

Dunaliella tertiolecta cell-free system 에 의한 글리세롤의 生成

權 寧 命

(서울대·生藥研究所)

Production of glycerol from glucose by *Dunaliella tertiolecta* cell-free systems

Young Myung KWON

(Natural Products Research Institute, Seoul National University)

ABSTRACT

In the cell-free systems of *Dunaliella tertiolecta*, fructosediphosphate aldolase hardly contribute to synthesize hexosephosphate from triosephosphate derived from pentosephosphate pathway, and it could be considered that glycerol synthesized from added glucose was synthesized but via 3-phosphoglyceraldehyde as an intermediate not hydroxypyruvate.

緒 論

植物이 生活中 各種有機物質을 體外로 排出하고 있음을 잘 알려져 있는 事實이다. 藻類에서도 生長期間中 아미노酸, 有機酸, 糖, poly alcohol 等の 有機物質을 體外로 排出한다(Allen 1956, Fogg 1963).

Dunaliella tertiolecta 도 光合成產物로서 글리세롤을 生産蓄積하며, 이의 相當量을 體外로 排出한다 (Craigie & Mchachlan 1964, Hellebust 1965, Craigie et al., 1966).

그런데 光合成條件이 아닌 *D. tertiolecta* 의 cell-free system 에서 添加한 葡萄糖으로부터 글리세롤이 生成됨을 보았기에 그 結果를 報告한다.

材料 및 方法

材料인 *Dunaliella tertiolecta* Butcher 는 medium f (Guilard & Ryther, 1962)에서 培養하였으며, cell-free homogenate 의 製造 및 生成되는 ¹⁴CO₂의 放射能測定等도 前과 同一한 方法과 條件下에서 行하였다 (Kwon, 1969 a).

各 酵素는 基質에 依한 nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)의 還元 또는 酸化를 spectrophotometer 로 測定하여 各各의 活性을 確認하였다. 酵素標品으로 使用한 cell-free extracts 는 cell-free homogenate 를 遠心分離하여 그의 上澄液으로 하였다(Kwon, 1969 b). Triosephosphate isomerase(EC, 5, 3, 1)의 活性은 glyceraldehyde dehydrogenase 와 連關된 反應系에서 3-phosphoglyceraldehyde (3PGAL)를 基質로 하였을 때 NADH 의 酸化度로 測定하였으며 (Cassleton, 1966) glycerophosphate dehydrogenase (EC, 1, 1, 1, 8) 의 경우는 이미 cell-free extracts 에 triosephosphate isomerase 의 活性이 認定되었으므로 3 PGAL 를 使用했을 時의 NADH 의 酸化를 測定하였다. Glycerol kinase (EC, 2, 7, 1, 30) 는 過剩의 glyceraldehyde dehydrogenase 가 存在하는 條件에서 glycerol 과 ATP 를 基質로 하였을 때 測定되는 NAD 의 還元으로 酵素의 存在를 檢定하였다 (Bublitz & Wieland, 1962).

페이퍼크로마토그래피와 래디오오우토그라피로 生成되는 글리세롤을 檢出하였는데

그리기 爲하여 (μ moles) tris buffer (pH 7.6) 400, MgCl 10, ATP 10, KCN 4, Na-iodoacetate 0.4, 葡萄糖($[U-^{14}C]$) glucose 4 μ ci) 10, NAD 및 NADP 500 μ g 그리고 22 mg protein 에 該當되는 cell-free homogenate 가 存在하는 6 ml 의 反應系를 27°C에서 1時間 反應을 持續시킨後, perchloric acid 를 加하여 -15°C 에 1 夜放置하였다. 凍結된 試料을 4°C 에서 녹히고 遠次하여 그의 상층액을 모아 여기에 5 μ mole 의 글리세롤을 加하고 NaOH 로 中和하였다. 中和한 試料을 즉시 Dowex-1 (formate) 와 Dowex-50 column 을 通過시켜 中性成分만을 回收하여 減壓乾燥하였다. 500 μ l 의 EtOH 로 乾燥試料을 溶解하여 150 μ l 직을 Whatmann No. 1 濾紙에 spotting 하였다. 케이퍼크로마토그래피에 使用한 溶媒系는 ethylacetate : pyridine : H₂O (12:5:4)로서 4°C 에서 下降法으로 展開시켰다. Paperchromatogram 의 래티오우토그래피에는 KODAK x-ray film 을 使用하였고, film 上의 spots 의 同定은 標準物質의 Rf 値와 比較하고, 또한 試料物質과 標準物質의 co-chromatography 에 依하여 同一物質임을 確認하였다.

蛋白質定量은 cell-free homogenate 는 Newell & Dal Pont (1964) 의 方法으로, cell-free extracts 의 경우는 Lowsy *et al.* (1951)의 方法을 따랐다.

結果 및 論議

$[1-^{14}C]$ glucose 와 $[6-^{14}C]$ glucose로부터 生成되는 $^{14}CO_2$ 量을 比較할 때 (Table 1) 葡萄糖의 C-6는 결코 CO_2 로 될수없는 것 같다. NADP 가 $[6-^{14}C]$ glucose로부터의 $^{14}CO_2$ 生成을 3 倍程度 增加시키기는 하였지만 이것을 $[1-^{14}C]$ glucose 의 경우와 比較하면 지극히 낮은 값이다. Pentose phosphate pathway (PPP)를 거쳐서 生産된 triose가 aldolase 에 依하여 다시 六炭糖으로 될 경우 添加한 葡萄糖分子的 C-6中 一部分이 C-1 으로 轉位될 수 있으므로 glycolysis 逆過程의 活性化는 C-6로 하여금 CO_2 로 될 수 있다. 하지만

Table 1. Effects of NAD and NADP on the production of $^{14}CO_2$ from added $[U-^{14}C]$ glucose by cell-free homogenate.

Addition	μ moles of glucose carbon atoms to $^{14}CO_2$	
	$[1-^{14}C]$ glucose	$[6-^{14}C]$ glucose
None	87.35	0.41
NAD	124.56	0.41
NADP	457.43	1.33

Each Warburg vessel contained in 2.0 ml reaction mixture (μ moles); tris buffer (pH 7.5) 150, ATP 10, MgCl₂ 10, glucose (0.3 μ ci) 10, NAD or NADP 500 μ g, and cell-free homogenate equivalent to 7.0 mg protein. Gas phase, temperature 25°C, and incubation time, 1 hour.

(Sauerman, 1967, 1968) Table-1 에서는 이러한 現象을 볼 수 없다. $^{14}CO_2$ 生成에 미치는 NAD 의 効果가 $[6-^{14}C]$ glucose 에서 전혀 볼 수 없는 것은 NAD 가 基質分子內의 炭

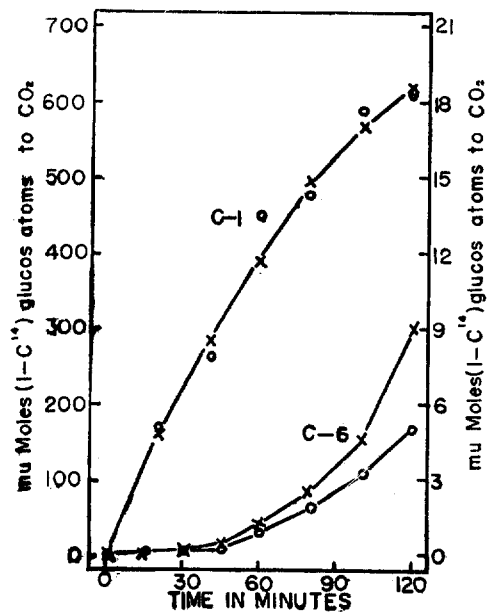


Fig. 1. Production of $^{14}CO_2$ from glucose in the presence of iodoacetate and cyanide.

Each Warburg vessel contained in 2.0 ml (μ moles); tris buffer (pH 7.5) 150, MgCl₂ 10, ATP 10, iodoacetate 0.2, KCN 3, $[U-^{14}C]$ glucose (0.3 μ ci) 10, NADP 500 μ g, and 7.8 mg protein cell-free homogenate in the case of $[1-^{14}C]$ glucose and 9.7 mg in $[6-^{14}C]$ glucose. Other conditions, same as Table 1. $\circ \cdots \circ$ non added iodoacetate and cyanide. $\times \cdots \times$ added iodoacetate and cyanide.

素轉位에는 아무런 作用을 할 수 없기 때문이며, $[1-^{14}C]$ glucose 에서 $^{14}CO_2$ 生成을 促進시키는것은 生成되는 triose 를 他物質로 變化시키는데 NAD가 有效하게 作用함으로써 PPP 에서 decarboxylation 이 增加되기 때문인 것이다.

C-6로부터의 $^{14}CO_2$ 生成이 iodoacetate 와 KCN 에 依하여 현저한 增加를 보았으나 (Fig. 1) 이것을 aldolase 에 依한 六炭糖의 合成結果로만 해석하기는 어렵다. 그 理由로서는 $[6-^{14}C]$ glucose 의 分子內 ^{14}C 의 分布가 C-6에만 局限된 것이 아니라 경우에 따라서는 相當量의 ^{14}C 이 C-2 와 C-3 에서도 檢出되는 경우가 있기 때문이다. (Bernstein & Wood, 1957) 이러한 化合物을 基質로 使用했을 경우 transaldolase 에 依해서 C-6가 C-1로 轉位될 수는 없지만 C-2가 C-1로 轉位되는 것은 可能한 것이므로 (Clark *et al.*, 1969) PPP 단으로도 $[6-^{14}C]$ glucose로부터 $^{14}CO_2$ 를 生産할 수 있는 것이다.

그러나 C-6로부터의 CO_2 生成을 glycolysis 의 逆過程에 起因한다고 하던가 또는 PPP 에 依한다고 하던간에 그 率은 대단히 낮기 때문에 Fig. 1에서 阻害劑가 C-1의 CO_2 轉換에 아무런 影響을 미치지 못하는 것 같이 作用하였다. 왜냐 하면 高濃度의 $[1-^{14}C]$ glucose-6-phosphate 때문에 fructose-6-p로부터 glucose-6-p의 生成이 한층더 阻害를 받기 때문일 것이다.

그러나 *Dunaliella* 가 光合成產物로서 糖을 生産하기 보다는 글리세롤로 蓄積하는 것으로 보아서 正常條件에서도 triose로부터의 六炭糖 合成率은 비교적 낮은 것이 아닌가 生覺된다.

한편 cell-free system 에서 生成되는 글리세롤은 페이퍼크로마토그래피와 레디오오토그래피에 依해서 證明되었으며 이것은 결코 triosephosphate 로부터 實驗造作中에 形成된 것으로 볼 수는 없는 것이다.

酵素實驗에서 triosephosphate isomerase 와 glycerophosphate dehydrogenase 의 活性은 쉽

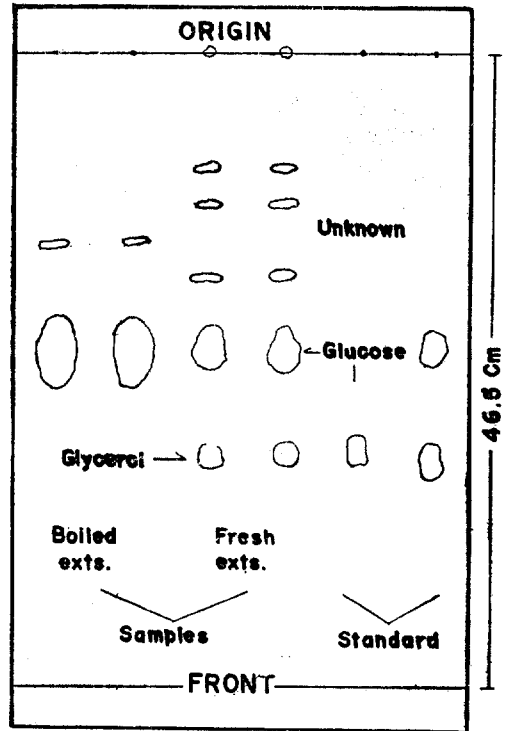


Fig. 2. Separation and identification of glycerol in cell-free system by paper chromatographic and radioautographic methods.

Spots on the paper or on the film were almost identical positions. The distance between each origin spots were not expressed as same ratio of the distance between origin and front.

게 測定되었으나 (Fig. 3) glycerol kinase (Fig. 4)의 活性은 매우 弱하게 測定되었다. 이같이 活性이 弱하게 나타난 理由는 正確하게 말할 수는 없으나, glycerophosphate dehydrogenase 와 共働된 反應系였기 때문에 pH가 높았으며, 또한 酵素가 完全한 soluble enzyme 인지를 모른다는 것도 考慮해야 할 것이다.

Cell-free homogenate 에 依한 脫磷酸化能을 보기 爲하여 α -glycerophosphate, glucose-6-p, fructose-6-p, fructose-1, 6-p₂ 를 基質로 하였을 때 生成되는 PO_4 를 定量하였던 바 (Chen, *et al.*, 1956) 基質間의 差를 볼 수 없었다. 한편 글리세롤은 glyceraldehyde 를 거치거나 또는 dihydroxyacetone phosphate 의 脫磷酸化 反應을 거쳐 合成될 수도 있겠으나 이에

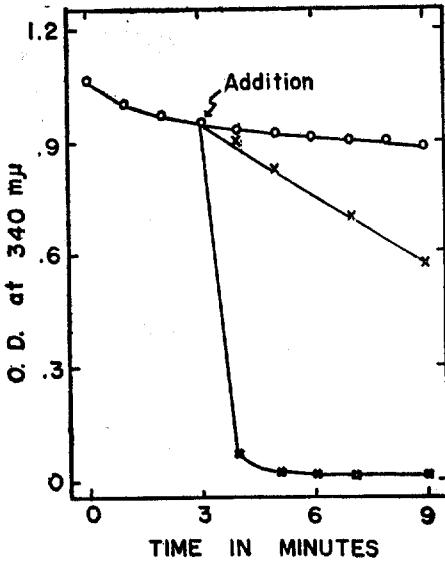


Fig. 3. Assay of triosephosphate isomerase and glycerophosphate dehydrogenase.

In 3.0 ml of reaction mixture contained (μ moles); tris buffer (pH 8.6) 200, $MgCl_2$ 10, 3PGAL 10, NADH 500 μ g, glycerophosphate dehydrogenase or triosephosphate isomerase 15 units, and cell-free extracts equivalent to 2.6 mg protein.

- ...○ none
- ×...× 3 PGAL and triosephosphate isomerase
- ...□ 3 PGAL and glycerophosphate dehydrogenase

關한調査는 하지 않았다. 그러나 本 實驗으로 글리세롤은 3PGAL로부터 α -glycerophosphate를 거쳐서 合成될수있음을 추측할 수 있으나 6-phosphogluconate dehydrase (Entner-Doudoroff, 1952)의 活性을 Kovachevich & Wood (1955)의 方法으로 測定할 수 없음을 미루어 보아 hydroxypyruvate로부터의 글리세롤의 合成은 生覺할 수 없는 것이다. 또한 光

摘 要

*D. tertiolecta*의 cell-free system에서 aldolase에 의한 六炭糖의 合成은 없거나 매우 낮은 것 같다. 葡萄糖으로부터 生成되는 글리세롤은 hydroxypyruvate를 거치는 것 보다는 3PGAL를 中間物質로 하고 있는 것 같다.

REFERENCES

1. Allen, M.B., 1956. Excretion of organic compounds by *Chlamydomonas*. *Arch. Mikrobiol.*, 24, 163-168.
 2. Bernstein, I.A., and H.G. Wood, 1957. Determ-

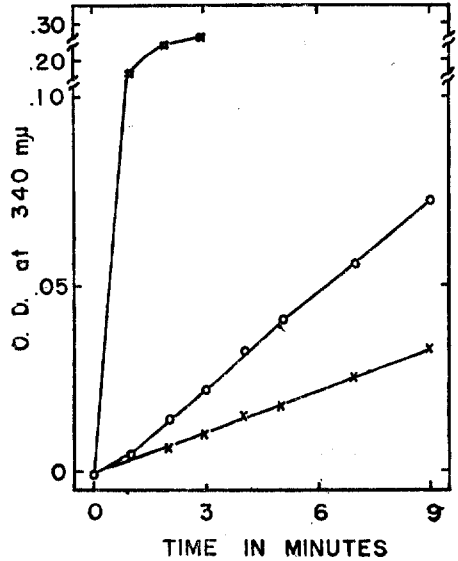


Fig. 4. Demonstration of glycerokinase

In 3.0 ml of final reaction mixture contained (moles); tris buffer (pH 8.6) 200, $MgCl_2$ 20, hydrazine (pH 8.8) 100, ATP 10, glycerol 20 or glycerophosphate 10, NAD 500 μ g, and 1 mg protein cell-free extracts.

- ×...× none
- ...○ glycerol and glycerophosphate dehydrogenase 15 units.
- ...□ glycerophosphate

合成下에서 合成되는 글리세롤도 本 實驗에서와 같이 3 PGAL로부터 還元過程을 거쳐서 이루어진다고 볼 수 있겠다.

結論으로 本 實驗條件에서는 glycolysis의 逆過程의 活性은 없거나 또는 지극히 낮으며, 葡萄糖으로부터 生成되는 글리세롤은 3 PGAL를 中間物質로 하고 있다고 하겠다.

- ination of Isotopic carbon Patterns in Carbohydrate by Bacterial Fermentation. In: Methods in Enzymology. Vol. 4. p. 565—584 Ed. by S.P. Colowick & N.O. Kaplan Academic Press Inc. New York
3. Bublitz, C. & O. Wieland, 1962. Glycerokinase In: Methods in Enzymology. Vol. 5. p. 354—361. Ed. by Colowick S.P. & Kaplan, N.O. Academic Press Inc. New York
 4. Casselton, P.J., 1966. Enzymes of the Embden-Meyerhof and Pentose Phosphate Pathways in *Polyporus brumalis* Extracts. *J. exptl. Bot.* 17, 579—589.
 5. Chen, P.S., T.Y. Toriba, & H. Warner, 1959. Determination of Lipid Phosphate, *Anal. Chem.* 27, 1756.
 6. Clark, M.G., J.F. Williams, & K.G. Rienits, 1969. Synthesis of Hexose-6-phosphate from ribose-5-phosphate by an acetone powder preparation of Rat liver. *Proc. Aust. Biochem. Soc.* p. 45.
 7. Craigie, J.S. & J. McLachlan, 1964. Glycerol as a photosynthetic product in *Dunaliella Tertiolecta* Butcher. *Can. J. Bot.* 42, 777—778.
 8. Craigie, J.S., J. McLachlan, & W. Majak, 1966. Photosynthesis in Algae. II. Green algae with special reference to *Dunaliella* spp. and *Tetraselmis* spp. *Can. J. Bot.* 44, 1247—1254.
 9. Entner, N. & M. Doudorof, 1952. *J. Biol. Chem.* 853.
 10. Fogg, G.E., 1958. Extracellular products of phytoplankton and the estimation of primary production. Rappt. Proces-Verbaux Reunion, Conseil Perm. Intern. Exploration Mer, 144, 56—60.
 11. Guliard, R.R.L. & J.H. Ryther, 1962. Studies of Marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hudtedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.* 8, 229—239.
 12. Hellebust, J.A., 1965. Excretion of some organic compounds by marine phytoplankton. *Limnol. Oceanography* 10, 192—206.
 13. Kovachevich, R. & W.A. Wood, 1955. Carbohydrate metabolism by *Pseudomonas fluorescens*. III. Purification and properties of a 6-phosphogluconate dehydrase. *J. Biol. Chem.* 213, 845—756.
 14. Kwon, Y.M., 1969a. Glucose oxidation and its oxidative enzymes in *Dunaliella tertiolecta*. I. oxidation of ¹⁴C-glucose in whole cells and cell-free systems. *Korean J. Bot.* 12, 55—62.
 15. Kwon, Y.M., 1969b. Glucose oxidation and its oxidative enzymes in *Dunaliella tertiolecta* II. Evidence for glycolytic and pentose phosphate pathways in cell-free extracts. *Korean J. Bot.* 12, 63—70.

16. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr & R.J. Randall., 1951. Protein measurements with the Folin-phenol reagents. *J. Biol. Chem.*193. 265--275.
17. Newell, B.B. & Dal G. Pont, 1964. Ammonia in sea water. *Nature*, 201, 36.
18. Sauer mann, G. 1967. The iodoacetate-induced translocation of glucose carbon in ascites tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 136, 577--579.
19. Sauer mann, G., 1968. On the reversibility of the first segments of glycolysis in ascites tumor cells, *Biochim. Biophys. Acta.*158, 1--10.