

*Pseudomonas sp.*의 炭素源에 따른 代謝活性에 關한 研究

裴 光 星 · *李 永 祿

(경상대학교 과학교육과 · *고려대학교 생물학과)

Studies on the metabolic activities of *Pseudomonas sp.* in different carbon sources.

BAE, Kwang Sung and *Yung Nok LEE

(Dept. of Science Education, Gyeongsang Natl. Univ., and *Dept. of Biology, Korea Univ.)

ABSTRACT

In order to compare the metabolic activities of methanol utilizing bacteria, *Pseudomonas sp.* grown in different carbon sources, changes in respiratory activities, principal enzyme activities for the energy metabolism, and the macromolecular compositions of the cells grown on methanol or glucose were measured.

1. The respiratory activity of cells grown on methanol was higher than that of cells grown on glucose, while glucose exhibited the highest O₂-consumption rate among the different respiratory substrates.
2. The activity of hydroxy pyruvate reductase which participates in serine pathway was high in the cells grown on methanol, while no activity was found in the cells grown on glucose.
3. The activity of alcohol oxidase in the cells grown on glucose were a little higher in those grown on methanol. However, activities of NAD-linked alcohol dehydrogenase, formaldehyde dehydrogenase and formate dehydrogenase were slightly lower in the cells grown on glucose than on methanol.
4. For succinic dehydrogenase and malic dehydrogenase which take part in TCA cycle, the specific activities were higher in the cells grown on methanol than in those grown on glucose. No activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase, which participates in pentose monophosphate shunt, was detectable in the cells grown on either carbon sources.
5. Protein contents of the cells grown on methanol increased relatively compared with those of the cells grown on glucose. However, there are no changes in the contents of carbohydrate and nucleic acid.

緒 論

最近 10餘年에 걸쳐 全 世界的으로 蛋白質資
源으로서의 Single Cell Protein(SCP)에 對한 집

중적인 研究가 이루어졌다. Whittenbury *et al.*
(1970)이 메탄資化細菌에서 未來의 食糧원으로서의 SCP生産을 爲한 研究를 시도한 이래 Chalfan *et al.*(1972), Cooney *et al.*(1972), Mateles
(1975)等에 의해 메탄올과 같은 C₁-化合物로 부

터의 SCP生産의 효율성이 立證되었다.

Söhngen(1906)에 의해 메탄資化細菌, *Bacillus methanicus*가 처음으로 報告된 이후 1966년까지 단 3種의 메탄資化細菌, *Pseudomonas methanica* (Dworkin *et al.* 1956; Leadbetter *et al.* 1958; Harrington *et al.* 1960), *Methanomonas methanooxidans*(Brown *et al.* 1964) 및 *Methylococcus capsulatus*(Foster *et al.* 1966) 등이 各各 報告되었을 뿐인데 最近에 Whittenbury *et al.* (1975)은 Gram음성이며 호기성細菌인 메탄資化細菌 100餘 菌株을 分離하여 이들을 細胞膜 및 胞子の 微細구조에 따라 5群 15種으로 同定하여 報告한 바 있다.

한편 Seto *et al.*(1975)은 油田地帶 및 天然 gas 炭隕內에서 hydrocarbon을 資化하는 400餘 菌株의 細菌을 分離하여 이들의 特性에 따라서 3群으로 分類하였으며 대부분은 *Mycobacterium* 屬으로 同定하여 報告하였다.

대부분의 메탄올資化細菌은 methanol dehydrogenase에 의해 메탄올을 formaldehyde로 전환되며 formaldehyde는 메탄酸化 및 메탄올酸化過程에서 중심적위치에 있다고 볼수 있으며 C_1 -化合物을 資化하는 微生物에서 formaldehyde의 代謝경로는 Strom *et al.*(1974)이 메탄자화세균, *Methylococcus capsulatus* 등에서 報告한 바와 같이 Ribulose monophosphate(RMP)회로를 거치는 종류와 Newaz *et al.*(1975)이 *Pseudomonas* MA에서 報告한 serine회로 등이 알려져 있다.

本 研究에서는 우리나라 自然環境에서 分離한 메탄올資化細菌, *Pseudomonas sp.* 161에 있어 에너지源이나 炭素源으로 各各 메탄올과 포도당을 利用한 細胞의 代謝活性를 比較하고자 各各 다른 炭素源에서 자란 細胞의 여러가지 다른 呼吸基質에 對한 呼吸能의 變化와 에너지代謝회로에 關係하는 주요한 몇몇 酵素들의 活性를 測定 比較함과 동시에 細胞의 化學的 組成等的 차이점을 追跡하여 얻은 一聯의 實驗結果를 報告하고자 한다.

材料 및 方法

1. 實驗材料

土壤, 河水 및 工場廢水等 여러 標品으로 부터 250餘 菌株의 메탄올資化細菌을 分離하여 이중 가장 優秀한 메탄올資化能을 가진 *Pseudomonas sp.* 161을 選定하여 實驗材料로 使用하였다.

2. 呼吸能의 測定

炭素源을 달리하여 各各 메탄올과 포도당을 添加한 배지에서 배양후 細胞를 수확한 다음 50 mM phosphate buffer(pH 7.0)용액으로 3회 세척한 후 같은 buffer용액으로 細胞현탁액을 얻었다. 산소소비량의 測定은 conventional warburg manometer(30°C, in air)에 의하여 測定하였으며 main well에는 50 μ M sodium phosphate buffer(pH 7.0) 1ml, 細胞현탁액 1ml를 가하고 center well에는 10%KOH용액 0.2ml와 filter paper조각을 가하였으며 side arm에는 各各의 基質용액 1ml씩을 가하여 全體量이 3.2ml되게 하여 20분간 예열시킨후 反應은 side arm에서 기질을 가하여 시작하였다. 이때 各各의 기질농도는 메탄올 20 μ M, formaldehyde 13 μ M, formate 100 μ M, 포도당 20 μ M이 되게 하였다.

3. 細胞抽出物의 調製

메탄올과 포도당으로 炭素源을 달리한 培地에서 배양한 細胞를 各各 10,000rpm에서 10분간 원심분리(이하 4°C에서 수행)시켜 細胞를 수확하여 배지를 제거한 다음 50mM phosphate buffer 용액 20ml를 가하여 超音波粉碎機(Schoeller Schall TG 250, 250W, 20KHz)로 細胞를 마쇄시켰다. 마쇄된 細胞는 14,000rpm에서 20분간 원심분리시켜 상등액과 침전물을 各各 分離하 酵素液으로 使用하였다.

4. 酵素活性의 測定

Hydroxy pyruvate reductase(E.C. 1.1.1.29)의 測定은 Large *et al.*(1963)의 方法으로, Alcohol oxidase(E.C. 1.1.3.13)의 測定은 Tani *et al.*(1972)의 方法으로 NAD-linked alcohol dehydrogenase(E.C 1.1.1.1)의 測定은 Racker(1968)의 方法으로 Formaldehyde dehydrogenase(E.C 1.2.1.1)의 測定은 Kato *et al.*(1972)의 方法으로 Formate dehydrogenase(E.C 1.2.1.2)의 測定은 Kato *et al.*(1974)의 方法으로 Glucose-6-phosphate dehydrogenase(E.C 1.1.1.49)의 測定은 De Moss(1968)의 方法으로 Succinic dehy-

drogenase(E.C 1.3.99.1)의 測定은 Bonner(1968)의 方法으로 Malic dehydrogenase(E.C 1.1.1.37)의 測定은 Ochoa(1968)의 方法으로 各各 行하였으며 이들 酵素의 specific activity는 酵素 液內의 단백질 mg當 enzyme unit로 表示하였다.

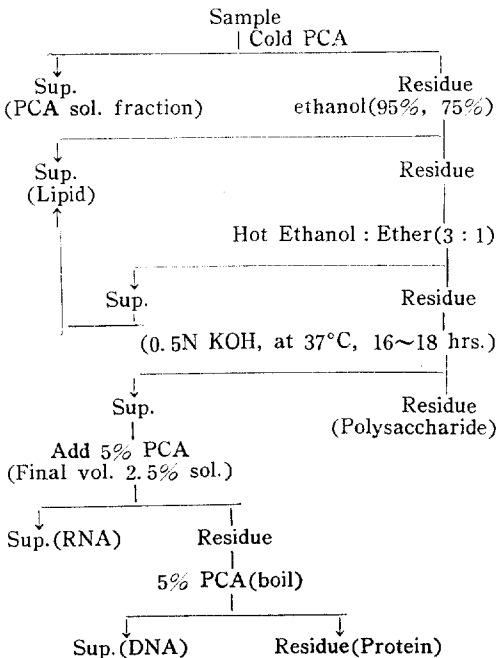
5. 細胞의 分割

炭素源을 달리하여 各各 메탄올과 포도당을 첨가한 배지에 一定量의 供試菌을 接種하여 30°C에서 72시간동안 진탕배양시킨 다음 10,000rpm에서 10분간 원심분리시켜 一定量의 細胞를 수확하였으며, 배지를 제거한 後 50mM phosphate buffer(pH 7.0)용액으로 3회 세척하였다. 細胞의 分割은 Schmidt와 Thanhauser(1945)法에 따라 Table 1과 같은 순서로 하였다.

그 처리 순서는 다음과 같다.

- (I) 5% PCA로 2회(30分, 15分)
- (II) 95%와 75% Ethanol로 各各 1회
- (III) Hot ethanol: Ether(3:1)로 3회
- (IV) 0.5N KOH로 37°C에서 16~18시간 처리하여 침전물을 제거하고

Table 1. Fractionation of nucleic acids, protein and carbohydrate compounds in *Pseudomonas sp.* 161 cells.



(V) 상등액에 cold 5% PCA를 가하여 2.5% 용액(최종농도)이 되게 한 다음

(W) 침전된 DNA단백을 5% PCA에 현탁하여 15분간 100°C에서 가열하여 단백질을 침전시켰다.

6. 分析

1) DNA 및 RNA의 定量

조작 (V) 및 (W)에서 얻은 상등액을 RNA, DNA로 보고 이들의 자외부 흡수도를 spectrophotometer(260nm)로 測定하였다.

2) 蛋白質의 定量

조작 (I)에서 얻은 상등액을 유리아미노산, 조작 (V)에서 얻은 상등액을 Alkali-labile protein, 조작 (W)에서 얻은 침전물을 Alkali-stable protein으로 보고 Ninhydrin反應(Troll et al. 1953)을 이용하여 定量하였으며 細胞抽出物內의 蛋白質濃度는 Lowry et al.(1951)의 方法으로 測定하였다. 이때 표준 단백질로는 bovine serum albumin을 使用하였다.

3) 炭水化物的 定量

조작 (I)에서 얻은 酸可溶性분획, 조작 (II)와 (III)에서 얻은 脂溶性분획, 조작 (W)에서 얻은 Alkali不溶性에 들어있는 炭水化물을 Anthrone反應(Scott et al. 1953)으로 定量하였다.

結 果

1. 炭素源에 따른 菌體의 呼吸能의 變化

炭素源을 달리하여 배양한 細胞현탁액을 使用하여 各各의 呼吸基質에 따른 細胞內의 산소소비량을 追跡한 結果를 Fig. 1에 나타내었다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 炭素源으로 메탄올을 가하여 배양한 細胞는 포도당培養보다 여러 가지 호흡기질에서 높은 呼吸能을 보여주었으며 호흡기질에 따른 산소소비량은 포도당이 가장 높은 값을 나타낸 반면에 formaldehyde를 호흡기질로 주었을때 가장 낮은 산소소비량을 나타내었다.

2. 炭素源에 따른 酵素活性의 變化

本 實驗에 使用한 *Pseudomonas sp.* 161의 에너지 代謝回路에 關여하는 주요 酵素들의 活性을 比較하기 위하여 메탄올과 포도당을 炭素源

Table 2. Hydroxy pyruvate reductase activity in extracts of *Pseudomonas* sp. 161 cell grown on methanol or glucose as sole carbon source.

| Sample | Total protein (mg/ml) | Total activity (Unit) | Specific activity (U/mg of protein) |
|-----------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------------------|
| Methanol-sup. | 1.07 | 2.70 | 2.52 |
| Methanol-pellet | 0.15 | 0.75 | 5.00 |
| Glucose-sup. | 0.61 | *ND | ND |
| Glucose-pellet | 0.69 | ND | ND |

*ND: No detectable activity was observed.

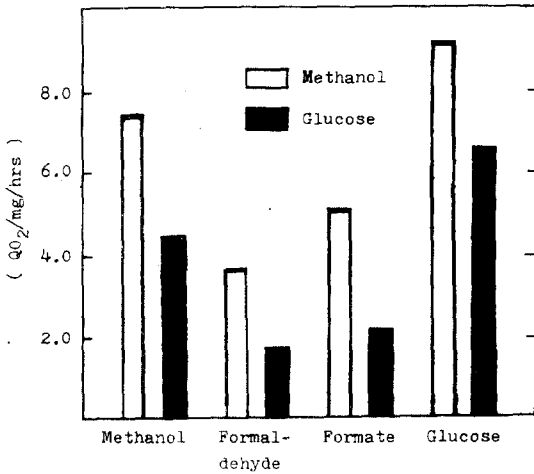


Fig. 1. Oxidation of methanol, formaldehyde, formate and glucose by the cell suspension of *Pseudomonas* sp. 161. Details of the reaction are given in "Materials and Methods".

으로 하여 배양한 細胞를 마쇄하여 얻은 상등액과 세포막계內에 存在하는 여러 酵素중에서 일차적으로 serine 回路에 關여하는 hydroxy pyruvate reductase의 活性은 Table 2 및 Fig. 2에서

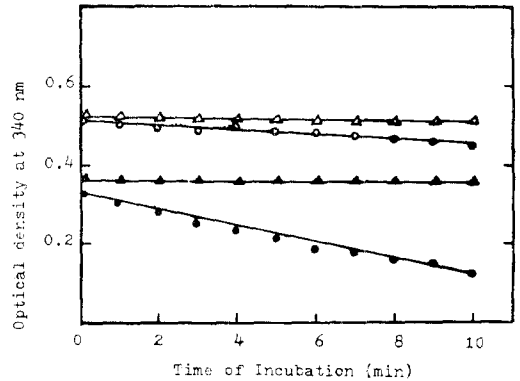


Fig. 2. NADH-oxidizing activities of hydroxy pyruvate reductase in extracts of *Pseudomonas* sp. 161 cells grown on methanol or glucose. ●—● Methanol-sup. ○—○ Methanol-pellet ▲—▲ Glucose-sup. △—△ Glucose-pellet

보는 바와 같이 메탄올에서 배양한 細胞의 상등액과 pellet에서 높은값을 나타낸 반면에 포도당에서 자란 細胞의 상등액과 pellet에서는 이와같은 酵素의 活性은 찾아볼 수 없었다. alcohol

Table 3. Alcohol oxidase and Glucose-6-phosphate dehydrogenase activities in extracts of *Pseudomonas* sp. 161 cell grown on methanol or glucose as sole carbon source.

| Sample | Total protein (mg/ml) | Alcohol oxidase | | Glucose-6-p dehydrogenase |
|-----------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------------|---------------------------|
| | | Total activity (Unit) | Sp. activity (U/mg protein) | Total activity (Unit) |
| Methanol-sup. | 0.83 | 5.00 | 6.02 | *ND |
| Methanol-pellet | 0.44 | 2.00 | 4.55 | ND |
| Glucose-sup. | 0.83 | 8.00 | 9.64 | ND |
| Glucose-pellet | 0.58 | 4.00 | 6.90 | ND |

*ND: No detectable activity was observed.

Table 4. Specific activities of NAD-linked alcohol dehydrogenase, Formaldehyde dehydrogenase and Formate dehydrogenase in cell extracts of *Pseudomonas* sp. 161 grown on methanol or glucose as sole carbon source.

| Sample | Total protein (mg/ml) | *Specific activity of | | |
|-----------------|-----------------------|----------------------------------|----------------------------|-----------------------|
| | | NAD-linked alcohol dehydrogenase | Formaldehyde dehydrogenase | Formate dehydrogenase |
| Methanol-sup. | 0.83 | 18.07 | 4.82 | 9.64 |
| Methanol-pellet | 0.44 | 12.50 | 2.27 | 3.98 |
| Glucose-sup. | 0.83 | 15.06 | 3.31 | 6.02 |
| Glucose-pellet | 0.58 | 7.76 | 3.45 | 3.88 |

*The specific activity was defined as $\Delta 340/\text{min}/\text{mg}$ protein.

Table 5. Succinic dehydrogenase and Malic dehydrogenase activities in extracts of *Pseudomonas* sp. 161 cells grown on methanol or glucose as sole carbon source.

| Sample | Total protein (mg/ml) | Succinic dehydrogenase | | Malic dehydrogenase | |
|-----------------|-----------------------|------------------------|----------------------------------|-----------------------|----------------------------------|
| | | Total activity (Unit) | Specific activity (U/mg protein) | Total activity (Unit) | Specific activity (U/mg protein) |
| Methanol-sup. | 0.83 | 0.30 | 18.22 | 4.00 | 4.82 |
| Methanol-pellet | 0.44 | 0.11 | 12.27 | 3.00 | 6.82 |
| Glucose-sup. | 0.83 | 0.11 | 6.51 | 1.00 | 1.20 |
| Glucose-pellet | 0.58 | 0.15 | 13.04 | 1.00 | 1.72 |

oxidase는 Table 3에서 보는 바와 같이 포도당 배양에서 추출한 상등액과 pellet의 活性이 메탄올 배양보는 높은 specific activity를 보여 주었으며 5탄당인산회로에 관여하는 酵素중에서 glucose-6-phosphate dehydrogenase의 活性은 모든 fraction에서 찾아 볼수 없었다. NAD-linked alcohol dehydrogenase, formaldehyde dehydrogenase 및 formate dehydrogenase의 specific activity는 Table 4에서 보는 바와 같이 모든 fraction에서 存在하였으나 특히 메탄올배양의 상등액에서 가장 높은 活性을 나타내었다. 한편 TCA 회로에 관여하는 酵素중에서 succinic dehydrogenase 및 malic dehydrogenase의 活性에 대한 결과를 Table 5 및 Fig. 3에 나타내었는데 메탄올 배양의 細胞는 포도당배양의 細胞보다 높은 活性을 보여 주었다. 以上の 實驗에서 얻어진 여러 酵素들의 종합적인 결과를 Table 6에 表示하였다.

3. 炭素源에 따른 菌體의 化學的 組成

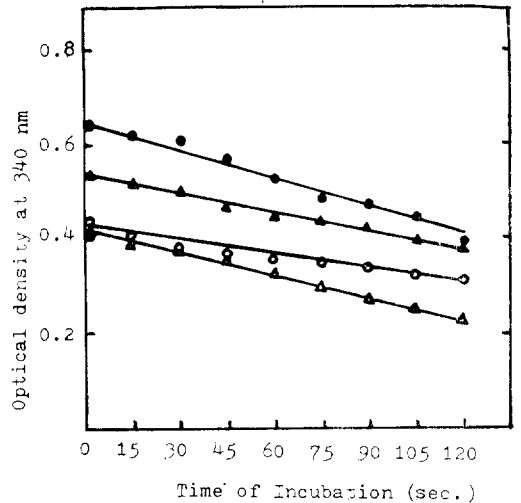


Fig. 3. NADH-oxidizing activities of malic dehydrogenase in extracts of *Pseudomonas* sp. 161 cells grown on methanol or glucose.
 ●—● Methanol-sup.
 ○—○ Methanol-pellet
 ▲—▲ Glucose-sup.
 △—△ Glucose-pellet

Table 6. Comparison of the different enzymes in extracts of *Pseudomonas* sp. 161 cells grown on methanol or glucose as sole carbon source.

| Enzyme | Methanol | | Glucose | |
|-----------------------------------|----------|--------|---------|--------|
| | sup. | pellet | sup. | pellet |
| Hydroxy pyruvate reductase | *+ | + | *- | - |
| Alcohol oxidase | + | + | + | + |
| NAD-linked alcohol dehydrogenase | + | + | + | + |
| Formaldehyde dehydrogenase | + | + | + | + |
| Formate dehydrogenase | + | + | + | + |
| Glucose-6-phosphate dehydrogenase | - | - | - | - |
| Succinic dehydrogenase | + | + | + | + |
| Malic dehydrogenase | + | + | + | + |

*+: Positive -: Negative

Table 7. DNA, RNA and nucleotide content of *Pseudomonas* sp. 161 cells grown on methanol or glucose for 3 days.

| Fraction | Carbon Source | |
|------------|---------------|--------------|
| | Methanol(O.D) | Glucose(O.D) |
| DNA | 0.064 | 0.054 |
| RNA | 0.242 | 0.254 |
| Nucleotide | 0.047 | 0.044 |

1) 核酸含量的 變化

炭素源을 달리하여 배양한 細胞에서 DNA, RNA 및 nucleotide의 含量變化를 Table 7 및 Fig. 4에 나타내었다. 여기서 보는 바와같이 메탄올 및 포도당을 가하여 배양한 細胞에 있어 거의 비슷한 含量의 變化를 보여 주었다.

2) 蛋白質含量的 變化

酸可溶性 및 알칼리에 安定한 단백질과 알칼

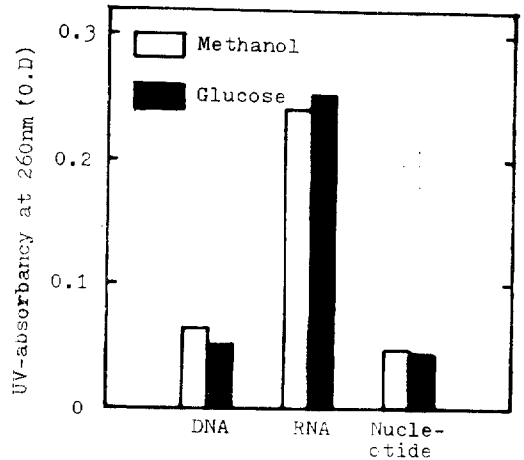


Fig. 4. Amounts of UV-absorbing materials in DNA, RNA and nucleotide fraction of *Pseudomonas* sp. 161 cells grown on methanol or glucose for 3 days.

Table 8. Amounts of Ninhydrin reactive substances in each fraction of *Pseudomonas* sp. 161 cells grown on methanol or glucose for 3 days.

| Fraction | Carbon Source | | | |
|-----------------------|---------------|-------------------|---------------|-------------------|
| | Methanol | | Glucose | |
| | Total μ M | μ M/mg dry wt | Total μ M | μ M/mg dry wt |
| PCA soluble | 39960.00 | 177.60 | 31000.62 | 123.02 |
| Alkali-labile protein | 84525.00 | 375.67 | 77618.00 | 308.00 |
| Alkali-stable protein | 54810.00 | 243.60 | 21369.60 | 84.80 |
| Total protein | | 619.27 | | 392.80 |

Table 9. Amounts of Anthrone reactive substances in each fraction of *Pseudomonas* sp. 161 cells grown on methanol or glucose for 3 days.

| Fraction | Carbon Source | | | |
|--------------------|---------------------|--------------------------------|---------------------|--------------------------------|
| | Methanol | | Glucose | |
| | Total μM | $\mu\text{M}/\text{mg}$ dry wt | Total μM | $\mu\text{M}/\text{mg}$ dry wt |
| PCA soluble | 4082.75 | 42.35 | 3966.10 | 55.08 |
| Ethanol: Ether | 2720.64 | 28.34 | 1204.20 | 16.72 |
| Alkali-insoluble | 7493.34 | 78.06 | 4247.62 | 58.99 |
| Total carbohydrate | | 148.93 | | 130.79 |

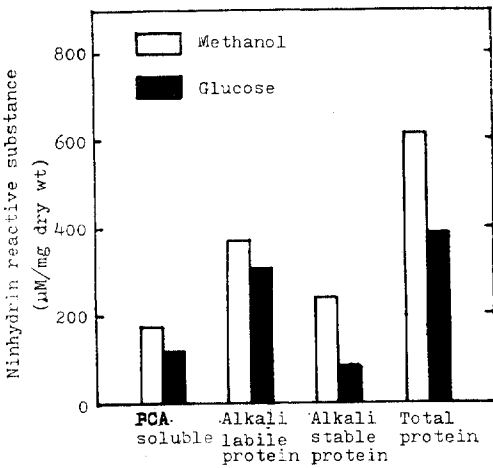


Fig. 5. Amounts of Ninhydrin reactive substance in each fraction of *Pseudomonas* sp. 161 cells grown on methanol or glucose for 3 days.

리에 不安定한 단백질의 含量變化는 Table 8 및 Fig. 5에서 보는 바와같이 알칼리에 安定한 단백질含量은 메탄올배양에서 현저한 증가를 보여 주었으므로 total protein의 含量은 메탄올배양에서 포도당배양 보다 약간의 증가현상을 나타내었다.

3) 炭水化合物含量의 變化

酸可溶性 分劃, 脂溶性 分劃 및 酸·알칼리 不溶性 分劃의 炭水化合物含量의 變化는 Table 9 및 Fig. 6에서 보는 바와같이 酸可溶性 分劃의 炭水化合物含量은 포도당배양에서 약간의 증가를 나타내었으나 脂溶性分劃 및 酸·알칼리 不溶性 分劃의 炭水化合物含量은 상대적으로 감소하였으므로 total carbohydrate의 變化는 메탄올 및 포

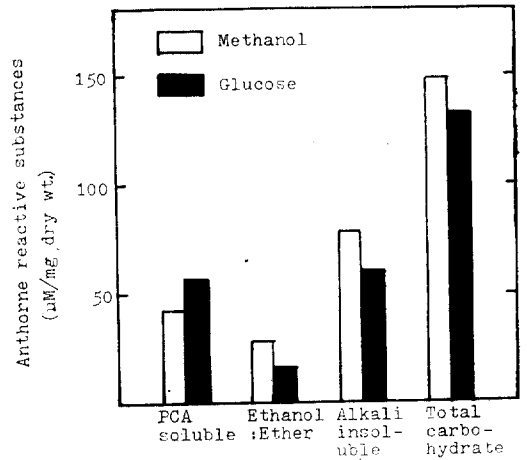


Fig. 6. Amounts of carbohydrate in each fraction of *Pseudomonas* sp. 161 cells grown on methanol or glucose for 3 days.

도당배양에서 찾아 볼 수 없었다.

考 察

Kato *et al.* (1975)은 메탄올 資化放線菌, *Streptomyces* sp. No. 239에서 呼吸基質로 메탄올 formaldehyde 및 formate를 各各 加하여 이들의 呼吸能을 추적한 결과 메탄올에서 가장 높은 값을 나타낸다고 報告하였는데 本 實驗에서는 포도당 다음으로 메탄올에서 가장 높은 呼吸能을 나타내었다. 한편 *Pseudomonas* sp. M27 (Anthony *et al.* 1964)에서 EDTA와 phenylhydrazine을 가하면 呼吸能이 억제되며 *Pseudomonas* AM₁ (Peel *et al.* 1961)에서는 sodium hypophosphate를 가할때 呼吸能이 억제되며 *Pseud-*

omonas C(Stieglitz *et al.* 1973)에서는 EDTA를 가해 주면 呼吸能이 억제되나 2,4-di-nitrophenol을 가할 때에는 증가를 나타낸다고 各各 報告하였다. 또한 *Pseudomonas* AM₁(Zakharova *et al.* 1980)의 細胞膜內에서 호흡기질로 formate를 가하여 呼吸能을 조사한 결과 reduced TMPD(tetra methyl-p-phenylene diamine)와 cytochrome C가 呼吸能을 억제시켜 주는 inhibitor로 作用한다고 報告한 바 있다.

Mcnerney *et al.*(1980)은 *Pseudomonas* AM₁ 및 *Hyphomicrobium* X에서 alcohol dehydrogenase의 存在를 報告하였는데 本 實驗에서도 NAD-linked alcohol dehydrogenase, formaldehyde dehydrogenase 및 formatedehydrogenase의 活性이 높은 값을 보여 주었다. 一般的으로 C₁-化合物을 자화하는 methylotrophs에 의한 메탄으로 부터 CO₂의 酸化過程에서 Colby *et al.*(1979)은 two-electron oxidation step을 經由하여 一聯의 反應이 일어남을 報告한 바 있다. 한편 Stirling *et al.*(1978)은 formaldehyde에서 formate를 거쳐 CO₂로 完全酸化되는 과정에서 formaldehyde dehydrogenase와 formate dehydrogenase가 관여하여 生長에 필요한 energy를 얻을수 있으며 대략 30% 정도가 이와같은 酸化過程을 거치며 나머지 70%는 생체내에서 炭素源으로 자화된다고 報告하였다.

Quayle(1975)와 Colby *et al.*(1979)은 C₁-化合物을 자화하는 微生物은 크게 3가지 回路를 거치는 것으로 나누어 설명하였는데 이와같은 자화회로는 (1) RMP回路, (2) Serine回路, (3) RuDP回路 等이다. 먼저 RMP回路는 Kemp *et al.*(1967)이 *Pseudomonas methanica*에서 처음으로 밝힌 이래 Lawrence *et al.*(1970)과 Kemp(1974)는 RMP回路에서 2개의 Key enzyme으로 作用하는 3-hexulose phosphate synthase와 phospho-3-hexuloisomerase가 存在하는 回路임을 밝혔다.

특히 Goldberg *et al.*(1975)은 *Pseudomonas* C에서 주어진 炭素源에 따라 각기 다른 자화능을 보여 준다고 밝혔는데 메탄올에서는 RMP回路를 利用하지만 formaldehyde나 formate에서는 serine回路를 거치며 이들 炭素源을 모두 添加하

여 混合培養하면 RMP回路를 지닌다고 考察한 바 있다. 둘째로 serine回路는 Large *et al.*(1961)이 메탄올자화세균 *Pseudomonas* AM₁에서 메탄올로부터 glycine, malate 및 aspartate를 거쳐 serine으로 전환되는 과정에서 처음으로 밝힌 回路로서 Ribbons *et al.*(1970)은 reduced C₁-compounds를 자화하는 *Pseudomonas* AM₁, *Pseudomonas* PRL-W₅, *Pseudomonas* MS, *Hyphomicrobium vulgare*, *Methanomonas methanooxidans* 등에서 이와 같은 回路를 통하여 serine과 malate로 전환됨을 報告하였다. 한편 Lawrence *et al.*(1970)은 *Methylosinus trichosporium*은 malyl-CoA lyase의 存在하에서 serine回路를 Heptinstall *et al.*(1970) 및 Dunstan *et al.*(1972)은 *Pseudomonas* AM₁에서 serine回路의 Key enzyme인 hydroxy pyuvate reductase는 malyl-CoA lyase와 밀접한 관계가 있음을 Salem *et al.*(1973)은 *Pseudomonas* AM₁, *Pseudomonas* MA, *Pseudomonas* MS, *Hyphomicrobium* X 및 *Methylosinus trichosporium* 등의 細胞內에는 malyl-CoA lyase가 다량 存在하여 serine回路에 의해 oxaloacetate 나 phosphoenol pyruvate로 전환된다고 考察하였다.

마지막으로 RuDP回路는 Quayle *et al.*(1959)이 炭素源으로 formate를 자화하는 細菌 *Pseudomonas oxaliticus*에서 처음으로 밝혀낸 이래 특징적으로 독립영양을 취하는 메탄올자화세균중에서 Cox *et al.*(1975)은 *Micrococcus denitrificans*에서 Sham *et al.*(1976)은 *Rhodopseudomonas acidophila* strain 10050에서 RuDP回路에 관여하는 ribulose diphosphate carboxylase가 存在함을 확인하였으며 중간대사산물로서 formaldehyde와 formate를 거쳐 CO₂로 完全酸化되어 지는 과정을 밝힌 바 있다. 또한 Trotsenko(1975)는 prokaryotes로서 *Pseudomonas methylica*와 eukaryotes로서 *Candida methylica*와 같은 2種의 메탄올을 資化하는 微生物에서 資化回路를 追跡한 결과 原核細胞로 된 대부분의 細菌類는 methanol dehydrogenase와 연관되어 serine回路를 眞核細胞로 된 酵母類에 있어서는 methanol oxidase가 관여하여 RMP回路를 거쳐 資化됨을 발표하였다.

Taylor *et al.* (1976a), (1976b)은 *Pseudomonas AM₁*을 炭素源으로 3-hydroxybutyrate에서 培養時 Acetyl-CoA로 부터 glyoxylate로 전환되는데 serine回路的 key enzyme인 hydroxy pyruvate reductase는 관여치 않으며 炭素源으로 pyruvate, succinate 및 C₁-化合物을 가하여 培養하면 malate synthase가 缺如되어 있으며 pyruvate에서 Acetyl-CoA의 전환은 pyruvate dehydrogenase가 存在하여 이루어지며 Acetyl-CoA의 完全한 酸化過程은 TCA回로를 經유한다고 報告하였다. 한편 Stanier *et al.* (1976)은 모든 facultative methylotrophs는 glyoxylate回로를 통하여 C₁-化合物로 부터 炭素資化가 일어나며 obligate methylotrophs중에서 RMP回로를 거쳐 formaldehyde로 전환되는 과정에서 α -ketoglutarate dehydrogenase가 缺如되어 결국 TCA回로를 利用하지 못하는 반면에 serine回로를 거치는 과정에서는 α -ketoglutarate dehydrogenase가 存在하여 TCA回로를 利用한다고 주장하였다.

Patt *et al.* (1974)은 메탄올자화세균 Isolate XX에서 Patel *et al.* (1978)은 메탄자화세균 Isolate R6에서 各各 glucose-6-phosphate dehydrogenase의 活性이 나타나지 않음을 報告한 바 있는데 本 實驗에서도 이와 같은 酵素의 活性은 나타나지 않았다. 지금까지 서술한 여러 결과와 本 研究에서 밝힌 *Pseudomonas sp.* 161의 에너지 代謝回路에 관여하는 여러가지 주요 酵素들

의 活性에 대한 결과를 分析하여 다음과 같은 사실을 추정하였다. 炭素源으로 메탄올을 가하여 培養한 細胞에서는 hydroxy pyruvate reductase가 높은 活性을 지닌점에서 serine回로를 거쳐 formaldehyde로 전환되며 포도당을 가하여 培養한 細胞에서는 serine回로를 이용하지 않는 것으로 추정되며 succinic dehydrogenase 및 malic dehydrogenase의 活性은 메탄올 및 포도당 培養에서 모두 높은 活性을 보여 주었으므로 CO₂로의 完全한 酸化過程은 TCA回路에 의해 이끌린다고 추정되었다.

一般的으로 生物體에 있어 細胞數의 증가는 DNA량의 증가에 의해 일어남을 알수 있는데 本 研究에서도 單位菌體當 DNA含量은 메탄올 培養에서 약간의 증가현상을 보여 주었는데 이는 菌體의 生長에 있어 포도당 培養보다는 메탄올 培養에서 生長이 왕성한 결과와 一致하였다. Lee *et al.* (1978)은 메탄올자화세균 *Acinetobacter sp.*에서 알칼리에 不安定한 단백질이 알칼리에 安定한 단백질보다 메탄올 및 sucrose 培養에서 단백질含量이 높았다고 報告한 바 있는데 이는 本 實驗의 결과와 잘 부합되었다. 한편 本 實驗에서 炭素源에 따른 核酸 및 탄수화물含量의 變化는 찾아볼 수 없었으나 Total protein含量에 있어 메탄올 培養에서 포도당 培養보다 약간의 증가를 나타낸 것은 脂質 이외의 기타 다른 組成의 含量이 포도당 培養에서 메탄올 培養보다는 훨씬 증가해야 될 것으로 생각되었다.

摘 要

우리나라 自然環境에서 分離한 메탄올資化細菌 *Pseudomonas sp.* 161의 炭素源에 따른 代謝活性을 비교하고자 各各 메탄올과 포도당에서 자란 細胞의 여러가지 呼吸基質에 對한 呼吸能의 變化와 다른 에너지代謝回路의 主要 酵素들의 活性을 測定비교함과 동시에 細胞의 化學的組成의 變化를 추적하였다.

1. 메탄올을 炭素源으로 하여 자란 菌體의 呼吸能은 포도당을 炭素源으로 하여 자란 菌體의 呼吸能 보다 여러가지 呼吸基質에서 일반적으로 높은 값을 나타내었고 供試呼吸基質중에서는 포도당이 가장 높은 酸素消費量을 나타내었다.
2. 메탄올에서 자란 細胞는 serine回路에 관여하는 hydroxy pyruvate reductase의 活性이 높은 값을 나타내었으나 포도당에서 자란 細胞에서는 그 活性을 찾아 볼수 없었다.
3. Alcohol oxidase의 活性은 포도당에서 자란 細胞가 메탄올에서 자란 細胞에 비해 약간 높았으나 NAD-linked alcohol dehydrogenase의 活性은 오히려 약간 감소하는 경향을 나타내었다.
4. TCA回路에 관여하는 succinic dehydrogenase 및 malic dehydrogenase의 活性은 메탄올에서 자란 細胞가 포도당에서 자란 細胞보다 현저히 높은 값을 나타내었고 5탄당인산回路에 관여하는 glucose-6-phosphate dehy-

drogenase는 어느 경우에도 그 活性을 찾아 볼수 없었다.

5. 메탄올에서 자란 細胞의 蛋白質含量은 포도당에서 자란 細胞의 그것에 비해 상당히 증가하였다. 그러나 核酸이나 炭水和物含量에는 큰 變化가 없었다.

引用 文 獻

1. Anthony, C., and L.J. Zatman. 1964. The Microbial Oxidation of Methanol. 1. Isolation and properties of *Pseudomonas* sp. M27. *Biochem. J.* **92**, 609~613.
2. Bonner, W.D. 1968. Succinic dehydrogenase. In *Methods in Enzymology*, Vol. I, 722~729. Academic Press Inc., New York.
3. Brown, L.R., R.J. Strawinski, and C.S. McCleskey. 1964. The isolation and characterization of *Methanomonas methanooxidans* Brown and Strawinski. *Cn. J. Microbiol.* **10**, 780~791.
4. Chalfan, Y., and R.I. Mateles. 1972. New *Pseudomonad* Utilizing Methanol for Growth. *Applied Microbiol.* **23**, 135~140.
5. Colby, J., H. Dalton, and R. Whittenbury. 1979. Biological and Biochemical Aspects of Microbial Growth on C₁ Compounds. *Ann. Rev. Microbiol.* **33**, 481~517.
6. Cooney, C.L., and D.W. Levine. 1972. Microbial utilization of methanol. *Advan. Appl. Microbiol.* **15**, 337~342.
7. Cox, R.B., and J.R. Quayle. 1975. The autotrophic growth of *Micrococcus denitrificans* on Methanol. *Biochem. J.* **150**, 569~571.
8. De Moss, R.D. 1968. Glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconic dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*. In *Methods in Enzymology*, Vol. I, 328~334. Academic Press Inc., New York.
9. Dunstan, P.M., C. Anthony, and W.T. Drabble. 1972. Microbial Metabolism of C₁ and C₂ Compounds: The Role of Glyoxylate, Glycollate and Acetate in the growth of *Pseudomonas* AM1 on Ethanol and on C₁-Compounds. *Biochem. J.* **128**, 107~115.
10. Dworkin, M., and J.W. Foster, 1956. Studies on *Pseudomonas methanica*(Söhngen) nov. comb. *J. Bacteriol.* **72**, 646~659.
11. Foster, J.W., and R.H. Davis. 1966. A methane-dependent coccus, with notes on classification and nomenclature of obligate, methane-utilizing bacteria. *J. Bacteriol.* **91**, 1924~1931.
12. Goldberg, I., and R.I. Mateles. 1975. Growth of *Pseudomonas* C on C₁ Compounds: Enzyme Activities in Extracts of *Pseudomonas* C Cells Growth on Methanol, Formaldehyde, and Formate as sole Carbon Sources. *J. Bacteriol.* **122**, 47~53.
13. Harrington, A.A., and R.E. Kallio, 1960. Oxidation of methanol and formaldehyde by *Pseudomonas methanica*. *Can. J. Microbiol.* **6**, 1~7.
14. Heptinstall, J., and J.R. Quayle. 1970. Pathway leading to and from serine during growth of *Pseudomonas* AM1 on C₁ Compounds of succinate. *Biochem. J.* **117**, 563~572.
15. Kato, K., T. Tamaoki, and Y. Tani. 1972. Purification and Characterization of Formaldehyde dehydrogenase in a Methanol-utilizing Yeast, *Kloeckera* sp. No. 2201. *Agr. Biol. Chem.* **36**, 2411~2419.
16. Kato, N., M. Kano., Y. Tani, and K. Ogata. 1974. Purification and Characterization of Formate Dehydrogenase in a Methanol-utilizing Yeast, *Kloeckera* sp. No. 2201, *Agr. Biol. Chem.* **38**, 111~116.
17. Kato, N., K. Tsuji., Y. Tani, and K. Ogata. 1975. Utilization of Methanol by an *Actinomycete*. In *Microbial Growth on C₁-Compounds*. 91~98, Tokyo, Japan.
18. Kemp, M.B., and J.R. Quayle. 1967. Microbial Growth on C₁-Compounds: Uptake of (¹⁴C) Formaldehyde and (¹⁴C) Formate by Methane-grown *Pseudomonas methanica* and determination of the hexose labelling pattern after brief incubation with (¹⁴C) Methanol. *Biochem. J.* **102**, 94~102.
19. Kemp, M.B. 1974. Hexose phosphate Synthase from *Methylococcus capsulatus* makes D-arabino-3-Hexulose phosphate. *Biochem. J.* **139**, 129~134.
20. Large, P.J., D. Peel, and J.R. Quayle. 1961.

- Microbial growth on C₁-Compounds. 2. Synthesis of cell constituents by methanol- and formate-grown *Pseudomonas* AM1 and methanol-grown *Hyphomicrobium vulgare*. *Biochem. J.* **81**, 470~480.
21. Large, P.J., and J.R. Quayle. 1963. Microbial growth on C₁-Compounds. 5. Enzyme Activities in Extracts of *Pseudomonas* AM1. *Biochem. J.* **87**, 386~396.
 22. Lawrence, A.J., and J.R. Quayle. 1970. Alternative carbon assimilation pathways in methane-utilizing bacteria. *J. of Gen. Microbiol.* **63**, 371~374.
 23. Leadbetter, E.R., and J.W. Foster. 1958. Studies on some methane-utilizing bacteria. *Arch. Microbiol.* **30**, 91~118.
 24. Lee, Y.N., K.S. Bae, and C.H. Park. 1978. A Biological Study on the Methanol-Utilizing Bacteria. *Kor. J. Microbiol.* **16**, 170~179.
 25. Lowry, O.L., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265~275.
 26. Mateles, R.I. 1975. Process aspects of continuous culture for SCP production with methanol as a substrate. First ISC: IAMS proceedings. Tokyo, Japan.
 27. Mcnerney, T., and M.L. O'Connor. 1980. Regulation of enzymes associated with carbon-1 metabolism in 3 facultative methylotrophs. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**, 370~375.
 28. Newaz, S.S., and L.B. Hersh. 1975. Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide-Activated Phosphoenolpyruvate Carboxylase in *Pseudomonas* MA: Potential Regulation between Carbon Assimilation and Energy Production. *J. Bacteriol.* **124**, 825~833.
 29. Ochoa, S. 1968. Malic dehydrogenase from Pig heart. In *Methods in Enzymology*. Vol. I, 735~739. Academic Press Inc., New York.
 30. Patel, R.N., C.T. Hou, and A. Felix. 1978. Microbial oxidation of Methane and Methanol: Isolation of Methane-utilizing Bacteria and Characterization of a Facultative Methane-utilizing Isolates. *J. Bacteriol.* **136**, 352~358.
 31. Patt, T.E., G.C. Cole., J. Bland, and R.S. Hanson. 1974. Isolation and characterization of bacteria that grow on methane and organic compounds as sole sources of carbon and energy. *J. Bacteriol.* **120**, 955~964.
 32. Peel, D., and J.R. Quayle. 1961. Microbial Growth on C₁-compounds: 1. Isolation and characterization of *Pseudomonas* AM1. *Biochem. J.* **96**, 808~812.
 33. Quayle, J.R., and D.B. Keech. 1959. Carbon assimilation by *Pseudomonas oxaliticus* (OX1). 1. Formate and carbon dioxide utilization during growth on Formate. *Biochem. J.* **72**, 623~630.
 34. Quayle, J.R. 1975. Unsolved problems in the microbial metabolism of methane and methanol. In *Microbial Growth on C₁-Compounds*. 59~65. Tokyo, Japan.
 35. Racker, E. 1968. Alcohol dehydrogenase from Baker's Yeast. In *Methods in Enzymology*. Vol. I, 500~503. Academic Press Inc., New York.
 36. Ribbons, D.M., J.E. Harrison, and A.W. Wadzinski. 1970. Metabolism of Single Carbon Compounds. *Ann. Rev. Microbiol.* **24**, 135~158.
 37. Salem, A.R., A.J. Hacking, and J.R. Quayle. 1973. Cleavage of Methyl-Coenzyme A into Acetyl-Coenzyme A and Glyoxylate by *Pseudomonas* AM1 and other C₁-unit-utilizing Bacteria. *Biochem. J.* **136**, 89~96.
 38. Schmidt, G., and S.J. Tannhauser. 1945. A method for the determination of deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid and phosphoprotein in animal tissues. *J. Biol. Chem.* **161**, 83~89.
 39. Scott, T.A., and E.H. Melvin. 1953. *Anal. Chem.* **25**, 1656. In *Methods in carbohydrate chemistry*, Vol. 1. (Whitler, R.L. et al. ed.) 1962. Academic Press Inc.
 40. Seto, N.S. Sakayanagi, and H. Iizuka. 1975. C₁-Compounds utilizers isolated from the oil and natural gas fields in Japan. In *Microbial Growth on C₁-Compounds*. 35~44. Tokyo, Japan.
 41. Sham, H., R.B. Cox, and J.R. Quayle. 1976. Metabolism of Methanol by *Rhodopseudomonas acidophila*. *J. of Gen. Microbiol.* **94**, 313~322.
 42. Söhngen, N.L. 1906. Über Bakterien, welche

- Methan als Kohlenstoffnahrung und Energiequelle gebrauchen. *Centr. Bakt. Parasitenk. Abs.* II. **15**, 513~517.
43. Stanier, R.Y., E.A. Adelberg, and J.L. Ingraham. 1976. In the Microbial World, 4th ed. Prentice-Hall Inc, New Jersey,
44. Stieglitz, B., and R.I. Mateles. 1973. Methanol Metabolism in *Pseudomonas* C. *J. Bacteriol.* **114**, 390~398.
45. Stirling, D.I., and H. Dalton, 1978. Purification and Properties of an NAD(P)⁺-linked Formaldehyde Dehydrogenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath). *J. Gen. Microbiol.* **107**, 19~29.
46. Strom, T., T. Ferenci, and J.R. Quayle. 1974. The carbon assimilation pathways of *Methylococcus capsulatus*, *Pseudomonas methania* and *Methylosinus trichosporium* during growth on methane. *Biochem. J.* **144**, 465~476.
47. Tani, Y., T. Miya, and K. Ogata. 1972. The Microbial Metabolism of Methanol. Part II. Properties of crystalline alcohol oxidase from *Kloeckera* sp. No. 2201. *Agr. Biol. Chem.* **36**, 76~83.
48. Taylor, I.J., and C. Anthony. 1976a. A biological basis for obligate methylotroph: Properties of a mutant of *Pseudomonas* AM1 lacking 2-oxoglutarate dehydrogenase. *J. Gen. Microbiol.* **93**, 259~265.
49. Taylor, I.J., and C. Anthony. 1976b. Acetyl CoA production and utilization during growth of the facultative methylotroph *Pseudomonas* AM1 on ethanol, malonate and 3-hydroxybutyrate. *J. of Gen. Microbiol.* **95**, 134~143.
50. Troll, W., and R.K. Cannon. 1953. A modified photometric ninhydrin method for the analysis of amino acid and imino acids. *J. Biol. Chem.* **200**, 803~811.
51. Trotsenko, Y.A. 1975. Alternative pathway of methanol metabolism in prokaryotes and eukaryotes. In Microbial Growth on C₁-Compounds. 179~182. Tokyo, Japan.
52. Whittenbury, R., K.C. Phillips, and J.F. Wilkinson. 1970. Enrichment. Isolation and Some properties of Methane-utilizing Bacteria. *J. of Gen. Microbiol.* **61**, 205~218.
53. Whittenbury, R., H. Dalton., M. Eccleston, and H.L. Reed. 1975. The different types of methane oxidizing bacteria and some of their more unusual properties. In Microbial Growth on C₁-Compounds. 1~9. Tokyo, Japan.
54. Zakharova, E.V., Yu. V. Rodionov, and R.N. Ivanovskii. 1980. Resistance of respiration of methylotrophic bacteria to formate and cyanide. *Mikrobiologiya.* **49**, 215~220.