

인산결핍 성장조건에서 Cyanobacteria가 생성하는 Poly- β -hydroxybutyrate의 적외선 분광법에 의한 구조분석

곽인영, 문영길*, 이기성*
배재대학교 자연과학대학 유전공학과, 생물학과*

FT-IR Spectrometric Analysis of Poly- β -Hydroxybutyrate in Cyanobacteria under Phosphate Stress

In-Young Kwak, Young-Kil Moon*, Ki-Sung Lee*
Dept. of Genetic Engineering and Dept. of Biology* Pai-Chai University

Cyanobacteria *Chlorogloea fritschii*를 여러 성장조건(인산 충분 혹은 결핍)에서 배양한 후 poly- β -hydroxybutyrate(PHB)를 추출하여 그의 구조를 적외선 분광법에 의해 분석하였다. 이들은 공통적으로 C=O의 신축 진동에 의한 1700-1800 cm^{-1} 영역에서 대단히 강한 흡수 피이크를 나타내고 또한 2900 cm^{-1} 에서 C-H의 비대칭 및 대칭 신축 진동흡수 피이크를 나타냄으로써 PHB의 특징을 잘 나타내고 있었다. 그러나 성장조건에 따라 C-H의 신축 진동흡수 피이크 세기에 변화를 관측할 수 있었으며 인산 결핍 성장조건에서 C-H의 신축 진동흡수 피이크의 세기는 나머지 피이크에 비해 증가된 양상을 나타냄으로 인산의 공급여하에 따른 PHB구조의 변화를 시사하였다.

The structure of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) in *Chlorogloea fritschii* was analyzed by FT-IR spectrometry under various conditions (phosphate starved or sufficient condition). They exhibited characteristic absorption peaks for PHB, such as C=O stretching band at 1700-1800 cm^{-1} and C-H stretching bands at about 2900 cm^{-1} , however, the intensity of C-H stretching peaks, relative to the rest of the spectrum was increased under phosphate starved condition, which suggests that *C. fritschii* might produce another modified PHB polymer under phosphate starved condition.

Keywords: Poly- β -hydroxybutyrate, Cyanobacteria, Phosphate stress, FT-IR spectrometry

I. 서 론

생물체는 생명유지와 성장을 위해서는 주위 환경

으로부터 여러 가지의 영양원을 필요로 하게 된다. 이러한 영양원들의 분해와 축적작용은 생체내에서 균형을 이루면서 작용하며, 또한 생장에 불리한 조건 하에서도 생존을 유지할 수 있는 보호장치를 지니고 있다. 인산 화합물은 자연에 상대적으로 풍부함에도

불구하고 대부분 불용성염 상태로 공급되기 때문에 많은 생물체에서 성장 제한요인으로 작용한다. 따라서 phosphate response를 인산제한 하에서 성장시켰을 때 나타나는 조절기작(Wanner, 1987, 1990)으로 볼 때, 이러한 인산제한을 극복하기 위해서 많은 세균은 인 화합물을 효율적으로 자화시킬 수 있는 복잡한 조절계를 지니면서 진화되었다고 볼 수 있다(Lee *et al.*, 1992). 탄소, 질소 그리고 energy balance의 조절양상과 마찬가지로 phosphate(Pi : 인산) balance의 유지는 고에너지 인산결합의 중요성 때문에 매우 중요하다. 뿐 만 아니라 필수 영양원의 제한하에서 작용하는 대표적인 작용기작 중의 하나가 세포내 함유물의 축적과 분해과정이다.

단세포 생물체에 존재하는 세포내 함유물중 지질계통으로 poly- β -hydroxybutyrate(PHB)를 들 수 있다. PHB는 D-3-hydroxybutyrate가 에스테르 결합으로 연결된 homopolymer이며 세포내 기능은 원핵세포내 에너지 및 탄소원의 저장물질로 존재하며 영양이 열악한 환경하에서는 탄소원 및 에너지원으로 이용된다(Ostle and Holt, 1982). 많은 미생물 세포에서는 중성지방 형태로 저장을 못하는 대신 PHB형태로 저장되어지며 일반적으로 토양미생물에서 많이 발견된다. PHB는 고도로 환원되어진 상태이고 불용성임과 아울러 삼투압을 나타내지 않기 때문에 가장 이상적인 세포내 저장물질로 간주할 수 있다(Nickerson, 1982). PHB에 대한 종래의 연구는 주로 세균의 포자 또는 괴상형성과정에서의 PHB역활에 초점을 맞추었으나(Kominek and Halvorson, 1965; Stevenson and Socolofsky, 1966), 최근에 이르러서는 plastic 대용품으로 PHB가 유용가능성이 밝혀졌으며(Hardman, 1981), PHB는 합성 polymer수지에 비하여 유기용매에 민감하며, UV에 강하며 또한 생물학적 분해가 가능한 장점을 가지고 있기 때문에(Creuger and Coueger, 1984) 이 방면의 연구에 많은 관심을 나타내고 있다.

Cyanobacteria는 광합성과 질소고정능을 함께 수행하므로서 다양한 세포함유물을 갖고며 열악한 환경조건하에서 생존하는 능력이 크다. 따라서 에너지 저장계를 연구하기 위해 cyanobacteria를 재료로한 연구가 활발하며, 특히 PHB system을 중심으로 인산의 결핍 혹은 충분조건하에서의 생리생화학적 조사가 이루어졌다(Lee *et al.*, 1991).

본 연구에서는 FT-IR spectrometry를 이용하여 cyanobacteria *C. fritschii*가 생산하는 PHB의

구조를 조사하였고, 인산 결핍의 생산조건에서 spectrum의 미세한 변화를 관측하였다.

II. 재료 및 방법

1. 균 주

PHB를 함유하고 있다고 보고된 *Chlorogloea fritschii*(Carr, 1966; Jensen and Sicko, 1971)의 균주 CCAP(Culture Collection of Algae and Protozoa) 1411/1A를 사용하였다.

2. 배양조건과 배지조성

PHB를 함유한 다른 균주간에 PHB의 구조적 차이점을 분석하기 위해서 *Chlorogloea fritschii*를 Allen's blue green algal medium(NaNO_3 1.5 g, K_2HPO_4 0.039 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.075 g, Na_2CO_3 0.02 g, CaCl_2 0.027 g, $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 0.058 g, EDTA 0.001 g, citric acid 0.006 g, Fe Citrate 0.006 g, microelement 1 ml, D.W 1 liter)에서 23°C, 500 ft. C, 조건에서 12시간 light/dark의 광주기로 7일간 생육시킨 세포를 start 구간으로 놓고 변형된 Pi free-Allen's medium에 6일간 빛을 차단하면서 배양한 세포를 starvation 구간으로 설정하였다. 이후 Pi가 첨가된 정상 Allen's medium에 옮겨서 정상 광주기로 3일, 6일간 배양하여 $\text{P}^{3\text{D}}$, $\text{P}^{6\text{D}}$ 의 시료를 얻었다. 한편 starvation후 Pi-free Allen's medium에서 정상 광주기로 3일, 6일간 배양하여 $\text{P}^{3\text{D}}$, $\text{P}^{6\text{D}}$ 의 시료를 얻었다(Lee *et al.*, 1991).

3. FT-IR을 이용한 PHB의 구조분석

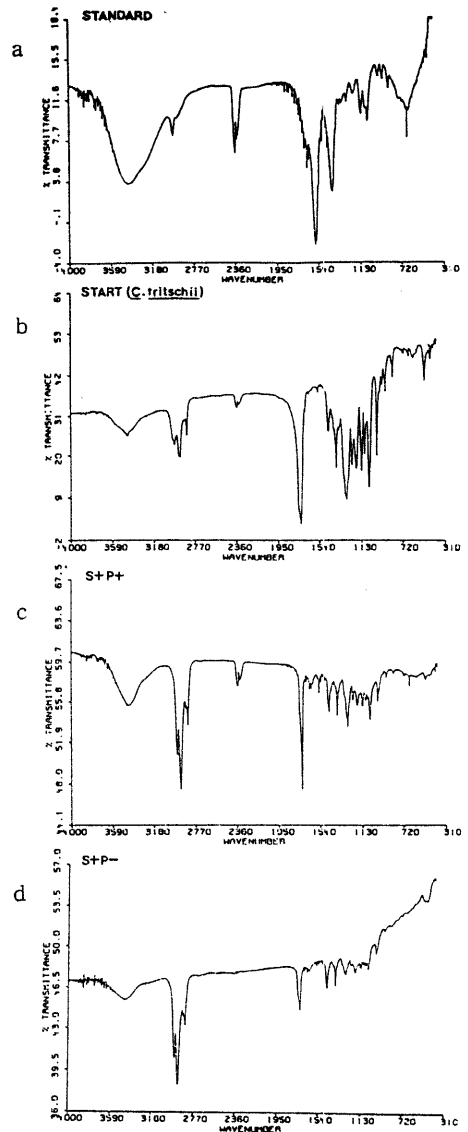
각 배양 중간기에 적당량의 세포를 수확하여 ethanol과 chloroform으로 세척된 cap centrifuge tube에 수확한 세포와 sodium hypochlorite solution을 넣어 잘 섞은 후에 37°C에서 1시간 정도 방치한 후에 원심분리하였다. 수확된 침전물을 증류수, acetone, ethanol 순으로 세척한 후에 원심분리하였다. 이후 침전물을 다시 2-3배 정도의 chloroform을 넣고 잘 흔들어서 30분 정도 방치한 다음, 원심분리하여 상등액을 fresh vial에 옮긴 후 nitrogen gas로 건조시켰다(Lee *et al.*, 1991). 준비된 적당량의 PHB 시료에 적량의 KBr을 섞어 곱게 마쇄하여 IR용 시료를 만든 후 FT-IR (Nicolet FT-IR)로 scanning하였다.

III. 결과 및 고찰

분자가 진동을 일으키기 위해서는 분자간의 결합의 종류 및 세기, 그리고 원자의 종류에 따라 각각 고유한 진동 주파수에 해당하는 빛 에너지를 흡수하므로써 분자는 진동을 일으키는데, 이러한 진동 spectrum에 의해서 여러가지 고분자물질의 확인은 물론 분자 구조까지도 추정할 수 있다 (Bower and Maddams, 1992).

표준물질로 PHB의 monomer인 D-β-hydroxybutyrate를 사용하여 비교하였다. Fig. 1은 성장 조건(인산충분, 인산결핍)별로 추출한 PHB 분자의 IR spectrum을 나타낸 것이다. wavenumber 1,500-900 cm⁻¹ 영역에서는 신축 진동 및 굽힘 진동에 의하여 alkyl기 등의 피이크가 겹쳐서 나타났기 때문에 다른 영역보다 대단히 복잡한 finger print상태의 spectrum을 보였다. 성장조건별 spectrum에서는 공통적으로 wavenumber 1,720 cm⁻¹ 근처에서는 카르보닐기(C=O)의 신축 진동에 의한 강한 흡수 피이크가 나타났으며, 3,400 cm⁻¹ 에서는 C-H기의 강한 흡수 피이크가 나타났다. 또한 C-H의 비대칭 및 대칭 신축진동 흡수피이크가 2800-2900 cm⁻¹에서 공통적으로 나타났다. 이로써 배양조건에 관계없이 PHB를 구성하는 작용기(functional group)는 거의 동일하다고 볼 수 있다. 그러나 PHB의 monomer 안에 존재하는 대표적인 작용기의 카르보닐기(C=O)와 C-H의 흡수피이크의 세기는 성장조건에 따라 크게 변하는 것을 볼 수가 있었다. 인산 결핍생산 조건에서 C-H의 신축진동 흡수피이크의 세기는 나머지 피이크에 비해 증가된 양상을 볼 수가 있었다. 이 현상은 다른 균주에서는 관측되지 않는 특이한 변화였다. 이 결과는 중속 영양세균과 광합성 세균에서 인산결핍에 따른 적응방법과 PHB생성과정이 다를 것을 예견해 준다.

즉, 광합성세균인 경우에는 인산 결핍 생산조건하에 PHB분자내 구조 중 C-H 신축진동흡수 피이크 세기에 영향을 줄 수 있는 부분이 증가되었음을 시사한다. 또 이러한 연구결과는 PHB중합체분자의 생체내 분해, 합성, 또는 변형에 관련된 효소계가 인산 stress하에서 그 활성이 직접, 간접적으로 조절되고 있음을 예측하게 한다. Cyanobacteria에서 인산결핍 성장조건에 따른 PHB구조의 변화에 대한 이와같은 연구결과는 요즘 plastic 대용물질로 각광받는 PHB 분자의 변형과정에도 응용할 수 있기 때문에 더욱 의미가 있다고 하겠다.



- a. D-3-hydroxybutyrate (standard, monomer of PHB)
- b. PHB from *Chlorogloea fritschii* precultured
- c. PHB from *Chlorogloea fritschii* cultivated under Pi sufficient condition
- d. Modified PHB from *Chlorogloea fritschii* cultivated under Pi starved condition

Fig. 1. FT-IR Spectrometry scanning profile.

IV. 감사의 말씀

본 연구는 1995년도 교내 학술연구비 지원에 의해 수행된 것임.

V. 참고문헌

1. Anderson, A.J., and Dawes E.A. 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.* 54: 450-472.
2. Barham, P.J., Barker P., and Organ, S.J. 1992. Physical properties of poly(hydroxybutyrate) and copolymers of hydroxybutyrate and hydroxyvalerate. *FEMS Microbiol. Rev.* 103: 289-298.
3. Bower, D. I., and Maddams, W.F. 1992. The vibrational spectroscopy of polymers. Cambridge University. pp. 162-226.
4. Carr, N.G. 1966. The occurrence of poly- β -hydroxybutyrate in the blue-green alga *Chlorogloea fritschii*. *Biochem. Biophys. Acta* 120: 308-310.
5. Creuger, W., and Coueger, A. 1984. Biotechnology. A Textbook of Industrial Microbiology, Science Tech. Sinauer. pp. 296-297.
6. Dawes, A.E. 1986. Microbial Energetics, Blackie Chapman and Hall, N.Y. pp. 158-164.
7. Hardman, R. 1981. Eastbourne site of U. K. *Biotech. Crisis. Genet. Eng. News.* 1(3): 1-13.
8. Holmes, P.A. 1985. Applications of PHB: A microbially produced biodegradable thermoplastics, *Phys. Technol.* 16: 32-36.
9. Jensen, T.E., and Sicko, L.M. 1971. Fine structure of poly- β -hydroxybutyric acid granules in a blue-green alga, *Chlorogloea fritschii*. *J. Bacteriol.* 106: 683-686.
10. Kominek, L.A., and Halvorson. H.O. 1965. Metabolism of poly- β -hydroxybutyrate and acetoin *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.* 90: 1251-1259.
11. Lee, K.S., Yoo, S.A., and Park, Y.S. 1991. A physio-biochemical study on the synthesis and degradation of poly- β -hydroxybutyrate and polyphosphate in a blue-green alga *Chlorogloea fritschii*. *Kor. J. Phycol.* 6: 203-212.
12. Lee, K.S., Metcalf, W.W., and Wanner, B.L. 1992. Evidence for two phosphonate degradative pathways in *Enterobacter aerogenes*. *J. Bacteriol.* 174: 2501-2510.
13. Nikerson, K.W. 1982. Purification of poly- β -hydroxybutyrate by density gradient centrifugation in sodium bromide. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 1208-1209.
14. Ostle, A.G., and Holt, J.G. 1982. Nile blue A as a fluorescent stain for poly- β -hydroxybutyrate. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 238-241.
15. Stevenson, L.H., and Socolofsky. M.D. 1966. Cyst formation and poly- β -hydroxybutyric acid accumulation in *Azotobacter*. *J. Bacteriol.* 91: 304-310.
16. Wanner, B.L. 1987. Phosphate regulation of gene expression in *Escherichia coli*. In: Neidhardt, F.C., Ingraham, J., Low, K.B., Magasanik, B., Schaechter, M., and Umberger, H.E.(eds.): *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* cellular and molecular biology. Vol. 2. Am. Soc. Microbiol., Washington D.C. pp. 1326-1333.
18. Wanner, B.L. 1990. Phosphorus assimilation and its control of gene expression in *Escherichia coli*, In: Hauska, G.H., and Thauer, R.(eds.): The molecular basis of bacterial mechanism. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany. pp. 152-163.
19. Yoo, S.A., and Lee, K.S. 1987. Phylogenetic study in physiological and biochemical aspects upon cellular inclusions of blue-green algae 1. The observation of blue-green alga storing poly- β -hydroxybutyrate. *Kor. J. Phycol.* 2: 185-191.
20. Yoo, S.A., Lee, K.S., and Park, Y.S. 1991. A cytochemical study on the energy-storing system including poly- β -hydroxybutyrate and polyphosphate in blue-green alga *Chlorogloea fritschii*. *Kor. J. Phycol.* 6: 193-202.