.49	11.06	21.54	23.62	20.76			
Stearic acid (18 : 0)	20.31	19.94	25.05	12.37	10.53	17.40	7.05	6.42	5.40	4.27			
Oleic acid (18 : 1)	11.04	4.71	5.67	7.97	8.91	3.40	2.70	7.23	—	—			
Linoleic acid (18 : 2)	—	—	5.29	16.60	3.21	2.32	10.79	1.04	7.21	8.35			
Linolenic acid (18 : 3)	38.94	29.19	—	19.87	30.13	18.15	31.04	33.56	26.76	19.54			
Unknown	19.06	31.65	46.05	37.02	31.48	40.24	37.36	30.21	37.00	47.08			
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00			

Ampho. : Amphotericin B, Cyclo. : Cycloheximide.

Table 4. Changes in contents of fatty acid methyl esters of phosphatidylinositol in chloroplast envelope of *Chlorella ellipsoidea* treated with antibiotics during the cultivation

Duration of culture (days)	0			3			5			7			
	Treatment	Control	Ampho.	Cyclo.	Control	Ampho.	Cyclo.	Control	Ampho.	Cyclo.	Control	Ampho.	Cyclo.
Fatty acid	Control	Control	Ampho.	Cyclo.	Control	Ampho.	Cyclo.	Control	Ampho.	Cyclo.	Control	Ampho.	Cyclo.
Palmitic acid (16 : 0)	35.54	42.44	30.18	31.59	49.28	36.27	28.35	52.24	35.66	31.62			
Stearic acid (18 : 0)	7.38	2.15	9.54	4.21	7.31	5.42	7.04	5.54	7.24	6.11			
Oleic acid (18 : 1)	6.14	9.81	2.31	13.88	1.35	2.04	7.91	3.47	—	8.00			
Linoleic acid (18 : 2)	—	3.68	3.87	11.16	3.20	—	5.24	—	1.36	8.98			
Linolenic acid (18 : 3)	18.3	18.67	9.46	7.90	20.46	12.35	9.36	23.69	15.74	14.24			
Unknown	32.61	23.25	44.64	31.26	18.40	43.92	42.10	15.06	40.00	31.05			
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00			

Ampho. : Amphotericin B, Cyclo. : Cycloheximide.

B 처리구는 배양 3일에 linolenic acid의 함량이 급격히 감소하였고, palmitic acid는 17.94%, stearic acid는 25.05%가 인지질 합성에 참여하였다. 배양 5일에 palmitic acid, stearic acid, linolenic acid가 각각 18.49%, 17.40%, 18.15%로 배양 7일에는 palmitic acid가 23.62%, linolenic acid는 26.76%로 조사되었다. Cycloheximide 처리구는 배양 3일에 linoleic acid와 linolenic acid가 16.60%와 19.87%로, 배양 5일, 7일에 palmitic acid는 11.06%, 20.76%로 linolenic acid는 각각 31.04%와 19.54%로 대조구와

유사한 지방산 조성을 보여 주었다.

PI의 지방산의 양적동태는 Table 4와 같다. 대조구의 경우 배양초기, 배양 3일, 5일, 7일에 palmitic acid와 linolenic acid가 주요 지방산으로 관찰되었다. Amphotericin B 처리구의 경우도 palmitic acid와 linolenic acid가 대조구와 비슷한 지방산 조성을 보였으며 stearic acid가 새로이 도입되었다.

Cycloheximide 처리시에는 배양 3일에 oleic acid가 지방산 생합성에 도입되었고, 배양 5일과 7일에는 linolenic acid가 9.36%와 14.24%로, palmitic

acid는 28.35%와 31.62%로 분석되었다. Cycloheximide 처리구는 amphotericin B 처리구와 마찬가지로 지방산 조성을 보였으나 함량은 달랐다. 이와 같은 결과로 엽록체 막에서 항생제 처리로 인한 지방산 조성의 변화가 있음이 조사되었다.

IV. 고 찰

Amphotericin B와 cycloheximide는 *Chlorella ellipsoidea*의 성장을 억제하였다. 이와 같은 결과는 polyene 계통의 항생제인 nystatin의 *C. vulgaris*에서 성장의 저해효과를 나타낸다는 Lampen과 Arnow의 보고²⁷⁾와도 일치한다. 또한, Kim 등²⁶⁾은 HeLa cell에 cycloheximide를 처리하면 성장 억제효과가 나타난다는 것까지도 일치한다.

Cycloheximide 처리시 성장 억제는 cycloheximide가 DNA 합성을 억제시키며 단백질의 합성도 억제시킴으로써 세포 분열을 저해하여 세포 성장의 억제현상이 나타났다.^{10, 13, 39)} 항생제를 처리한 배지에서 *Chlorella* 세포를 생육하였을 때 초기부터 성장 억제현상이 일어났으며 amphotericin B보다 cycloheximide 처리구에서 성장 저해효과가 뚜렷하게 나타남이 관찰되었다.

*Chlorella*의 whole cell system²⁴⁾과 분리한 엽록체에서^{22, 29)} 대조구의 total lipid의 함량은 배양기간 동안 증가되는 결과를 보여주었다. 그러나, amphotericin B와 cycloheximide를 처리한 *Chlorella*의 whole cell system과 엽록체⁷⁾에서는 모두 감소현상을 나타내었다.

본 실험에서도 amphotericin B와 cycloheximide 처리시 엽록체 막의 total lipid 함량은 대조구에 비해 억제현상을 나타내었으며, amphotericin B보다 cycloheximide 처리구가 성장물과 마찬가지로 뚜렷한 저해효과를 보였다. 이는 지질 합성에 이용되는 효소의 활성과 세포의 물질대사가 항생제에 의해 정상적으로 일어나지 못하기 때문이라 사료된다.

Cycloheximide를 처리한 배지에서 생육한 *Chlorella*의 total lipid의 함량이 감소하는 것은 지방산 생합성에 이용되는 acetyl CoA carboxylase 합성을 cycloheximide가 억제하였기 때문이다.¹⁹⁾ 엽록체 막은 광합성 반응시 CO₂ 축적과 대사물질을 수송하는데 cycloheximide에 의해 엽록소 형성이 저해되어 황백화 현상이 나타나 광합성 작용이 정상적으로 진행되지 못하기 때문에 탄수화물 합성이 억제되어 지방산의 전구체인 acetyl-CoA 공급이 감소되므로 지방산 합성이 저해된다. 이로 인하여 total lipid의

함량이 감소되었다.

엽록체 막의 주요 인지질인 PE, PC, PI 중 PE, PC는 대조구에 비해 처리구에서 억제현상을 나타내었으나, PI의 경우는 항생제 작용에 의한 억제효과를 나타내지 않았다. 이러한 현상은 PI가 total phospholipid의 정상적인 양을 보충한다는 Daum 등의 보고¹¹⁾와도 일치한다.

Cycloheximide를 HeLa cell에 처리하면 DNA, RNA, 단백질 합성이 저해되는데 이는 cycloheximide가 이들 합성과정에 이용되는 DNA polymerase, thymidine kinase, deoxycytidine monophosphate deaminase 등의 효소활성을 억제하기 때문이다.²⁶⁾ 돼지 장간막 lymphocytes에 cycloheximide와 actinomycin D는 PC-cytidyltransferase와 PC-glyceride transferase의 활성을 억제한다.³³⁾

Amphotericin B 처리시에는 세포막의 투과성이 변화되어 양이온과 음이온의 균형이 깨져 세포막의 하전상태가 달라지며, 호흡과 세포내 구성물질 합성이 저해되어 생장이 억제되고,¹³⁾ 인지질의 조성이 변화된다.²¹⁾

이와 같은 결과는 본 연구에서 cycloheximide 처리구의 인지질 함량이 배양기간 중 배양초기에 비하여 또한, 대조구에 비하여 감소되는 경향과 일치됨을 알 수 있다. 또한 항생제가 인지질 생합성시 phosphatidic acid와 ester bond를 형성하는 polar head group를 결정하는데 영향을 주어 PE, PC의 인지질 생합성이 감소하지만 PI 합성에는 영향을 미치지 않음이 관찰되었다. 이러한 현상은 양배추의 황색부분이 녹색부분 보다 지질합성이 저조하다고 보고한 Nichols 보고³⁵⁾와도 일치한다. Poincelot³⁸⁾은 시금치의 엽록체 막에서도 PC는 각각 9.3과 2.9, PG (Phosphatidylglycerol)는 2.9와 7.9, PI는 1.1과 1.3, PE는 1.4와 1.0(dry wt% of total lipid)로 관찰되었다.

*Chlorella ellipsoidea*의 엽록체 막에서 PE는 대조구와 마찬가지로 palmitic acid와 linolenic acid가 주요 지방산이었고, amphotericin B 처리구의 경우는 stearic acid가 cycloheximide 처리구의 경우는 oleic acid가 새로이 인지질 생합성에 도입되었다. PC와 PI의 주요 구성지방산은 대조구와 항생제 처리구에서 palmitic acid와 linolenic acid가 이용되었다.

결론적으로 엽록체 막에서 인지질 생합성시 palmitic acid와 linolenic acid의 이용률이 높고, amphotericin B 처리시 stearic acid의 이용률이 증가하고 cycloheximide 처리시에는 oleic acid와 linoleic

acid가 사용된다.

Block 등⁵⁾은 시금치 엽록체의 외막과 내막에서 palmitic acid, linoleic acid, linolenic acid가 주로 이용되는데, 콩잎의 prolamella와 lamella막은 palmitic acid와 linoleic acid, linolenic acid가 주요 지방산으로 이용되었으나²⁾ 본 실험에서는 palmitic acid가 주로 이용되었다. Grunwald¹⁵⁾은 어린 벼와 성숙한 벼의 지방산 조성에서 어린 벼는 palmitic acid 77%, stearic acid 12%로 나타났으며, 성숙한 벼는 palmitic acid, stearic acid, linolenic acid가 각각 61%, 14%, 13%로 생육시기에 따라 지방산 조성이 변화됨이 밝혀졌다. 본 실험의 결과를 토대로 amphotericin B는 막의 화학적 투과성을 변화시켜 세포내 물질대사를 정상적으로 일어나지 못하게 하여 구성물질의 변화를 초래하기 때문에 인지질 생합성을 억제하고 지방산 조성을 변화시키는 것으로 분석되었다.

Cycloheximide는 단백질 생합성 뿐만 아니라 세포생장을 억제하고 인지질 생합성에 관여하는 효소의 작용을 억제하므로 인지질 함량 및 그의 지방산 조성변화에 현저한 영향을 미치는 것으로 생각된다. 앞으로는 이들 항생제가 다른 세포 소기관에 어떠한 영향을 미치는가와 인지질 뿐만 아니라 당지질 등 여러 가지 세포 구성성분 및 물질대사에 어떠한 영향을 미치는가에 대하여 더욱 많은 연구가 필요 하리라 생각된다.

V. 적 요

본 연구는 amphotericin B(150 µg/ml)와 cycloheximide(10 µg/ml) 각각을 처리한 배지에서 생장한 *Chlorella ellipsoidea*의 엽록체 막을 분리하여 막을 구성하는 주요 인지질과 인지질 생합성에 이용되는 지방산의 조성변화를 대조구와 비교 분석하여 항생제가 각 막계의 인지질 생합성과 지방산 조성변화에 어떠한 영향을 미치는가를 확인하였다.

Total lipid phosphatidylethanolamine(PE), phosphatidylcholine(PC)량은 각막의 대조구에 비해 처리구에서 현저히 감소하였으나, phosphatidylinositol (PI)는 항생제의 영향을 별로 받지 않았다. 엽록체 막의 지방산 조성은 대조구에서는 평균 27.71%의 linolenic acid가 이용되었고, amphotericin B 처리구는 평균 21.59%의 stearic acid를 이용하였다.

참고문헌

1) Allen, C. F. and Good, P. : Acyl Lipids in Photo-

synthetic Systems. *Method. Enzymol.*, **23**, 523-527, 1971.

- 2) Bahl, J., Franoke, B. and Moneger, R. : Lipid Composition of Envelopes, Prolamella Bodies and Other Plastid Membrane in Etiolated, Green and Greening Wheat Leaves. *Planta.*, **129**, 193-201, 1976.
- 3) Bennett, L. L. Jr., Ward, V. L. and Brockman, R. W. : Inhibition of Protein Synthesis *in vitro* by Cycloheximide and Related Glutarimide antibiotics. *Biochim. Biophys. Acta.*, **103**, 478-485, 1965.
- 4) Bligh, E. L. and Dyer, W. J. : A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911-917, 1959.
- 5) Block, M. A., Dorne, A. J., Joyatd, J. and Douce, R. : Preparation and Characterization of Membrane Fractions Enriched in Outer and Inner Membrane from Spinach Chloroplast. *J. Biol. Chem.*, **258**, 13281-13286, 1983.
- 6) Brown, D. J. and Du pont, F. M. : Lipid Composition of Plasma Membranes and Endomembranes Prepared from Roots of Barley (*Hordeum Vulgare* L.). *Plant Physiol.*, **90**, 955-961, 1989.
- 7) Cho, S. Y. and Lee, C. S. : Effects of Antibiotics on the Phospholipid Biosynthesis and Fatty Acid Composition of *Chlorella ellipsoidea* Chloroplast. *Kor. J. Bot.*, **35**, 25-36, 1991.
- 8) Cline, K., Andrews, J., Mersy, B., Newcomb, E. H. and Keegstra, K. : Separation and Characterization of Inner and Outer Envelop Membrane of Pea Chloroplast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**, 3595-3599, 1981.
- 9) Cronan, J. E. Jr. and Gelmann, E. D. : Physical Properties of Membrane Lipids : Biological Relevance and Regulation. *Bacteriol. Rev.*, **39**, 232-256, 1975.
- 10) Cummins, J. E. and Rusch, H. D. : Limited DNA Synthesis in the Absence of Protein Synthesis in *Physarum polycephalum*. *Cell. Biol.*, **31**, 577, 1966.
- 11) Daum, G., Kohlwein, S. D., Ziner, E. and Paltant, F. : Effects of Inositol Starvation on Glycerolipid Metabolism in *Saccharomyces uvarium*. *Biochim. Biophys. Acta.*, **753**, 430-438, 1983.
- 12) De Kruijff, B., Gerritsen, W. J., Oerlemans, R., Demel, A. and Van Deener, L. L. M. : Polyene Antibiotics-Sterol Interaction in Membrane of *Acholeplasma laidlawii* Cells and Lecithin Lipo-

- somes. I. Specificity of the Membrane Permeability Change Induced by the Polyene Antibiotics. *Biochim. Biophys. Acta.*, **339**, 30-43, 1974.
- 13) Gottlieb, D. and Show, P. D. : Mechanism of Action of Antifungal Antibiotics. *Ann. Rev. Phytopathol.*, **8**, 371-402, 1970.
 - 14) Greig, M. E., Walk, R. A. and Gibbons, A. J. : Effects of Actidione (Cycloheximide) on Yeast Fermentation. *J. Bacteriol.*, **75**, 489-491, 1957.
 - 15) Grunwald, C. : Effects of Free Sterols, Steryl Ester, and Steryl Glycoside on Membrane Permeability. *Plant Physiol.*, **48**, 653-655, 1971.
 - 16) Hashimoto, H. and Murakami, S. : Dual Character of Lipid Composition of the Envelope Membrane of Spinach Chloroplasts. *Plant & Cell Physiol.*, **16**, 895-902, 1975.
 - 17) Hatano, S., Kabata, K. and Sadakate, H. : Transition of Lipid Synthesis from Chloroplasts to a Cytoplasmic System During Hardening in *Chlorella ellipsoidea*. *Plant Physiol.*, **67**, 216-220, 1981.
 - 18) Heldt, H. W. and Sauer, F. : The Inner Membrane of the Chloroplast Envelope at the Site of Specific Metabolism Transport. *Biochim. Biophys. Acta.*, **234**, 83-91, 1971.
 - 19) Howard, B. V. and Howard, W. J. : Lipid Metabolism in Cultured Cell. *Lipid Res.*, **12**, 15-96, 1974.
 - 20) Hunter, E. O. Jr. and McVeigh, I. : The Effects of Selected Antibiotics on Pure Culture of Algae. *Amer. J. Bot.*, **48**, 179-185, 1961.
 - 21) Hsuchen, C. C. and Feingold, D. S. : Polyene Antibiotics Action on Lecithin Liposomes (Effects of Cholesterol and Fatty Acyl Chains). *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **51**(4), 972-978, 1973.
 - 22) Kark, H. S. and Lee, C. S. : Effects of Carbon Sources on the Synthesis of Phospholipids and Fatty Acid Composition in Chloroplast of *Chlorella ellipsoidea*. *Kor. J. Bot.*, **33**, 49-54, 1990.
 - 23) Kates, M. : Plant Phospholipids and Glycolipids. *Adv. Lipid. Res.*, **8**, 225-265, 1970.
 - 24) Kee, S. C. and Nobel, P. S. : Fatty Acid Composition of Chlorenchyma Membrane Fractions from Three Desert Succulents Grown at Moderate and High Temperatures. *Biochim. Biophys. Acta.*, **820**, 110-116, 1985.
 - 25) Kim, D. H. and Lee, C. S. : Study on the Phospholipid and Fatty Acid Composition in *Chlorella ellipsoidea* Under the Nutritional Conditions. *J. Bas. Sci.*, **9**, 57-85, 1992.
 - 26) Kim, J. H., Gelbard, A. S. and Perez, A. G. : Inhibition of DNA Synthesis by Actinomycin and Cycloheximide in Synchronized HeLa Cells. *Exp. Cell Res.*, **53**, 478-487, 1968.
 - 27) Lampen, J. O. and Arnow, P. : Inhibition of Algae by Nystatin. *J. Bacteriol.*, **82**, 247-251, 1961.
 - 28) Lynch, D. AV. G. and Tompson, Jr. : Low Temperature-Induced Alterations in the Chloroplast and Microsomal Membrane of *Dunaliella salina*. *Plant Physiol.*, **69**, 1369-1375, 1982.
 - 29) Lee, J. K. and Lee, C. S. : Effects of the Nitrate and the Phosphate Starvation on the Biosynthesis of Phospholipid and the Composition of Fatty Acid in *Chlorella* Chloroplast. *Kor. J. Bot.*, **31**, 187-196, 1989.
 - 30) Lyttleton, J. W. : Isolation of Ribosome from Spinach Chloroplast. *Expt. Cell. Res.*, **26**, 312-317, 1962.
 - 31) Matsuzaki, T., Koiwai, A. and Kawashima, N. : Total Fatty Acid and Polar Lipid Content in Developing Flower of *Nicotiana tabacum*. *Plant & Cell Physiol.*, **24**(2), 199-206, 1983.
 - 32) McGarrity, J. T. and Armstrong, J. B. : The Effect of Salt on Phospholipid Fatty Acid Composition in *Escherichia coli* K-12. *Biochim. Biophys. Acta*, **398**, 258-264, 1975.
 - 33) Nelson, J. D. and Sribney, M. : The Effects of Phytohemagglutinin on the Activity of PC-Cytidyl Transferase and PC-Glyceride Transferase in Cultured Porcine Lymphocytes. *Can. J. Biochem.*, **50**, 25-31, 1972.
 - 34) Moore, T. S. Jr. : Phospholipid Biosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **33**, 235-296, 1982.
 - 35) Nichols, B. W. : Separation of the Lipid of Photosynthetic Tissue (Improvements in Analysis by Thin-Layer Chromatography). *Biochim. Biophys. Acta*, **70**, 412-422, 1963.
 - 36) Nichols, B. W. : Light Induced Changes in the Lipid of *Chlorella vulgaris*. *Biochim. Biophys. Acta*, **106**, 274-279, 1965.
 - 37) Nichols, B. W. : James, A. T. and Breuer, J. : Interrelationships Between Fatty Acid Biosynthesis and Acyl-Lipid Synthesis in *Chlorella ellipsoidea*. *Biochem. J.*, **104**, 486-496, 1967.
 - 38) Poincelot, R. P. : Isolation and Lipid Composition of Spinach Chloroplast Envelope Membrane. *Arch. Biochem. Biophys.*, **159**, 134-142, 1973.
 - 39) Schonherr, O. TH. and Wanka, F. : An Investigation of DNA Polymerase in Synchronously Growing *Chlorella* Cells. *Biochem. Biophys. Acta.*, **232**,

- 83-93, 1971.
- 40) Skipski V. P. and Barllay, M. : Thin-Layer Chromatography of Lipids. *Method. Enzymol.*, **14**, 530-598, 1969.
- 41) Tamiya, H., Shibata, K., Iwamura, T., Sasa, T. and Morimura, Y. : Effect of Diurnally Intermittent Illumination on the Growth and Some Cellular Characteristics of *Chlorella*. *Carnegie Inst. Wash. Pub.*, **600**, 76-81, 1953.
- 42) Tsang, J., Kranz, D. M. and Brown, D. A. : The Effect of Polymyxin B Outer Membrane of *Serratia marcescens* (Activation and Dissociation of Outer Membrane Associated Alkaline Phosphatase). *J. Antibiotics*, **30**, 270-271, 1977.
- 43) Turner, J. D. and Rouser, G. : Precise Quantitative Determination of Human Blood Lipids by Thin Layer and Thioethylaminoethyl Cellulose Column Chromatography II. Plasma Lipids. *Anal. Biochem.*, **38**, 437-445, 1970.
- 44) Van Zutphen, H., Demel, R. A., Norman, A. W. and Van Deenen, L. L. M. : The Action of Polyene Antibiotics on Lipid Bilayer Membranes in the Presence of Several Cations and Anions. *Biochim. Biophys. Acta.*, **241**, 310-330, 1970.
- 45) Yoshida, S. and Uemura, M. : Protein and Lipid Composition of Isolated Plasma Membranes from Orchard Grass (*Dactylis glomerata* L.) and Changes During Cold Acclimation. *Plant Physiol.*, **75**, 31-37, 1984.
- 46) Wanka, F., Moors, J. and Krijzer, F. N. C. M. : Dissociation of Nuclear DNA Replication from Concomitant Protein Synthesis in Synchronous Cultures of *Chlorella*. *Biochim. Biophys. Acta*, **269**, 153-161, 1972.