

*Saccharomyces cerevisiae*에서 myo-Inositol 결핍에 의한 Respiratory Capacity의 감소

정경환¹ · 이준식*

한국과학기술원 생물과학과, ¹목암생명공학연구소

Decrease in Respiratory Capacity by Deficiency of myo-Inositol in *Saccharomyces cerevisiae*. Kyung-Hwan Jung¹ and Joon-Shik Rhee*. Department of Biological Sciences, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Taejon 305-701, Korea, ¹Research Institute of Mokam Biotechnology, 341, Bojungri, Yongin, Kyung Ki Do 449-910, Korea — myo-Inositol, a growth factor for *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), has been known to be incorporated into phosphatidylinositol (PI), which is a kind of phospholipid in the cell membrane, by a membrane-associated PI-synthesizing enzyme. The deficiency of myo-inositol in *S. cerevisiae* adversely affected the membrane structure and function. On the basis of biochemical functions of myo-inositol, the effect of deficiency of myo-inositol on the aerobic glucose metabolism was investigated by measuring specific oxygen uptake rate (Q_{O_2}) used as an indicator representing the respiratory capacity of *S. cerevisiae* in batch and continuous cultures. The respiratory capacity of aerobic glucose metabolism in *S. cerevisiae* was also monitored after glucose pulse-addition in a continuous culture ($D=0.2, 1/hr$), in which glucose was utilized through respiratory metabolism. The deficiency of myo-inositol was found to lead to both the decrease of the maximum specific oxygen uptake rate ($Q_{O_2,max}$) observed from the batch as well as in the continuous culture experiment and the decrease of the respiratory capacity of aerobic glucose metabolism of *S. cerevisiae* determined from the glucose pulse-addition experiment, in which the glucose flux into respiratory and fermentative metabolism was quantitatively analyzed.

myo-Inositol은 *Saccharomyces cerevisiae*(*S. cerevisiae*)의 growth factor 중의 하나로 세포내로 흡수된 후 membrane-associated 효소에 의해서 인산지방질 중의 하나인 phosphatidylinositol의 합성에 사용되며(1, 2), 이때 또한 myo-inositol 자체가 phosphatidylinositol의 합성을 조절하는 것으로 알려져 있다(3). 배지 중에 myo-inositol이 결핍 되었을 경우 세포막 및 mitochondria 막구조의 변형에서 오는 막투과성 이상(4), 삼투압의 불균형(5), 당흡수의 감소(6), 세포막의 leakage 등을 초래하며(4, 6), 세포벽 구조의 파괴를 유발해 Glucan, Mannan의 유출(7) 및 생합성 저해(8, 9), 세포의 응집현상등(10)을 일으키는 것으로 알려져 왔다. 이러한 myo-inositol 결핍은 궁극적으로 효모세포의 fermentation과 respiration 활성의 감소(4, 6)로 이어져, myo-inositol 결핍에 의한 세포 사멸에 이르게 하는 것으로 알려져 있다.

Arima 등(10)은 효모의 myo-inositol 생합성 능력에 따라 몇 가지 종류로 분류 하였으며, 지금까지 myo-inositol의 생화학적 기능에 대한 연구는 myo-inositol을 전혀 합성하지 못하는 효모나 *S. cerevisiae* 중 myo-inositol 요구성 변이주에 한정되어 왔었다.

한편, *S. cerevisiae*의 carbon source 대사에 관한 연구는 Barford 등(11, 12)에 의해 기존의 Crabtree effect에 대한 새로운 실험적 반증이 밝혀진 후 호기적

조건에서의 ethanol 생성현상을 *S. cerevisiae*의 respiratory capacity가 포화되어 일어나는 현상으로 이해하게 되었으며(13-15), 그 후 Sonnleitner 등(16, 17)은 *S. cerevisiae*의 대사경로를 stoichiometric equation으로 표현하고, Barford 등(11, 12)의 개념을 발전시켜 limited respiratory capacity에 의해 *S. cerevisiae*의 성장이 조절되는 model을 확립하였고 이를 실험적으로 증명하였다. 이러한 respiratory capacity는 회분배양과 연속배양의 maximum specific oxygen uptake rate($Q_{O_2,max}$)로 대변되기도 하며, 연속배양에서는 ethanol 생성이 시작되는 dilution rate(D_R)로도 관찰 할 수 있다.

본 연구에서는 myo-inositol을 어느 정도 합성하지만 배지 중에 첨가 하여야만 하는 빵효모(baker's yeast)를 가지고 이미 알려진 실험적 사실을 근거로 myo-inositol 결핍이 *S. cerevisiae*의 respiratory metabolism에 어떠한 영향을 주는지를 조사하여 보았다. 이때 specific oxygen uptake rate(Q_{O_2})를 respiratory metabolism을 대변하는 지표로 삼았으며, 실험 결과를 Sonnleitner 등(16, 17)의 respiratory capacity 개념을 이용하여 설명하였다.

재료 및 방법

효모와 배지

본 연구에 사용된 효모는 *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 32167(16)이며 배양을 위해 포도당 20 g/L에 $(NH_4)_2SO_4$; 5.2 g/L, KH_2PO_4 ; 1.4 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$;

*Corresponding author.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, myo-Inositol, respiratory capacity

0.4 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0.28 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 16.0 mg/L, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 8.0 mg/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 6.0 mg/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 1.6 mg/L, d-Biotin; 100 $\mu\text{g/L}$, Ca-Panthenate; 20 mg/L, Thiamine·HCl; 40 mg/L, Pyridoxine·HCl; 10.0 mg/L이 들어 있는 defined medium (myo-inositol-sufficient or myo-inositol-supplemented medium)이 쓰였고, myo-inositol의 첨가량은 flask culture(200 rpm, 30°C)를 통하여 효모성장에 충분한 양을 결정된 후 배지에 첨가하였고, myo-inositol이 결핍된 배지(myo-inositol-deficient or myo-inositol-not-supplemented medium)로 배양해야 할 경우에는, 위의 배지에서 myo-inositol만 제외하고 배지를 만들어 사용하였다. 또한 포도당 양을 증감해야 할 경우에는 다른 성분들도 같은 비율로 증감하여 사용하였다.

회분배양과 연속배양

Saccharomyces cerevisiae ATCC 32167의 배양은 Bioflo C-30(NBS, USA) fermentor를 이용하였고, 배양부피는 750 mL이었으며, 배양온도는 30°C, pH는 4N NaOH와 1N HCl을 이용하여 5.0으로 자동조절 하였고, agitation speed와 aeration rate은 각각 1000 rpm과 1.0 vvm이었다. 이때 용존산소는 계속 관찰하였으며, 25% air saturation 이상 유지됨을 확인하였다.

회분배양의 seed는 myo-inositol이 제외된 배지에서 $D=0.2(1/\text{hr})$ 로 유지되고 있는 연속배양의 exhaust line에서 무균적으로 받아 초기 배양부피의 5%(v/v)로 접종하였으며, 초기 포도당농도는 14 g/L였다. 연속배양에서는 U-tube를 이용하여 일정 배양 부피를 유지하였으며, 3 내지 5 residence time이 지난 후 일정시간 간격으로 OD(at 600 nm)를 측정하여 그 값의 변화가 없으면 steady state로 간주하였다.

포도당 pulse-addition 실험

$D=0.2(1/\text{hr})$ 를 유지하고 있는 연속배양($S_R=17 \text{ g/L}$)에 20 mL의 50% 포도당 용액을 무균적으로 첨가한 후 세포농도, 포도당 그리고 ethanol 농도변화를 관찰하였다.

Analytical Methods

세포농도 OD(at 600 nm)와 dry cell weight(DCW)의 상관관계를 구한 후, OD를 측정하여, dry cell weight를 구하였다($\text{DCW}=0.217 \times \text{OD}_{600}$).

포도당과 Ethanol 농도 포도당은 Glucose Analyzer (YSI, USA) 혹은 Neoprine assay(18)를 이용하여 측정하였고, Ethanol은 FID(flame ionization detector)가 장착된, gas chromatography(Hewlett Packard 5890 series II, USA)에서 6 ft stainless steel column(10% DEGS, 19001A-L12, Hewlett Packard)을 사용하여 정량분석 하였으며, 이때 n-butanol을 internal standard로

사용하였다.

Exhaust Oxygen Concentration과 Specific Oxygen Uptake Rate(Q_{O_2}) TCD(thermal conductivity detector)가 장착된 gas chromatography(Hewlett Packard 5890 series II, USA)에서 CTR I column(Alltech, USA)을 이용하여 산소농도를 분석하였다. Fermentor에서 나오는 exhaust gas에서의 산소농도를 정량 분석하기 위하여, 제습된 exhaust gas를 sampling bulb를 이용하여 포집한 후, gas-tight syringe로 gas chromatography에 injection한 후, 공기를 표준물질로 하여, 산소농도를 측정하였다.

Specific oxygen uptake rate(Q_{O_2} , mmol/g/hr)은 먼저 volumetric oxygen uptake rate(OUR, mmol/L/hr)을 구한 후 아래와 같이 계산하였다.

$$\text{OUR} = \left(\frac{F_N}{V} \right) \left(\frac{O_{2,\text{air}}}{N_{2,\text{air}}} - \frac{O_{2,\text{ex}}}{N_{2,\text{ex}}} \right) \quad (1)$$

$$Q_{O_2} = \left(\frac{\text{OUR}}{X} \right) \quad (2)$$

Q_P , Q_S , $Q_{S,\text{ferm}}$, $Q_{S,\text{resp}}$ 의 측정 $D=0.2(1/\text{hr})$ 로 유지되고 있는 연속배양에 포도당을 pulse-addition 후 15분 간격으로 세포농도, 포도당농도, ethanol농도를 측정 한 후, 아래의 방법으로 15분 동안의 specific ethanol production rate($Q_{P,i}$, mmol/g/hr)과 specific glucose uptake rate($Q_{S,i}$, mmol/g/hr)을 계산하였다.

$$Q_{P,i} = \left(\frac{1}{X_{\text{avg}}} \right) \left(\left(\frac{\Delta P}{\Delta t} \right) + (D \cdot P_{\text{avg}}) \right) \left(\frac{1000}{46} \right) \quad (3)$$

$$Q_{S,i} = \left(\frac{1}{X_{\text{avg}}} \right) \left(- \left(\frac{\Delta S}{\Delta t} \right) - (D \cdot P_{\text{avg}}) + (D \cdot S_R) \right) \left(\frac{1000}{180} \right) \quad (4)$$

그리고, $\Delta t=0.25(\text{hr})$ 이므로, 포도당을 pulse-addition 후 45분 동안의 평균 specific ethanol production rate(Q_P , mmol/g/hr)와 specific glucose uptake rate(Q_S , mmol/g/hr)는

$$Q_P = \left(\frac{Q_{P,i}}{3} \right) \quad (5)$$

$$Q_S = - \left(\frac{Q_{S,i}}{3} \right) \quad (6)$$

가 되며, $Q_{S,\text{ferm}}$ (specific glucose uptake rate for fermentative metabolism, mmol/g/hr)과 $Q_{S,\text{resp}}$ (specific glucose uptake rate for respiratory metabolism, mmol/g/hr)은 다음과 같이 계산하였다.

$$Q_{S,\text{ferm}} = \left(\frac{Q_P}{2} \right) \quad (7)$$

$$Q_{S,\text{resp}} = Q_S - Q_{S,\text{ferm}} \quad (8)$$

결과 및 고찰

myo-Inositol 농도의 결정

myo-inositol이 결핍된 배양조건과 myo-inositol이 결핍되지 않고 충분한 배양조건을 결정하기 위해 myo-inositol이 첨가되지 않은 배지로 seed culture를 준비한 후, 여러 가지 농도의 myo-inositol이 첨가된 flask culture를 실시하여 효모성장을 관찰하였다(Fig. 1). Arima (10)가 언급한 바와 같이 본 연구에 사용한 S. cerevisiae는 배지 중에 myo-inositol이 없어도 성장할 수 있었으며, 약 10 mg/L만 첨가해도 충분히 성장 촉진효과를 나타낼 수 있었다. 그래서, myo-inositol을 배지중에 첨가해야 할 경우에는 포도당 20 g/L에 대해 충분한 양인 40 mg/L의 myo-inositol을 첨가하기로 하였다.

또한 myo-inositol이 충분히 첨가된 배지가 포도당만이 제한된 배지임을 알아보기 위하여, 40 mg/L의 myo-inositol이 첨가된 배지를 기본으로 하여, 배지 성분중 포도당 농도만을 변화시키면서 연속배양중의 정상상태에서 건조균체량을 측정하여 보았다. reservoir의 포도당 농도가 약 20 g/L보다 큰 경우부터 포도당 이외의 다른 성분의 결핍으로 인한 정상상태에서의 건조균체량 감소가 관찰되었으며(Fig. 2), 이때 다른 영양성분들의 농도를 포도당 농도와 비례적으로 증가시켰을 경우, reservoir의 포도당 농도 증가에 따라 비례적으로 정상상태에서의 건조균체량이 증가하는 것이 관찰되었다. 이러한 결과는 본 연구에 쓰인 배지가 포도당 이외의 어느 배지 성분도 결핍되어 있지 않다는 사실을 보여주는 것이라 하겠다.

myo-Inositol 결핍이 specific oxygen uptake rate (Q_{O2})에 미치는 영향

Sonnleitner 등(16)이 정리한 S. cerevisiae의 포도당

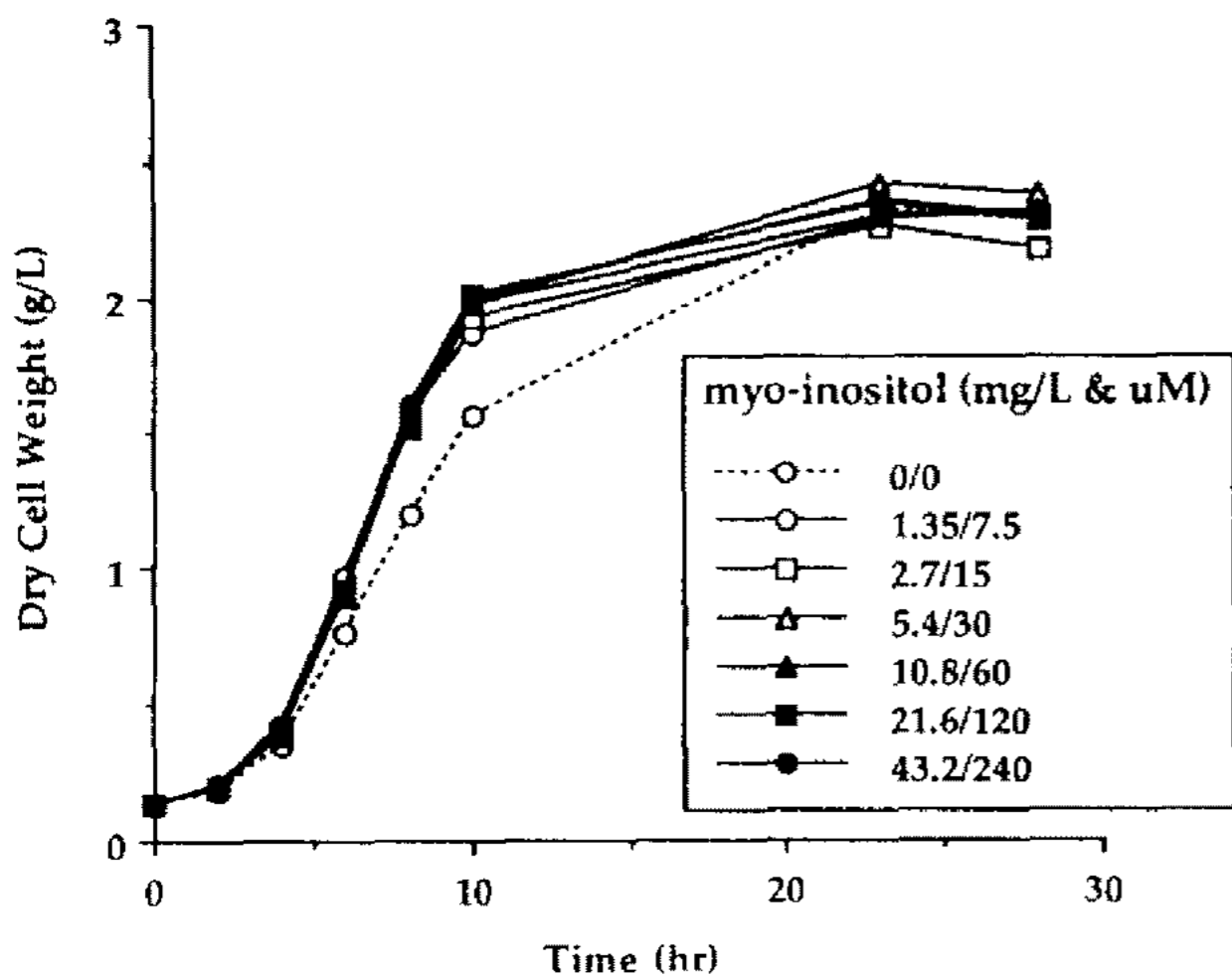


Fig. 1. Growth profiles of *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 32167 at various myo-inositol concentrations (flask culture, S₀=20 g/L)

metabolism에 관한 model은 호기적 조건에서 respiration을 통해 이용될 수 있는 포도당 flux가 respiratory capacity에 의해서 제한된다고 설명하고 있다.

호기적 조건에서 이러한 respiratory capacity는

$$Q_{O_2} = Q_{O_2, \max} \left(\frac{O}{K_0 + O} \right) \quad (9)$$

라 표현할 수 있으며, 이때 이 respiratory capacity를 통해 이용될 수 있는 포도당은

$$Q_{S, \text{resp}} = (Y_{S/O}) \cdot Q_{O_2} \quad (10)$$

이며, 나머지 포도당은 이 respiratory capacity를 넘쳐 ethanol로 전환된다고 설명하고 있다. 여기서 respiratory capacity를 결정하는 인자는 Q_{O2,max}, K₀, O라는 것을 알 수 있으며, 이때 호기적 조건에서 K₀ << O임으로, respiratory capacity에 가장 크게 영향을 주는 인자는 Q_{O2,max}라 할 수 있겠다. 이 Q_{O2,max}는 respiration과 직접 관련된 생리적 인자임으로, Käppli(19)는 Fig. 3과 같이 회분배양과 연속배양에서 일어나는 포도당의 respiratory metabolism과 fermentative metabolism을 specific oxygen uptake rate(Q_{O2})와 관련지어 이미 설명하였다.

그래서 먼저 myo-inositol이 결핍된 경우와 결핍되지 않은 경우 회분배양에서 Q_{O2} 값을 측정하여 보았다(Fig. 4(A)). Käppli(19), Meyenburg 등(20), Beck 등(21)의 결과와 같이, 배양초반기의 ethanol 생성시기에는 상대

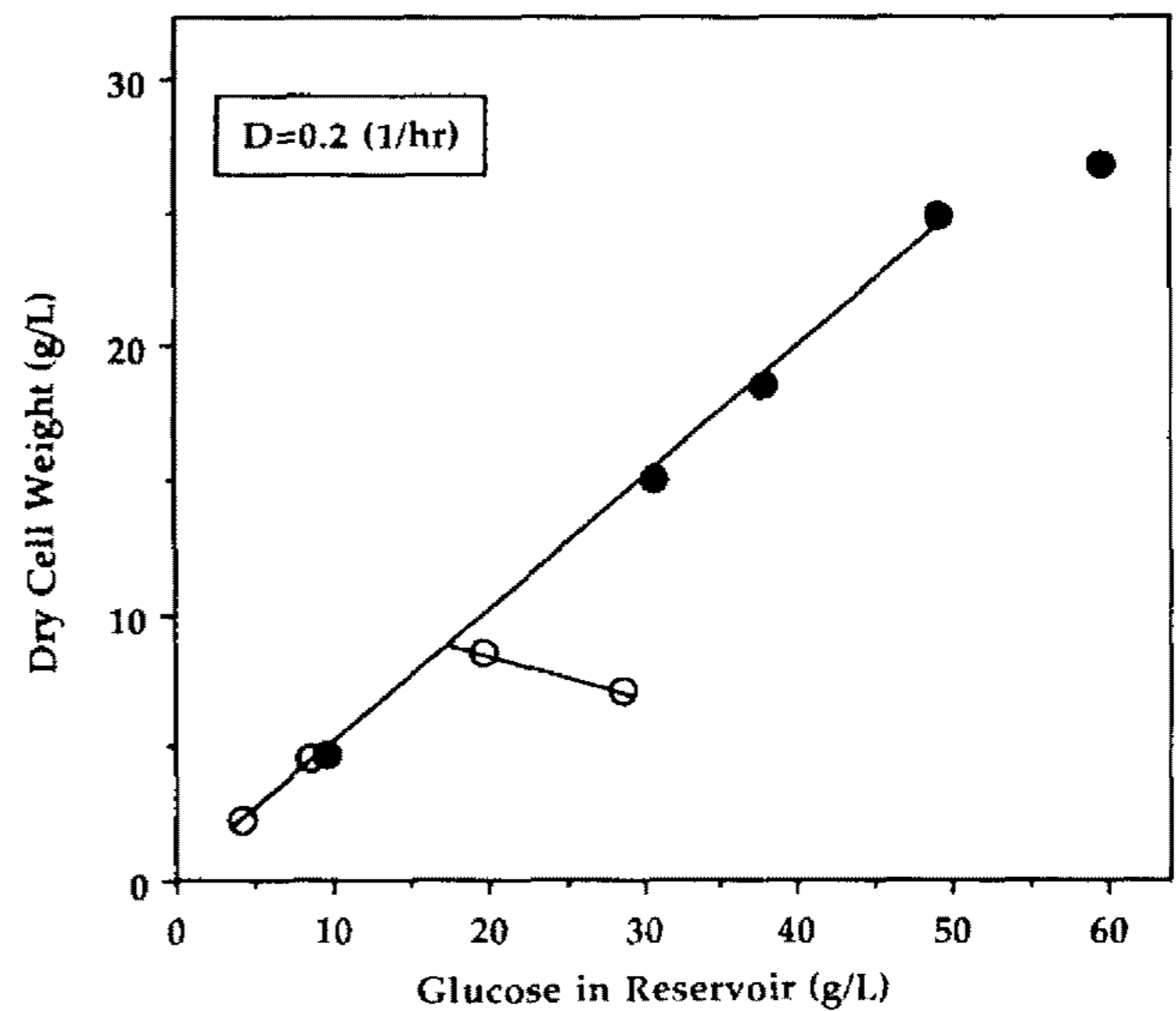


Fig. 2. Dry cell weight at the steady state according to the change in the glucose concentration in reservoir.

open circle: The glucose concentration in reservoir was varied from 5 to 60 (g/L), with the concentration of the other ingredients in the culture medium being fixed.
closed circle: The glucose concentration in reservoir was varied from 5 to 60 (g/L), with the concentration of the other ingredients in the culture medium being proportionally increased with the glucose concentration in reservoir.

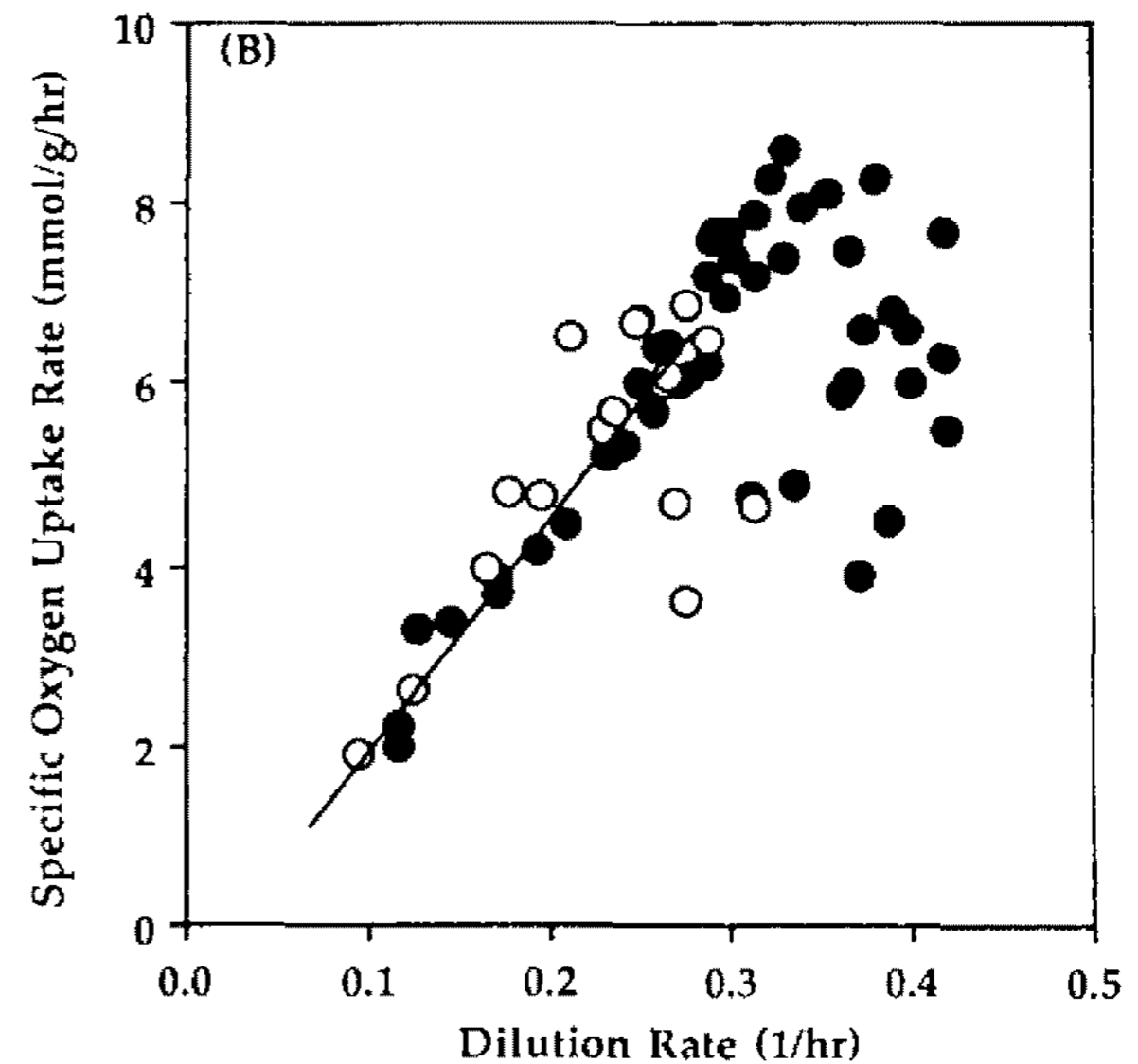
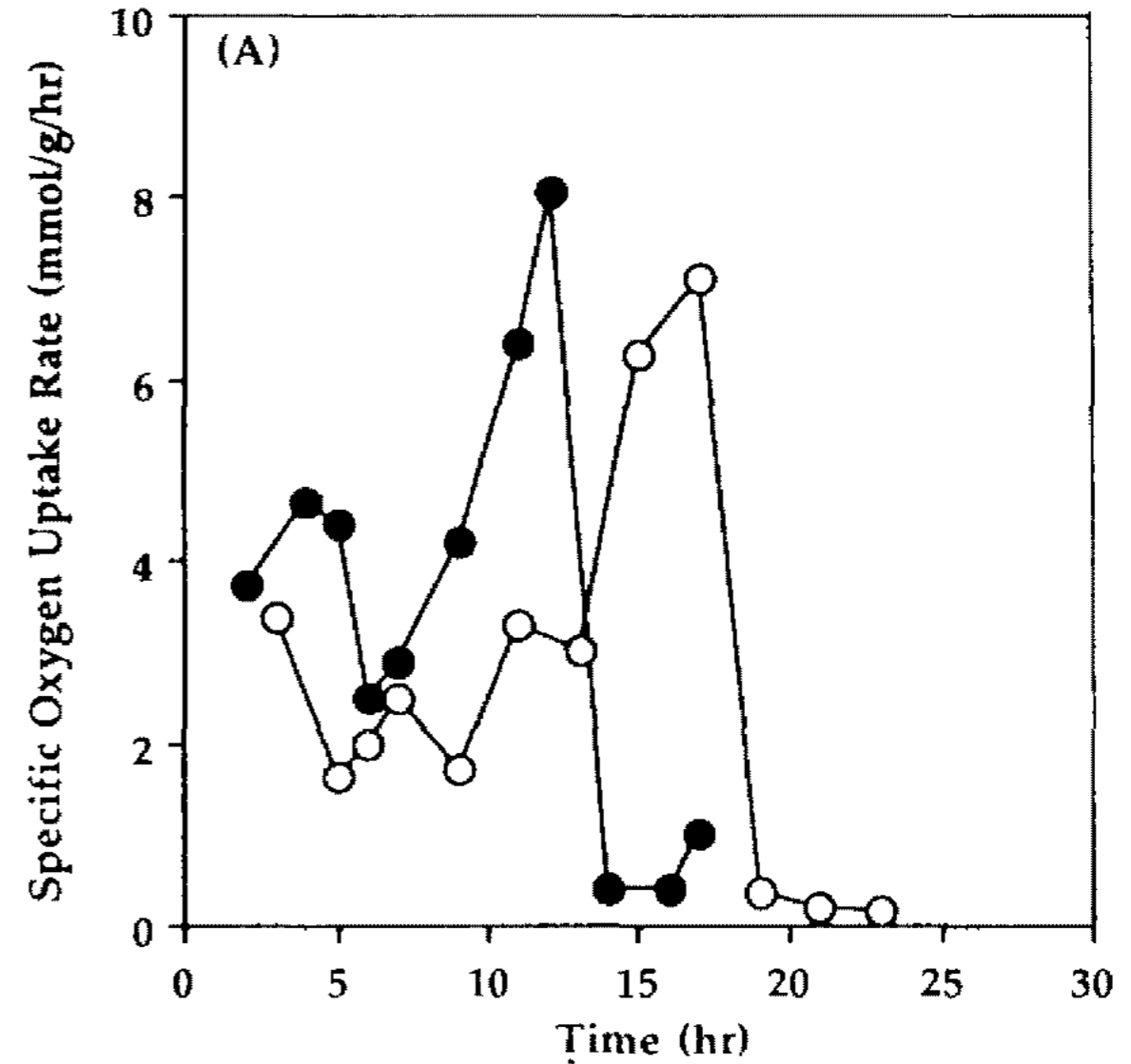
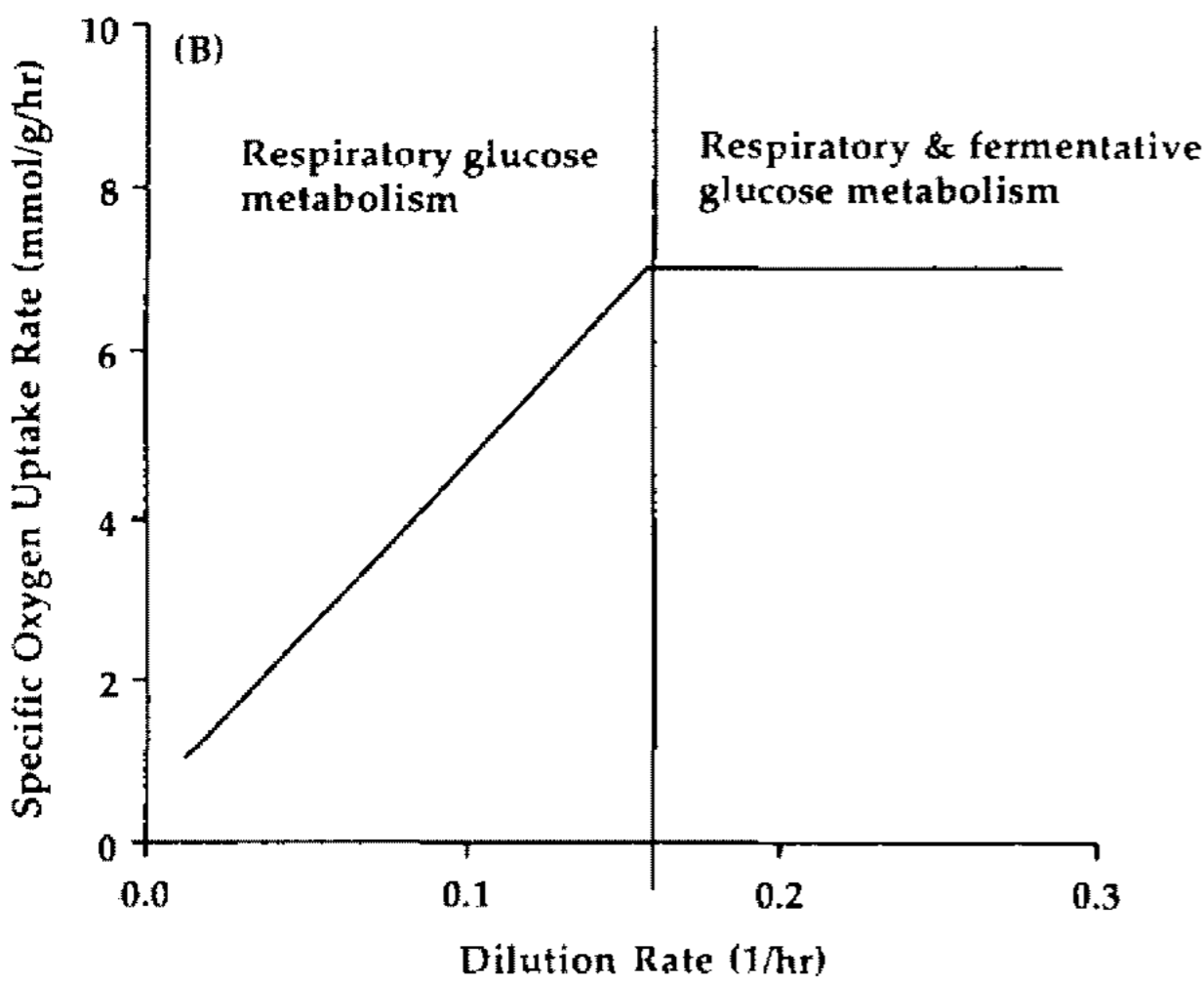
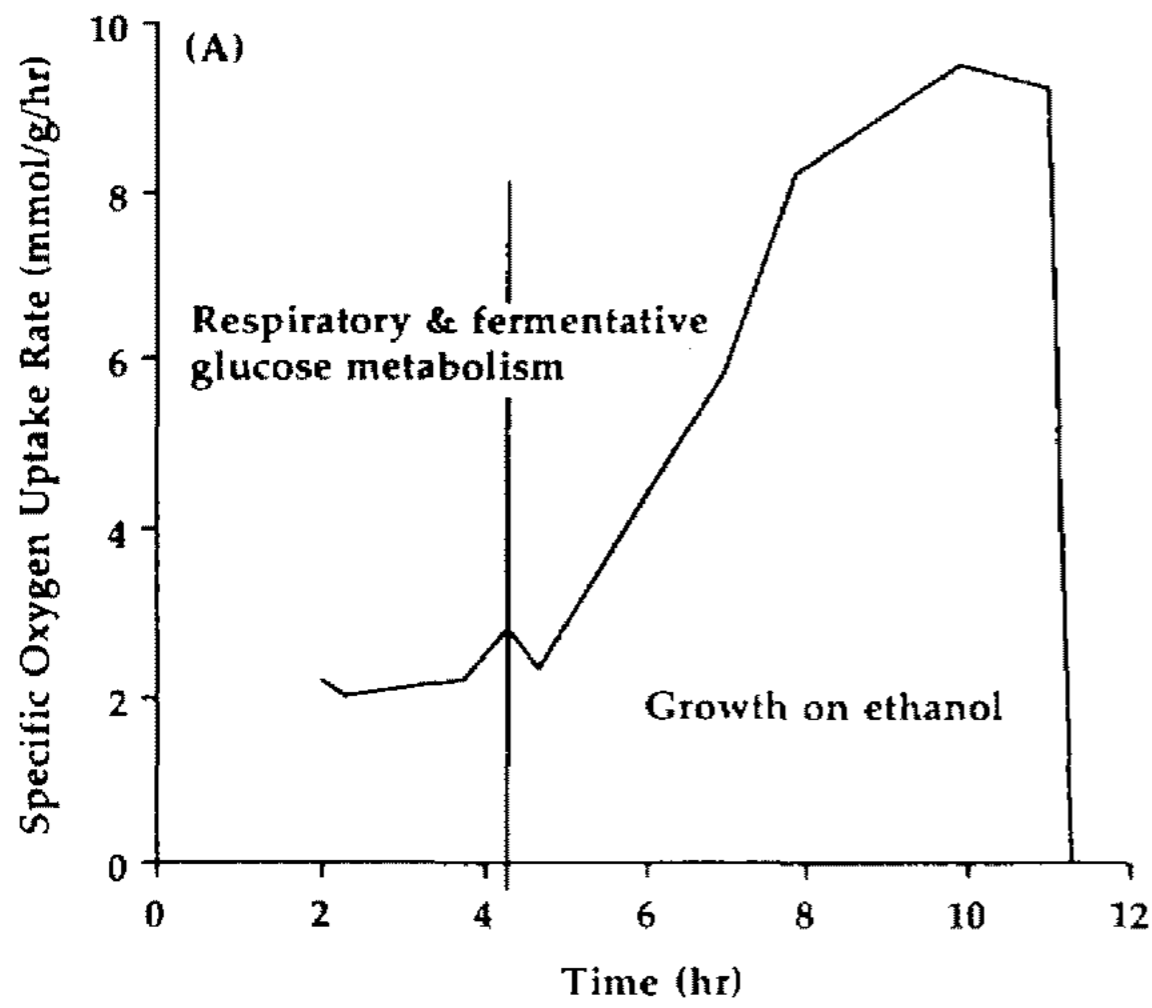


Fig. 3. Specific oxygen uptake rates (Q_{O_2}) by *Saccharomyces cerevisiae* during growth on glucose.

(A) Batch culture
(B) Continuous culture

This figure was referred to Käppeli's data (reference no. 19).

Fig. 4. Specific oxygen uptake rates (Q_{O_2}) by *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 32167

(A) Batch culture ($S_0=14$ g/L)

(B) Continuous culture ($S_R=17$ g/L)

open circle: myo-inositol-deficient culture (myo-inositol-not-supplement)

closed circle: myo-inositol-sufficient culture (myo-inositol-supplement)

적으로 낮은 Q_{O_2} 값을 보이며 respiration과 fermentation을 통하여 포도당이 이용되고, 배양후반기에는 ethanol이 respiration을 통하여 소비되면서 Q_{O_2} 값이 점차 증가하여 최고 값에 이르는 전형적인 양상을 보였다. 이때 myo-inositol이 결핍된 경우의 Q_{O_2} 값은 결핍되지 않은 경우보다 전반적으로 작았으며, maximum specific oxygen uptake rate($Q_{O_2,max}$)도 myo-inositol이 결핍되었을 경우에 8.06(mmol/g/hr)에서 7.12(mmol/g/hr) 감소되는 것으로 관찰되었다.

연속배양에서도(Fig. 4(B)) Q_{O_2} 값은 myo-inositol이 결핍된 경우와 결핍되지 않은 경우 모두 dilution rate가 증가하면서 점차 증가하여, 어떤 dilution rate(D_R)에서 최대 값을 보였는데, 이 결과 역시 Käppeli(19), Meyenburg 등(20), Beck 등(21)의 결과와 같은 양상이며, myo-inositol이 결핍된 경우 respiration을 통하여

포도당이 이용되는 낮은 dilution rate에서는 myo-inositol이 결핍되지 않은 경우와 유사한 Q_{O_2} 값을 보였으나, $Q_{O_2,max}$ 은 회분배양에서와 마찬가지로 myo-inositol이 결핍된 경우 8.6(mmol/g/hr)에서, 6.9(mmol/g/hr)로 감소되는 것으로 관찰되었다.

이미 회분배양 초반부의 Q_{O_2} 가 후반부의 Q_{O_2} 값보다 작게 측정되는 현상과, 연속배양에서 어떤 dilution rate 이후 Q_{O_2} 값이 급격히 감소하는 현상은 respiratory adaptation의 부족으로 초래되는 것으로 이미 Barford 등(11, 12)에 의해 언급된 바 있지만, 회분배양과 연속배양에서 측정된 이상의 결과로부터 myo-inositol을 배

지에 첨가하지 않아 발생하는 myo-inositol의 결핍이 $Q_{O_2,max}$ 의 감소를 초래한다는 실험적 사실을 얻을 수 있었으며, 이것을 Sonnleitner 등(16)이 정리에 근거하여 설명하면 myo-inositol의 결핍이 *S. cerevisiae*의 respiratory capacity가 감소되는 방향으로 영향을 줄 수 있다는 것을 의미하는 것이라 하겠다.

*S. cerevisiae*에서 이와 유사한 현상이 이미 Mn(14), Fe(22)과 같은 금속이온이 결핍된 경우 관찰되었으며, oxo-acid ester(23)와 같은 저해물질 존재 하에 $Q_{O_2,max}$ 의 감소 현상이 관찰된 바 있다. 그러나, myo-inositol이 금속이온과는 다르게 *S. cerevisiae*가 어느 정도 생합성할 수 있는 growth factor라는 점과 oxo-acid ester와는 달리 직접적인 세포성장 저해를 통해 $Q_{O_2,max}$ 에 영향을 주지 않는다는 점에서 myo-inositol 결핍에 의한 $Q_{O_2,max}$ 감소현상은 새로운 실험적 관찰이라 하겠다.

포도당 pulse-addition 실험을 통한 respiratory capacity 조사

Petrik 등(24)은 respiration을 통해 포도당을 이용하고 있는 낮은 dilution rate의 연속배양에 포도당을 pulse-addition 하였을 경우 Q_{O_2} 값이 변하지 않는다는 사실을 관찰하고, respiratory capacity가 포도당의 갑작스런 첨가로 감소하지 않는다는 사실을 입증하였다. 이러한 사실을 근거로 myo-inositol의 결핍이 respiratory capacity에 영향을 미치는 직접적인 실험적 사실을 관찰하기 위해 myo-inositol이 첨가된 연속배양과 myo-inositol이 첨가되지 않은 연속배양에 포도당을 pulse-addition한 후 세포성장, 포도당 및 ethanol 농도 변화를 측정하여, respiratory capacity와 respiratory capacity를 통하여 이용되는 포도당 flux를 관찰하였다.

myo-inositol이 결핍된 경우와 결핍되지 않은 경우 모두 포도당 pulse-addition후 첨가된 포도당이 소모되어 ethanol이 전환되며, 이 ethanol이 다시 소모되는 전형적인 양상을 보였으나(Fig. 5), myo-inositol의 결핍이 $Q_{O_2,max}$ 를 감소시킨다는 실험적 사실로부터 예측할 수 있듯이, respiration을 통해 포도당을 이용하고 있는 연속배양(D=0.2, 1/hr)에서 myo-inositol이 첨가되지 않은 경우에 ethanol 생성이 보다 빠르게 일어났으며, 또한 비슷한 속도로 포도당을 소비하고도 더 많은 양의 ethanol을 생성하였다(Fig. 5(A)). 세포농도의 큰 변화 없이 일어나는 이러한 현상은, myo-inositol 결핍으로 인해 $Q_{O_2,max}$ 이 상대적으로 감소하여 respiration을 통해 이용될 수 있는 포도당 flux가 감소하였기 때문에 일어나는 현상으로 설명할 수 있다.

이러한 현상을 정량적으로 분석하기 위하여, myo-inositol이 결핍된 경우와 그렇지 않은 경우의 specific ethanol production rate(Q_p), specific glucose uptake rate(Q_s), fermentation을 통해 이용되는 포도당의 uptake rate($Q_{s,ferm}$), 그리고 respiration을 통해 이용되는

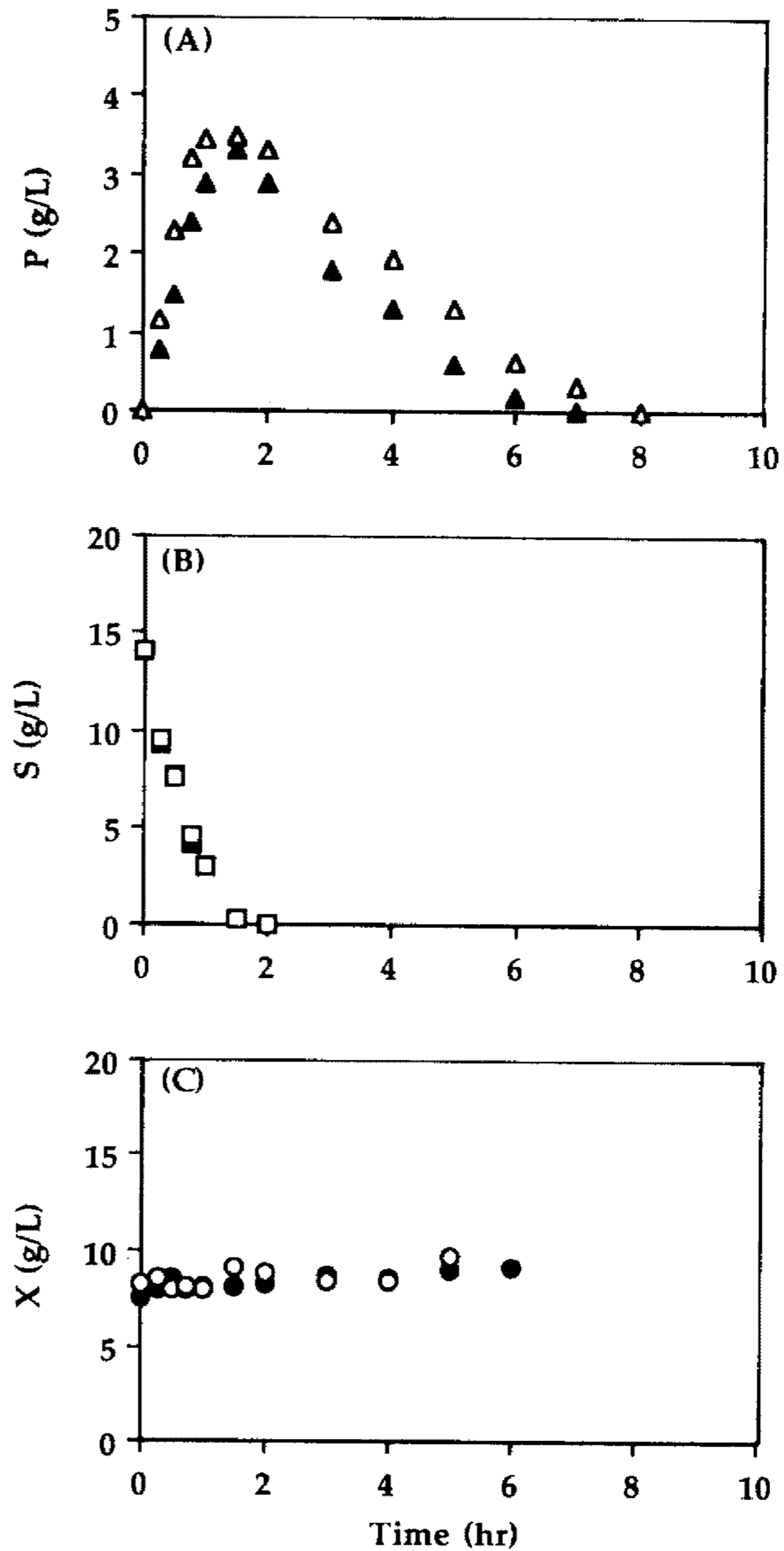


Fig. 5. Time-course of ethanol (A), glucose (B), and cell (C) concentration after glucose pulse-addition (D=0.2, 1/hr).

open symbol: myo-inositol-deficient culture (myo-inositol-not-supplement)
 closed symbol: myo-inositol-sufficient culture (myo-inositol-supplement)

포도당의 uptake rate($Q_{s,resp}$)을 각각 계산하여 pulse-addition된 포도당이 어떤 분포로 respiration과 fermentation을 통하여 이용되는지를 조사하여 보았다(Fig. 6, 7). 포도당 pulse-addition 이전에는 myo-inositol의 결핍과 관계없이 ethanol 생성이 관찰되지 않았으며, 포도당이 모두 respiration을 통해 이용되었지만($Q_s = Q_{s,resp}$, $Q_p = 0$), 포도당의 pulse-addition후에는 myo-inositol이 결핍된 경우에 myo-inositol이 첨가된 경우보다, Q_s 값이 상대적으로 작음에도 불구하고, 큰 Q_p 값을 보였으며, 이때의 $Q_{s,ferm}$ 과 $Q_{s,resp}$ 을 계산해 보면

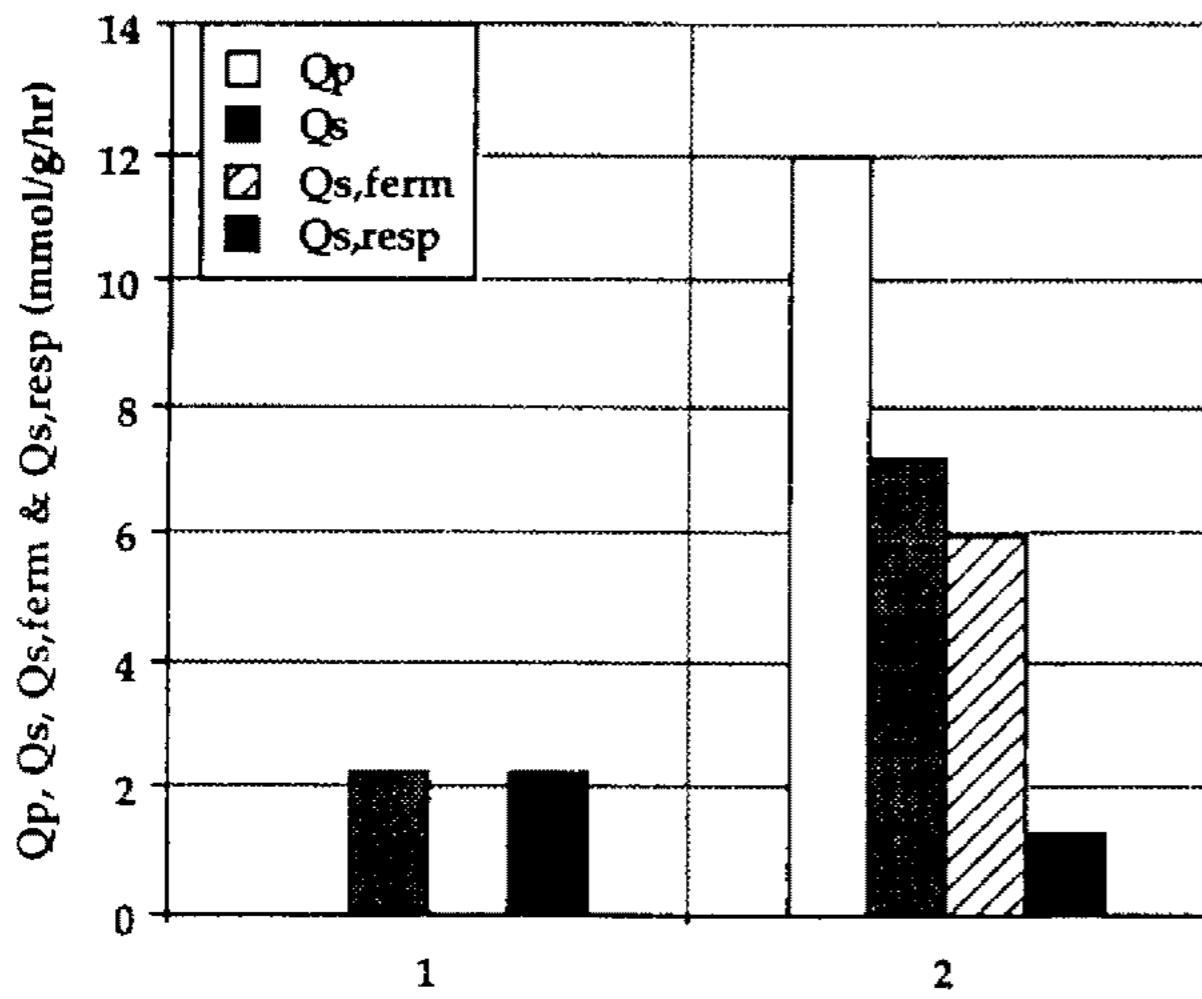


Fig. 6. Changes of specific ethanol production rate (Q_p) and specific glucose uptake rate (Q_s , $Q_{s,ferm}$, $Q_{s,resp}$) before and after glucose pulse-addition.

1: myo-inositol-deficient* culture before glucose pulse-addition
 2: myo-inositol-deficient* culture after glucose pulse-addition
 *myo-inositol-not-supplemented

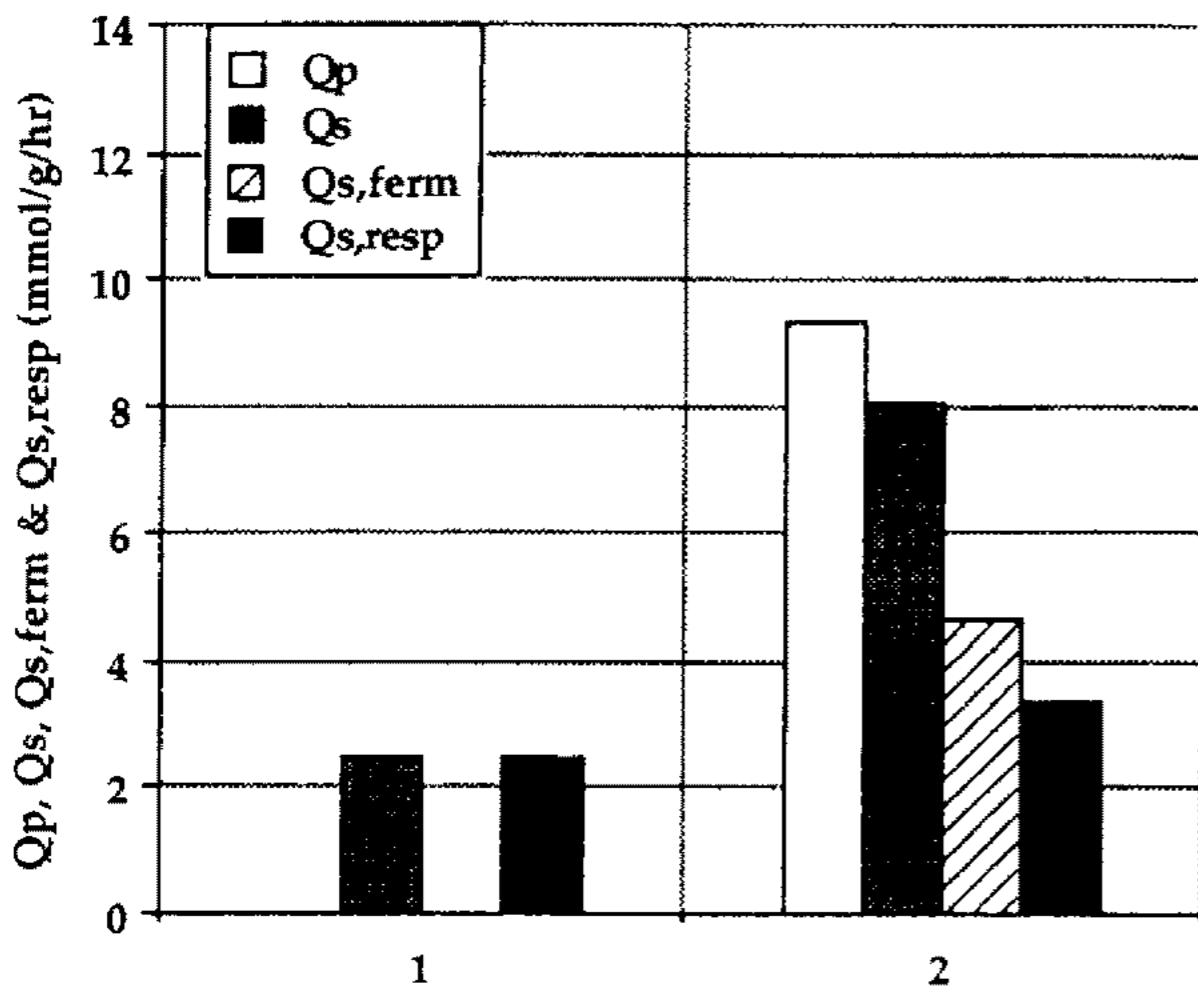


Fig. 7. Changes of specific ethanol production rate (Q_p) and specific glucose uptake rate (Q_s , $Q_{s,ferm}$, $Q_{s,resp}$) before and after glucose pulse-addition.

1: myo-inositol-deficient* culture before glucose pulse-addition
 2: myo-inositol-deficient* culture after glucose pulse-addition
 *myo-inositol-not-supplemented

myo-inositol이 결핍된 경우에 소비된 포도당중 상대적으로 작은 포도당이 respiration을 통해 이용되었고 반면에 더 많은 포도당이 fermentation을 통해 이용되었다는 것을 알 수 있었다. Fig. 7에서 myo-inositol이 결핍되지 않은 경우에 포도당 pulse-addition으로 약간의 $Q_{s,resp}$ 값 증가가 관찰된 것은 이 실험이 Petrik 등(24)의 실험과 동일한 환경에서 이루어져 포도당 첨가에

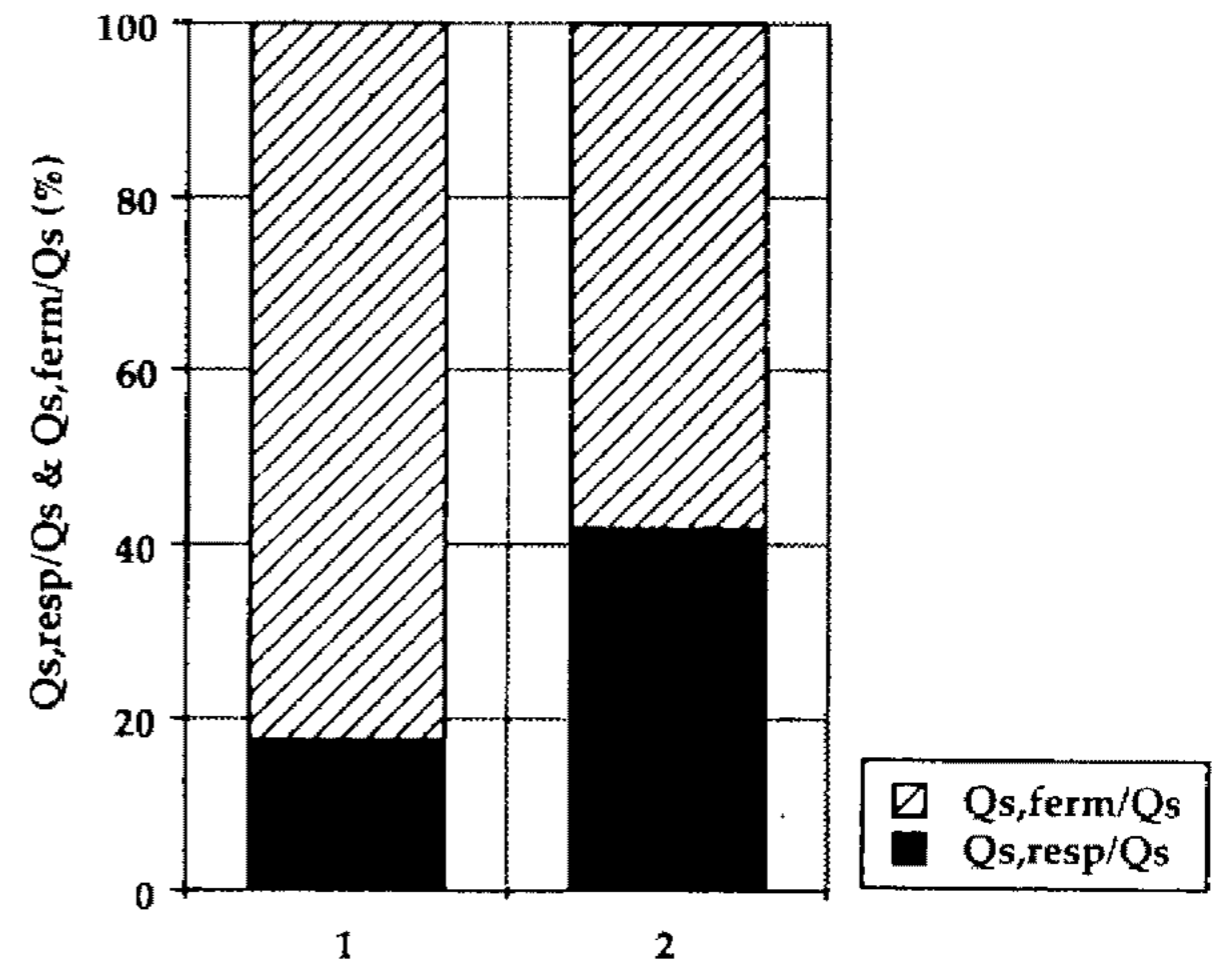


Fig. 8. Distribution between respiratory and fermentative metabolism after glucose pulse-addition.

1: myo-inositol-deficient* culture after glucose pulse-addition
 2: myo-inositol-deficient** culture after glucose pulse-addition
 *myo-inositol-not-supplemented
 **myo-inositol-supplemented

의한 Q_{O_2} 값의 일시적인 감소현상이 일어나지 않았음을 의미하는 것이라 하겠으며, 반대로 myo-inositol이 결핍된 경우의 $Q_{s,resp}$ 값 감소가 관찰되는데(Fig. 6), 이것은 myo-inositol과 같은 growth factor의 결핍으로 인해 respiratory capacity가 감소된 상황에서 respiratory capacity가 감당하지 못하는 과다한 포도당이 respiration을 통해 이용되지 못하기 때문에 일시적으로 일어나는 현상이라 생각한다.

myo-inositol의 결핍이 *S. cerevisiae*의 respiratory capacity를 감소시켜 respiration 쪽으로의 포도당 flux를 감소시키는 방향으로 영향을 끼친다는 사실을 Q_{O_2} 측정과 포도당 pulse-addition 실험을 통하여 실험적으로 입증 할 수 있었으며, 또한 myo-inositol이 결핍된 경우 그렇지 않은 경우에 비해 상대적으로 작은 부분의 포도당이 respiration을 통해 이용된다는 사실도 알 수 있었다(Fig. 8). 이러한 사실은 myo-inositol이 궁극적으로 인산지방질의 구성요소로 쓰이며, 이것의 결핍이 세포막과 mitochondria 막의 기능과 구조에 영향을 준다는(4) 이미 알려진 사실에 의해서도 잘 뒷받침된다 하겠다.

요 약

Saccharomyces cerevisiae(*S. cerevisiae*)의 growth factor중의 하나인 myo-inositol은 membrane-associated 효소인 phosphatidylinositol 합성효소에 의해 세포막의 구성 성분인 phosphatidylinositol로 incorporation되는 것으로 알려져있다. 그래서 myo-inositol이 결핍되면

막구조와 기능에 좋지 않은 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 이러한 myo-inositol의 생화학적 기능을 근거로 myo-inositol의 결핍이 호기적 포도당 대사에 미치는 영향을 조사하기 위하여 *S. cerevisiae*의 respiratory capacity를 대변하는 인자인 specific oxygen uptake rate (Q_{O_2})를 회분배양과 연속배양을 이용하여 측정하였다. 그리고, *S. cerevisiae*의 호기적 포도당 대사의 respiratory capacity를 myo-inositol이 결핍된 경우와 그렇지 않은 경우에 연속배양에서 포도당 pulse-addition을 한 후 관찰하였다.

그 결과 회분배양과 연속배양에서 myo-inositol이 결핍된 경우 maximum specific oxygen uptake rate ($Q_{O_2, \max}$)이 감소되는 현상을 관찰하였고, 포도당 pulse-addition 실험에서 얻은 결과를 정량적으로 분석하여 본 결과 myo-inositol의 결핍이 respiratory capacity의 감소를 초래하는 것이 관찰되었다.

약어

D_R : dilution rate where glucose metabolism changes from respiratory to respiro-fermentative type (1/hr)
 F_N : molar flow rate of nitrogen (mmol/hr)
 K_O : saturation constant for oxygen (mmol/L)
 $N_{2, \text{air}}$: partial pressure of nitrogen in air (atm)
 $N_{2, \text{ex}}$: partial pressure of nitrogen in exhaust gas (atm)
 O : dissolved oxygen concentration (mmol/L)
 OUR : volumetric oxygen uptake rate (mmol/L/hr)
 $O_{2, \text{air}}$: partial pressure of oxygen in air (atm)
 $O_{2, \text{ex}}$: partial pressure of oxygen in exhaust gas (atm)
 P : ethanol concentration (g/L)
 P_{avg} : average ethanol concentration during Δt (g/L)
 Q_{O_2} : specific oxygen uptake rate (mmol/g/hr)
 $Q_{O_2, \max}$: maximum specific oxygen uptake rate (mmol/g/hr)
 Q_P : specific ethanol production rate (mmol/g/hr)
 $Q_{P, i}$: instantaneous specific ethanol production rate (mmol/g/hr)
 Q_S : specific glucose uptake rate (mmol/g/hr)
 $Q_{S, \text{ferm}}$: specific glucose uptake rate used for fermentative metabolism (mmol/g/hr)
 $Q_{S, i}$: instantaneous specific glucose uptake rate (mmol/g/hr)
 $Q_{S, \text{resp}}$: specific glucose uptake rate used for respiratory metabolism (mmol/g/hr)
 S : glucose concentration (g/L)
 S_{avg} : average glucose concentration during Δt

(g/L)
 S_0 : initial glucose concentration in batch culture (g/L)
 S_R : glucose concentration in reservoir (g/L)
 V : culture volume (L)
 X : cell concentration (g/L)
 X_{avg} : average cell concentration during Δt (g/L)
 $Y_{S/O}$: yield coefficient (g-glucose/mmol-oxygen)
 ΔX : change of cell concentration during Δt (g/L)
 ΔP : change of glucose concentration during Δt (g/L)
 Δt : time interval of sampling (hr)

참고문헌

1. Fernandez, S., M.J. Homann, S.A. Henry, and G.M. Carman. 1986. Metabolism of the phospholipid precursor inositol and its relationship to growth and viability in the natural auxotroph *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Bacteriol.* **166**(3): 779-786.
2. Kuchler, K., G. Daum, and F. Paltauf. 1986. Subcellular and submitochondrial localization of phospholipid-synthesizing enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **165**(3): 901-910.
3. Kelly, M.J., A.M. Bailis, S.A. Henry, and G.M. Carman. 1988. Regulation of phospholipid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **263**(34): 18078-18085.
4. Dohi, M., G. Tamura, and K. Arima. 1971. Biochemical studies on myo-inositol in microbes; Part II Effects of inositol deficiency on some chemical and physiological properties of *Saccharomyces cerevisiae* inositol-less mutant A-21-20. *Agr. Biol. Chem.* **35**(10): 1503-1516.
5. Atkinson, K.D., A.I. Kolat, and S.A. Henry. 1977. Osmotic imbalance in inositol-starved spheroplast of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **132**(3): 806-817.
6. Ulaszewski, S., J.R. Woodward, and V.P. Cirillo. 1978. Membrane damage associated with inositol-less death in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **136**(1): 49-54.
7. Dohi, M. and K. Arima. 1979. The polysaccharide releasing phenomenon and cell envelope of the inositol-exacting yeast in inositol-deficiency. *Agr. Biol. Chem.* **43**(5): 929-942.
8. Hanson, B.A. and R.L. Lester. 1980. Effects of inositol starvation on phospholipid and glycan syntheses in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **142**(1): 79-89.
9. Hanson, B.A. and R.L. Lester. 1982. Effect of inositol starvation on the *in vitro* syntheses of mannan and N-acetylglucosaminylpyrophosphoryldolichol in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **151**(1): 334-342.
10. Arima, K., M. Dohi, K. Nagaoka, and G. Tamura. 1970. Biochemical studies on myo-inositol in microbes; Part I Dependency of the yeasts on myo-inositol and the abnormalities of inositol exacting yeasts cul-

- tured in inositol deficiency. *Agr. Biol. Chem.* **34**(1): 1-15.
11. Barford, J.P. and R.J. Hall. 1979. An examination of the Crabtree effect in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of respiratory adaptation. *J. Gen. Microbiol.* **114**: 267-275.
 12. Barford, J.P., P.M. Jeffery, and R.J. Hall. 1981. The Crabtree effect in *Saccharomyces cerevisiae*-primary control mechanism or transient ? Pp. 255-260. In Moo-Young, M. et.al. (ed.), *Advances in Biotechnology*, Vol. 1, Pergamon Press, Toronto.
 13. Barford, J.P. and R.J. Hall. 1981. A mathematical model for the aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae* with a saturated respiratory capacity. *Biotech. Bioeng.* **23**: 1735-1762.
 14. Rieger, M., O. Käppeli, and A. Fiechter. 1983. The role of limited respiration in the incomplete oxidation of glucose by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 653-661.
 15. Rieger, M., O. Käppeli, and A. Fiechter. 1981. The respiratory capacity of *Saccharomyces cerevisiae*. Pp. 369-373. In Stewart G.G. and I. Russel (ed.), *Current Developments in Yeast Research*, Pergamon Press, Toronto.
 16. Sonnleitner, B. and O. Käppeli. 1986. Growth of *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by its limited respiratory capacity: Formulation and verification of a hypothesis. *Biotech. Bioeng.* **28**: 927-937.
 17. Sonnleitner, B. and U. Hahnemann. 1994. Dynamics of the respiratory bottleneck of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnol.* **38**: 63-79.
 18. Chaplin, M.F. and J.F. Kennedy. 1986. *Carbohydrate analysis*. Pp. 3. IRL press, Oxford, England.
 19. Käppeli, O. 1986. Regulation of carbon metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* and related yeasts. *Adv. Microbiol. Physiol.* **28**: 181-209.
 20. Meyenburg, H.K. von. 1969. *Katabolit-Repression und der Sprossungsstus von Saccharomyces cerevisiae*. Ph. D. Thesis, ETH, Z rich, Switzland.
 21. Beck, C. and H.K. von Meyenburg. 1968. Enzyme pattern and aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae* under various degrees of glucose limitation. *J. Bacteriol.* **96**(2): 479-486.
 22. Käppeli, O., M. Gschwend-Petrik, and A. Fiechter. 1985. Transient Responses of *Saccharomyces uvarum* to a change of the growth-limiting nutrient in continuous culture. *J. Gen. Microbiol.* **131**: 47-52.
 23. Rohner, M., G. Locher, B. Sonnleitner, and A. Fiechter. 1988. Kinetics and modeling of stereoselective reduction of acetoacetic acid esters by continuously growing cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnol.* **9**: 11-28.
 24. Petrik, M., O. Käppeli, and A. Fiechter. 1983. An Expanded concept for the glucose effect in the yeast *Sacchromyces uvarum*: Involvement of short-and long-term regulation. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 43-49.

(Received 20 March 1996)