

Chlorella ellipsoidea 엽록체의 인지질 생합성 및 지방산 조성에 미치는 탄소원의 효과

郭 孝 善 · 李 鍾 三
(성신여자대학교 자연과학대학 생물학과)

Effect of Carbon Sources on the Synthesis of Phospholipid and Fatty Acid Composition in Chloroplast of *Chlorella ellipsoidea*

Kark, Hyo Shun and Chong Sam Lee

(Department of Biology, Sungsin Women's University, Seoul)

ABSTRACT

Chlorella cells were cultured with M_4N media treated with glucose (5 mM) sucrose (10 mM) and raffinose (30 mM). Phospholipids and their fatty acid compositions were analyzed in the chloroplast isolated from cultured *Chlorella* cells. Growth rate was prominently raised in the treatment with raffinose. Glucose was the most excellent carbon source in the biosynthesis of total lipid, phosphatidylcholine(PC), phosphatidylethanolamine(PE), phosphatidylinositol(PI) of the chloroplast. Also, the major fatty acids were palmitic, linoleic and linolenic acid during the biosynthesis of phospholipid in the control and in the treatment with carbon sources.

서 론

색소체는 지방산 합성같은 동화작용의 필연적인 subcellular site로 지적된 이래 광범위하게 연구되어져 왔다. 엽록체는 광합성 반응과 여러 가지 저분자 및 고분자 유기화합물을 자율적으로 합성하는 부위로 지적되었으며 (Givan and Harwood, 1976), 또한 고등식물의 엽록체에서 지방산의 합성능력은 Mudd와 McManus(1962)에 의해서 확인되었다.

인지질과 그를 구성하는 지방산의 조성과 함량은 여러 가지 환경조건 즉 pH, 온도, 산화, 배지조성 등에 의하여 영향을 받는다 (Knivett and Cullen, 1965).

인지질과 그를 구성하는 지방산의 조성과 함량은 여러 가지 환경, 또는 그것에 의하여 유도되는 변화에 관하여 많은

연구가 되어 왔지만, *Chlorella ellipsoidea*의 엽록체에서 탄소원에 따른 인지질의 종류 및 양적 동태와 그에 따른 지방산의 조성변화에 관한 연구는 현재까지 보고된 바 없었다. 본 연구에서는 *Chlorella ellipsoidea*의 엽록체에서 자율적으로 합성되는 인지질과 지방산의 함량과 조성변화에 탄소원이 어떠한 영향을 미치는가에 대하여 추적하고자 한다.

재료 및 방법

Chlorella 세포의 배양. *Chlorella* 세포의 생장을 촉진하는 glucose, sucrose와 raffinose의 농도를 결정하기 위하여 여러 가지 농도실험을 하였다. Glucose(1, 5, 10, 20 mM), sucrose(5, 10, 30, 50 mM)와 raffinose(10, 15,

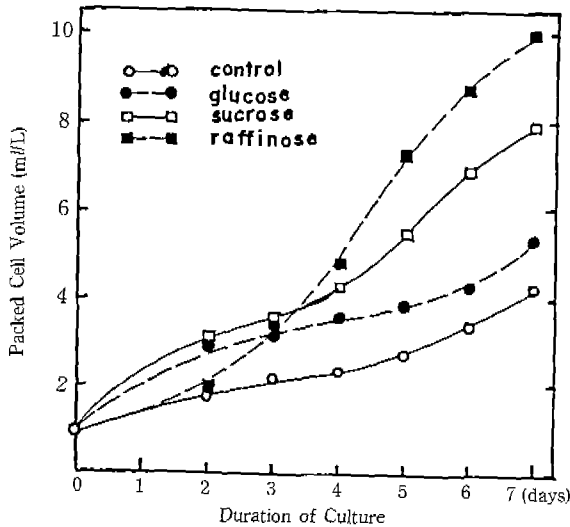


Fig. 1. Effects of various carbon sources on the growth of *Chlorella* cells during cultivation.

30, 50 mM)를 각각 처리한 M_4N 배지 (Tamiya *et al.*, 1953)에 일정량의 세포를 접종한 후 32 Klux의 광선을 조사하고 CO_2 enriched air로 bubbling 시키면서 일주일간 배양하였다. 그 결과 bleaching 현상이 일어나지 않으면서 최고의 생장률을 나타내는 농도—glucose (5 mM), sucrose (10 mM), raffinose (30 mM)—를 택하여 실험에 이용하였다. 생육시기에 따른 생장은 packed cell volume으로 측정하였다.

엽록체의 추출. 배양초와 중간기에 수확한 일정량의 세포를 Lyttleton (1962)의 방법을 변형하여 이용하였다 (Lee and Lee, 1989).

Total lipid의 추출. Bligh와 Dyer (1959)의 방법을 약간 변형하여 분리된 엽록체에 함유되어 있는 total lipid를 추출하였다 (Lee and Lee, 1989).

인지질의 분리와 동정. Thinlayer chromatography를 사용하여 추출한 total lipid에서 인지질을 분리하였다. 인지질의 분리는 Turner와 Rouser (1970)의 방법으로 하였다. 각각의 인지질을 분리, 동정하기 위하여 여러 가지 발색제를 사용하였다 (Skipski and Barllay, 1971). PC는 dragendorff reagent, PE는 ninhydrin solution, PI는 sodium periodate-schiff's reagent를 사용하였다.

Total fatty acid의 분리. 각각의 인지질에서 지방산을 분리하여 gas chromatography로 분석하기 위하여 Allen과 Good (1971)의 방법에 따라 methylation시켰다. Methylation 후 35°C incubator에서 뚜껑을 열어 건조증발시킨 후 각각의 함량을 측정하였다.

지방산의 함량과 조성. 인지질을 구성하는 각각의 지방산 조성과 함량변화는 gas chromatography (Perkim

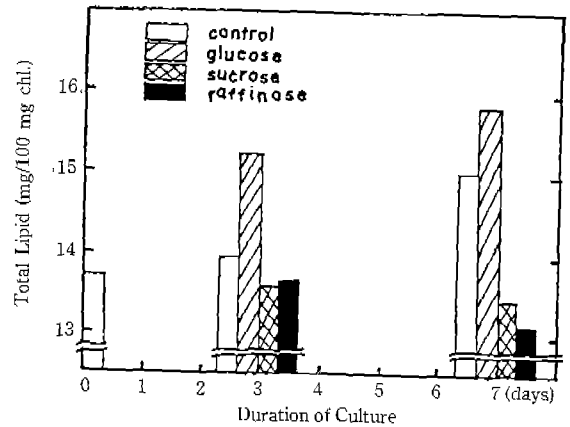


Fig. 2. Changes in amounts of total lipid in *Chlorella* chloroplast treated with various carbon sources during cultivation.

Elmer Sigma 3B chromatography)를 이용하여 분석하였다. Column은 길이 6 feet, 직경 3 mm인 stainless column을 사용하였고, packing material은 1-4 bulancdiol succinate로 하였다. Column temperature는 230°C로 조정하였고, detectoven temperature는 250°C로 각각 사용하였다. Carrier gas로는 N_2 gas를 분당 20 ml의 유속으로 넣어 주었고 H_2 flame ionization detector (20 PSI)로 분석하였다.

결 과

***Chlorella*의 생장.** 정상배지와 glucose (5 mM), sucrose (10 mM), raffinose (30 mM)를 각각 처리한 M_4N 배지에서 생육시킨 *Chlorella* 세포의 생장은 Fig. 1에 표시하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 대조구에 비하여 당류 처리시 생장이 촉진되었다. 배양중기에는 sucrose, raffinose, glucose 처리구 순서로 생장이 높았고, 배양말기에는 raffinose, sucrose, glucose 처리구 순서로 생장이 촉진되었다.

Total lipid의 양적 동태. 배양 3일과 7일에 수확한 *Chlorella*로부터 분리한 엽록체에서 total lipid를 추출하여 함량을 측정된 결과는 Table 1과 Fig. 2와 같다. Fig. 2에서 관찰된 바와 같이 glucose 처리구만이 대조구에 비하여 증가현상이 일어났고, sucrose와 raffinose 처리구에서는 오히려 total lipid의 함성이 저하되었다.

Total fatty acid methyl esters의 함량변화. *Chlorella* 엽록체에 함유된 total fatty acid methyl esters의 함량은 Table 1과 같다. 대조구는 PC의 함량이 가장 높은 반면 PI의 양이 적게 나타났다. Glucose 처리구는 다른 처리구에 비하여 인지질의 함성이 촉진되었는데, 특히

Table 3. Changes in the contents of fatty acid methyl esters of phosphatidylethanolamine in *Chlorella* chloroplast treated with various carbon sources during the culture

Fatty acid methyl ester	Duration of Culture (days)								
	0	3				7			
	Control	Glucose	Sucrose	Raffinose	Control	Glucose	Sucrose	Raffinose	(%)
Palmitic acid	50.00	66.12	27.88	40.30	43.97	37.97	48.94	39.08	37.42
Steric acid	1.19	—	2.02	—	3.18	1.27	4.37	1.72	1.34
Oleic acid	5.36	3.67	7.27	—	7.07	7.59	0.87	4.60	8.94
Linoleic acid	2.38	1.63	7.07	11.94	7.42	2.53	3.50	13.41	22.27
Linolenic acid	17.86	16.33	16.97	14.93	17.31	37.97	24.47	28.83	26.73
Unknown	23.21	12.25	38.79	32.83	20.50	12.67	17.85	12.36	3.33
Total fatty acid methyl esters	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

Table 4. Changes in the contents of fatty acid methyl esters of phosphatidylinositol in *Chlorella* chloroplast treated with various carbon sources during the culture

Fatty acid methyl ester	Duration of Culture (days)								
	0	3				7			
	Control	Glucose	Sucrose	Raffinose	Control	Glucose	Sucrose	Raffinose	(%)
Palmitic acid	94.01	93.72	3.77	42.55	69.42	93.82	68.31	48.72	39.71
Steric acid	0.12	—	20.10	2.36	—	—	3.60	1.71	0.98
Oleic acid	2.79	3.24	—	7.57	3.31	3.86	1.35	7.98	14.71
Linoleic acid	0.23	—	29.83	17.02	8.26	0.64	2.25	12.82	26.47
Linolenic acid	0.47	—	34.39	3.78	8.26	—	15.73	18.80	11.76
Unknown	2.38	3.04	11.91	26.72	10.75	1.68	8.76	9.97	6.37
Total fatty acid methyl esters	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

Glucose 처리시 total lipid 가 현저히 증가되었는데, 이와 같은 결과는 lipogenic enzyme 인 NADP-malate dehydrogenase 와 citrate cleavage enzyme 의 활성도가 glucose 에 의하여 촉진되었기 때문이라 사료된다(Zakim *et al.*, 1967). 또한 glucose 가 지방의 생합성에 효과적인 탄소원으로 관찰된 것은 glycolipid 의 합성에 많이 이용되어 total lipid 의 함량이 증가된 것으로 보이며, sucrose 와 raffinose 처리구에서는 합성이 억제되었는데 이 현상은 지방산의 β -oxidation 에 의하여 유도되는 total lipid 의 분해 현상이거나 또는 동식물 뿐 아니라 미생물에서 지방산 생합성의 key enzyme 인 acetyl CoA carboxylase 가 지방산 생합성에 참여하지 않고 succinate 를 생산해내는 glyoxylate cycle 로 이용되어 감소된 것으로 설명할 수 있다. 이상의 결과는 *E. coli* 에서 여러 가지 생장조건과 지질의 생합성 사이에는 연관성이 없지만, 인지질과 그를 구성하는 지방산의 조성과 함량에는 영향을 미친다는 Knivett 와 Cullen(1965)의 보고와 일치되는 부분이다.

식물(Moore, 1982; Getz *et al.*, 1970; Matsuzaki *et al.*,

1986; Bayer, 1983; Donaldson and Beevers, 1977) 뿐만 아니라 동물(Yoshiok *et al.*, 1985; Culp *et al.*, 1970; Broekhuysse, 1968)에서 PC, PE, PI 이 주요 인지질로 보고되어 왔는데, *Chlorella* 엽록체에서 glucose 만이 3 가지 인지질의 합성을 현저하게 촉진시켰고, sucrose 는 PE 와 PI 의 합성에 관여하였으며 raffinose 는 3 가지에 적은 양이 사용되었다(Table 1).

Zamkim 등(1967)의 보고에 의하면 glucose 와 fructose 가 첨가된 음식을 먹은 쥐에서 acetyl-CoA carboxylase 의 활성도가 증가된다고 하였는데, 이와 같은 결과는 본 실험에서 glucose 처리구의 인지질 함량이 증가된 것과 연관성이 있다. 한편 sucrose 와 raffinose 는 지방의 생합성과 마찬가지로 인지질 합성에서도 낮은 이용률이 나타났다.

Chlorella 엽록체에서 인지질을 구성하는 주요 지방산은 정상배지에서 생육시켰을 경우 palmitic 과 linolenic acid 가 인지질의 주요 구성요소였고, glucose 처리구는 palmitic, stearic, linoleic, linolenic acid 가 주요 지방산이

었다. 특히 stearic acid가 많이 이용된 것이 특이하다. Walker와 Harwood(1985)에 의하면 양상치와 콩의 엽록체에서 stearic acid가 높은 함량이 발견되었다고 보고한 바 있었다. Sucrose 처리구는 palmitic, linoleic, linolenic acid의 함량이 높게 관찰되었고, raffinose 처리구에서는 palmitic, oleic, linoleic, linolenic acid 같은 여러 가지 지방산이 인지질 생합성에 이용되었다. 특히 본 실험에서 palmitic acid가 높은 양적 동태를 나타냈는데, 이는 Koiwai와 Kasaki(1978)의 보고와도 일치되며, Harwood와 Stumpf(1970)는 식물조직에서 PI의 지방산 중 palmitic acid의 뚜렷한 이용을 보고하였는데 본 실험에서도 PI의 지방산 함량이 93% 이상으로 나타난 것으로 보아 같은 결과가 관찰되었다.

이상으로 여러 가지 당류를 처리한 *Chlorella ellipsoidea*의 엽록체에서 인지질과 그를 구성하는 지방산의 조성과 함량변화에 대한 실험에서는 세포의 생장에 가장 유용한 탄소원은 sucrose와 raffinose로 판명되었는데, 지방의 생합성에서는 생장과는 달리 glucose가 효과적으로 이용되었고, 인지질 함량의 분석결과에서도 glucose가 합성을 촉진하는 탄소원으로 관찰되어졌다. 또한 *Chlorella*의 엽록체에서 지방산의 조성과 함량변화는 다양하게 나타났는데, 특히 palmitic, linoleic, linolenic acid가 인지질 생합성에 효과적인 지방산으로 관찰되었다.

적 요

Glucose (5mM), sucrose (10mM)와 raffinose (30mM)를 각각 처리한 M4N 배지에서 *Chlorella* 세포를 배양하였다. 배양된 *Chlorella* 세포에서 엽록체를 분리하여 인지질 및 그의 지방산 조성을 분석하였다. 배양결과, raffinose 처리구가 가장 높은 세포생장률을 보였으며, 엽록체의 total lipid, PC, PE와 PI 함량비교에서는 glucose가 인지질 생합성에 가장 좋은 탄소원이었다. 또한, 대조구와 처리구에서 palmitic, linoleic과 linolenic acid가 인지질 생합성 동안 이용된 주요 지방산이었다.

참 고 문 헌

Allen, C.F. and P. Good. 1971. Acyl lipids in photosynthetic systems. *Method Enzymol.* 23: 523-547.
 Bayer, M.M. 1983. Phospholipid and lipid acyl hydrolase (phospholipase) in leaf galls (Hymenoptera: cynipidae of blak oak. (*Quercus Rober L*)). *Plant Physiol.* 73: 179-181.
 Bligh, E.G. and W.J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917.
 Broekuyse, R.M. 1968. Phospholipids in tissue of the eye. Isolation, characterization and quantitative analysis by two-dimensional thin-layer chromatography of diacyl

and vinyl-ether psopholipids. *Biochim. Biophys. Acta* 152: 307-315.
 Culp, T., W. Tucker, C.R. Ratiliff and F.F. Hall. 1970. Chromatographic analysis of ocular lipids. *Biochim. Biophys. Acta* 218: 259-268.
 Danaldson, R.D. and H. Beevers. 1977. Lipid composition of organelles from germinating castor bean endosperm. *Plant Physiol.* 59: 259-263.
 Getz, G.S., S. Jakovicic, J. Heywood, J. Frank and M. Rabinowitz. 1970. A two-dimensional thin-layer chromatographic system for phospholipid seperation. The analysis of yeast phospholipid. *Biochim. Biophys. Acta* 218: 441-452.
 Givan, C.V. and P.K. Stumpf. 1971. Fat metabolism in higher plants. XIV. Some factors regulating fatty acid synthesis by isolated spinach chloroplast. *Plant Physiol.* 47: 510-515.
 Harwood, J.L. and A.T. James. 1975. Metabolism of trans-3-hexadecanoic acid in broad bean. *Eur. J. Biochem.* 50: 35-334.
 Knivett, V.A. and J. Cullen. 1965. Some factors affecting cyclopropane acid formation in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 96: 771-776.
 Koiwai, A. and T. Kasaki. 1978. Changes in glycolipid and phospholipids of tobacco leaves during flue-curing. *Agric. Biol. Chem.* 43(3): 597-602.
 Koiwai, A., T. Matsuzaki, F. Suzuki and N. Kawashima. 1981. Changes in total and polar lipids and their fatty acid composition in tobacco leaves during growth and senescence. *Plant Cell Physiol.* 22(6): 1059-1065.
 Lee, C.S., S.H. Cho, K.S. Lee, H.K. Shin and Y.K. Choi. 1981. Effect of the carbon source on the synthesis of phosphate compounds and respiratory activity of yeast (*Saccharomyces uvarum*) during growth phase. *Microbiol.* 19(2): 63-77.
 Lee, C.S. and J.K. Lee. 1988. Effect of the nitrate and phosphate starvation on the biosynthesis of phospholipid and the composition of fatty acid in *Chlorella* chloroplast. *Kor. J. Bot.* 31(3): 187-196.
 Lyttleton, J.W. 1962. Isolation of ribosome from spinach chloroplast. *Exp. Cell Res.* 26: 312-317.
 Matsuzaki, T., A. Koiwai and N. Kawashima. 1986. Total fatty acid and polar lipid content in developing flower of *Nicotiana tabacum*. *Plant Cell Physiol.* 24(2): 199-206.
 Moor, T.S., Jr. 1982. Phospholipid biosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 33: 235-296.
 Mudd, J.B. and T.T. McManus. 1962. Metabolism of acetate by cell free preparations from spinach leaves. *J. Biol. Chem.* 237: 2057-2063.
 Ohashi, K., M. Tsuboi and M. Mayashibe. 1979. Sexual process in eight-spored ascus-forming yeast *Schizosaccharomyces japonicus* II. Dependency of the sexual process on the carbon source. *Plant Cell Physiol.* 20(1):

- 157-164.
- Skipski, V. and E.M. Barllay. 1971. Thin-layer chromatography of lipid. *Method Enzymol.* **24**: 523-547.
- Stephen, C.C., M. Soma, R. Mcadoo and D.F. Horrobin. 1985. Magnesium deficiency in the rat increase tissue levels of docosahexanoic acid. *J. Nutrition.* **33**: 1498-1503.
- Tamiya, H., K. Shibata, T. Iwamura, T. Sasa and Y. Morimura. 1953. Effect of diurnally intermittent illumination on the growth and some cellular characteristics of *Chlorella*. *Carnegie Inst. Wash Publ.* **600**: 76-81.
- Turner, J.D. and G. Rouser. 1970. Precise quantitative determination of human blood lipids by thin-layer and triethylaminoethylcellulose column chromatography. *Anal. Biochem.* **38**: 423-436.
- Walker, K.A. and J.L. Harwood. 1985. Localization of chloroplast fatty acid synthesis de novo in the stroma. *Biochem. J.*, **226**: 551-556.
- Yoshioka, S., S. Nakashima, Y. Okano, Hasegawa and A. Ichiyama. 1985. Phospholipid (diacyl, alkylacyl, alkenylacyl) and fatty acid chain composition in murine mastocytoma cells. *J. Lipid Res.* **26**: 1134-1441.
- Zakim, D., R.S. Pardini, R.H. Herman and H.E. Sauberlich. 1967. Mechanism for the differential effects of high carbohydrate diets on lipogenesis in rat liver. *Biochem. Biophys. Acta* **114**: 242-251.

(1990. 2. 23 接受)