

*Escherichia coli*와 *Bacillus subtilis*의
糖脂質 生合成과 脂肪酸 造成에 미치는 여러 가지
金屬化合物의 影響

李昭娟·李鍾三

誠信女子大學校 自然科學大學 生物學科

The Effect of Metal Compounds on Phospholipid
Biosynthesis and Fatty Acid Composition in
Escherichia coli and *Bacillus subtilis*

So Yeon Lee and Chong Sam Lee

Department of Biology, College of Natural Sciences,
Sungshin Women's University, Seoul, Korea

ABSTRACT

The biosynthesis of galactolipid and galactose and their composition of fatty acid in *E. coli* and *B. subtilis* treated with copper chloride (10 ppm), nickel chloride (50 ppm), manganese chloride (100 ppm) during the culture were analyzed.

The contents of MGDG, DGDG and total lipids in treatment with metal compounds were lower to compared with the control.

In *E. coli*, the major fatty acid utilized for biosyntheis of MGDG were palmitic acid (ave. 36.87%) and linolenic acid (ave. 14.79%) in control. In MGDG, the major fatty acids were utilized for palmitic acid (ave. 20.00%) and myristic acid (ave. 7.32%) in treatment with copper chloride, lauric acid (ave. 11.71%) and linolenic acid (ave. 11.06%) in manganese chloride treatment. And in nickel chloride treatment, it was palmitic acid (ave. 36.16%) and oleic acid (ave. 6.43%) were use in MGDG formation. In DGDG, in copper chloride treatment, it was lauric acid (ave. 19.41%) and oleic acid (ave. 9.95%) in biosynthesis of galactolipid. and in treatment with nickel chloride linolenic acid (ave. 15.39%) and linoleic acid (ave. 13.51%), in manganese chloride treatment palmitic acid (ave. 29.76%) and palmitoleic acid (ave. 11.35%) were used in DGDG formation. In *B. subtilis*, the major fatty acids utilized for biosynthesis of galactolipid was palmitic acid (ave. 30.86%) and linolenic acid (ave. 8.36%) in control. Otherwise, in MGDG, the major fatty acids were utilized for palmitic acid (ave. 28.92%) and stearic acid (ave. 13.25%) in treatment with copper chloride, and palmitic acid (ave. 15.73%) and lauric acid (ave. 11.88%) in manganese chloride treatment. It was confirmed that nickel chloride treatment was palmitic acid (ave. 35.16%) and palmitoleic acid (ave. 12.47%). The major fatty acids in DGDG were utilized for palmitic acid(ave. 34.19%) and linoleic acid (ave. 17.45%) in copper chloride treatment, and lauric acid (ave. 11.16%) and myrisitic acid (ave. 8.65%) in manganese chloride treatment.

In treatment with nickel chloride, it was palmitoleic acid (ave. 10.30%) and myristic acid (ave. 7.81%) were used galactolipid formation.

Keywords : *E.coli*, *B. subtilis*, galactolipid, fatty acid, galactose

I. 서 론

금속 화합물은 저농도에서도 거의 모든 생물의 대사작용에 저해 효과를 나타내는데 미생물의 포자 형성, 형태 및 생화학 반응 활성 등에 큰 영향을 미치며, 금속 이온이 단백질 분자들과 결합하여 복합체를 이루어 입체적인 구조 변화를 일으킴으로써 기능의 불활성화를 초래하거나 다른 금속을 치환하는 방법으로 저해 작용을 나타낸다.^{1,2,3)} 또한 금속 화합물들은 수용액 속에서 이온 형태로 존재하여 조류(algae)에 영향을 미쳐 수중 생태계의 환경오염 물체를 야기시킬 뿐 아니라 녹색 식물에서는 물과 함께 이들 금속 이온들이 흡수되어 광합성에 치명적인 영향을 준다. Manganese, copper, zinc, cobalt, nickel 등 2가 양이온들은 엽록체를 산성 조건하에서 나타나는 것과 동일하게 엽록체의 수축 현상을 야기한다.⁴⁾ Copper는 여러가지 효소의 활성도를 촉진시키는데 부족시 엽록소 합성억제에 의한 황백화 현상이 유발되기도 하지만 과량이 존재할 경우에도 정상적인 대사반응을 저해시킨다.⁵⁾ *Saccharomyces cerevisiae*에서 copper는 포도당의 혐기성 발효를 완전히 억제하고 nickel을 처리한 배지에 이들 균주를 배양시키면 발효율이 감소된다.⁶⁾

Manganese는 주로 곰팡이에서 발견되는 cellulase 활성을 억제시키며 copper보다 더 강한 저해 작용을 나타낸다.^{7,8)} 또한 manganese와 nickel은 *vicia faba* 뿌리의 유사분열에 이상을 일으켜 뿌리의 비정상적인 분열을 일으킨다.^{9,10)} Nickel이 위장에 미량 흡수되면 과민반응과 피부알러지를 일으키고 폐암을 유발하며, cobalt, cadmium과 같이 중양을 야기시키기도 한다.^{11,12)} *Chlorella vulgaris*가 copper에 내성을 나타내는 등 금속 화합물에 오염된 환경에서 자란 생물은 금속 화합물에 내성을 나타내기도 하나 lag시기에 세포 크기가 증가되고, 세포수가 감소됨으로써 생장이 저해된다.¹³⁾ 1977). Ornithine 합성의 마지막 단계를 촉매하는 효소인 acetylornithinase의 활성은 calcium, magnesium, manganese, iron, copper, zinc, nickel 등에 의해 떨어지나 반면 cobalt ion에 의해서는 오히려 촉진된다.¹⁴⁾ 지질은 호흡, 에너지 전달, 광합성 반응과 관계가 있다. 또한 TCA 회로와 호흡 연쇄 반응에서의 지질은 효소의 활성 도를 촉진시킨다.¹⁵⁾ 지질 분자의 조성은 유전적 요인¹⁶⁾에 의해서 뿐 아니라 영양 상태, 온도, 기타 외부환경 조건에 의해서도 결정되며,¹⁷⁾ 암처에서 생육된 *Chlorella vulgaris*의 지방산은 거의 포화 지방산과 monoenoic acids인데 반해, 명

처에서 생육된 것에서는 지방산과 polyunsaturated acids가 빠르게 합성된다.¹⁸⁾ 당지질을 구성하는 지방산들은 그 지방산 구조에 이중 결합이 많이 포함되어 있어 불포화도가 매우 높은 것이 특징이다. 이와 같이 당지질의 불포화 반응은 당지질의 종류에 따라서 염록체와 소포체에서 각각 이루어지는 것으로 알려져 있다.^{19,20)} 당지질의 기본 골격이 되는 diacylglycerol 또는 phosphatidic acid의 합성 장소에 따라서 진핵성 당지질(glycerol backbone의 2번 위치에 c-18 지방산을 포함)과 원핵성 당지질(glycerol backbone의 2번 위치에 c-16 지방산을 포함)로 나누어진다. 진핵성 당지질의 불포화 반응은 phosphatidylcholine(PC)의 형태로 oleic acid (18 : 1)로부터 linoleic acid (18 : 2)가 합성되는 과정이며 이 반응에는 NADH를 전자공급원으로 하는 소포체 막의 cytochrome b₅-cytochrome b₅ reductase system이 관여하는 것으로 밝혀져 있다.^{21,22)} 염록체에서 그 기본 골격이 형성되는 원핵성 당지질의 경우 구성 지방산의 불포화반응은 stearic acid (18 : 0)로부터 Oleic acid (18 : 1)로의 반응은 acyl carrier protein (ACP)과 결합한 형태로, 그리고 oleic acid (18 : 1)로부터 linoleic acid (18 : 2)를 거쳐 linolenic acid (18 : 3)로의 반응과 palmitic acid (16 : 0)로부터 hexadecatrienoic acid (16 : 3)까지의 반응을 당지질과 결합한 상태로 불포화 반응의 전 과정이 염록체 내에서 이루어진다.^{23,24,25)}

이와 같이 여러가지 환경 조건이 세포의 지질 대사에 미치는 영향 및 금속 화합물이 여러가지 세포 대사에 미치는 영향에 관한 보고는 많이 있으나, 금속 화합물에 의한 세균 세포의 당지질 생합성과 이를 구성하는 galactose와 지방산 조성 변화에 관한 보고는 없었다.

본 연구는 당지질 생합성과 이를 구성하는 galactose와 지방산의 조성 및 함량 변화에 미치는 여러 가지 금속 화합물의 영향을 대조구와 비교 분석하였다.

II. 재료 및 방법

1. *E. coli* 및 *B. subtilis* 배양

Escherichia coli (ATCC 25922)와 *Bacillus subtilis* (ATCC 5533)를 여러가지 금속 화합물을 처리한 nutrient broth에서 배양하였다.

본 실험에 사용된 금속 화합물은 copper chloride ($CuCl_2 \cdot 2H_2O$), nickel chloride ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$), manganese chloride ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)이다. 예비 실험 결과

얻어진 *E. coli*의 성장저해 농도인 copper chloride 50 ppm, manganese chloride 100 ppm, nickel chloride 100 ppm과 *B. subtilis*의 생장 저해 농도인 copper chloride 10 ppm manganese chloride 100 ppm, nickel chloride 50 ppm을 nutrient broth에 첨가한 후 일정량의 세포를 접종하여 37°C에서 24시간 진탕배양(130 rpm)하였다.

배양 기간 동안의 세포 생장을 건조량으로 측정하였다.

2. Total lipid 추출

배양 기간 동안 세포를 수확하여 Bligh와 Dyer⁴²⁾의 방법으로 세포에 함유되어 있는 total lipid를 추출하였다.

수확된 세포를 마쇄한 후, chloroform : methanol (1 : 2V/V) 혼합용액을 가하여 진탕한 다음 동량의 중류수를 첨가하여 혼합 방치하여 분리시켰다.

분리된 chloroform 층을 Whatmann No. 1 filter paper에 여과시켜 total lipid를 추출하였다.

남아있는 methanol 층에 chloroform을 첨가하여 혼합시킨 후 분리된 chloroform 층을 동일 여과지에 여과시켜 total lipid를 재추출하였다.

이들 추출물을 40~50°C dry oven에서 건조시켜 함량을 측정하였다.

3. 당지질의 분리와 동정

추출된 total lipid에 들어있는 monogalactosyldiacylglycerol(MGDG)과 digalactosyldiacylglycerol(DGDG)는 Thin layer chromatography(TLC, Desage)를 이용하여 분리하였다.⁴¹⁾

TLC glass plate (20×20 cm)에 silica gel (Merck, 60G)을 0.25 mm 두께로 입혀 실온에서 건조시킨 후 110°C의 dry oven에서 60분간 활성화시켜 사용하였다.

당지질 분리는 Chapman과 Barber²⁸⁾의 방법에 따라 two-one dimension method로 수행하였으며, 2차 전개 용매로는 chloroform : methanol : water(65 : 25 : 4, v/v), 2차 전개 용매로는 chloroform : acetone : methanol : aceticacid : water(100 : 40 : 20 : 20 : 10; v/v)의 혼합 용매를 이용하였다.

Total lipid를 전개하여 분리된 당지질들은 표준품(Sigma)과 비교 동정하였으며, 발색 시약으로는 MGDG와 DGDG 모두 1-naphthol reagent를 사용하였다.¹⁹⁾

4. 지방산의 methyl ester화

분리된 각각의 당지질을 구성하는 지방산의 조성 및 양적 변화를 Gas chromatography(GC, Varian star CX 3400)로 분석하기 위하여 Allen과 Good⁴³⁾의 방법에 의하여 MGDG, DGDG를 methyl esters화시켰다.

TLC plate에서 분리한 당지질에 methanol : sulphuric acid : benzene(100 : 5 : 5; V/V)의 transesterification mixture 4 ml와 standard인 heptadecanoic acid(Sigma)를 첨가하여 70°C dry oven에 60분간 방치한 뒤 냉각하여 5 ml의 중류수를 넣고 진탕하였다. 여기에 2 ml의 hexane을 넣고 강하게 진탕한 후 분리된 hexane층을 취하였는데, 이 분리 조작은 2번 반복하였다.

분리된 hexane층을 건조시켜 각 당지질의 fatty acid methyl esters의 함량을 측정하였다.²⁸⁾

5. Galactose의 함량분석

각 당지질을 구성하는 galactose 함량은 GC를 이용하여 분석하였다. Galactose의 동정은 표준품(Sigma)과 비교하여 결정하였으며, 사용한 GC detector는 FIDH₂-flame ionization detector를 사용하였으며, 사용한 column은 MEGABORE DB-FFAP 15 m으로 FFAP 530 μm IG를 충전제로 하였다. 분석 조건은 지방산 분석조건과 동일하게 하였다.

6. 지방산의 조성 분석

각 당지질을 구성하는 지방산들의 종류와 함량은 GC를 이용하여 분석하였다.

각 지방산의 동정은 lauric acid (12 : 0), myristic acid (14 : 0), palmitic acid (16 : 0), palmitoleic acid (16 : 1), stearic acid (18 : 0), oleic acid(18 : 1), linoleic acid (18 : 2), linolenic acid (18 : 3)의 표준품(sigma)과 비교하여 결정하였다.

사용한 GC detector는 FIDH₂-flame ionization detector를 사용하였으며, 사용한 column은 MEGA-BORE DB-FFAP 15 m으로 FFAP 530 μm IG를 충전제로 하였으며 조건은 다음과 같다.

Injection port temperature	200°C
Column temperature	180°C
Detector oven temperature	250°C
Carrier gas	N ₂ (30 ml/min)

III. 결 과

1. *E. coli* 및 *B. subtilis* 세포의 생장

금속화합물인 copper chloride, manganese chlo-

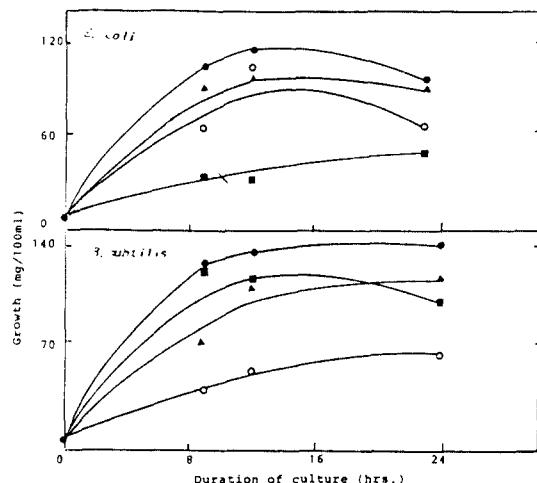


Fig. 1. Effects of various metal compounds on the growth of *E. coli* and *B. subtilis* during the cultivation.
 ● Control, ○ Copper chloride, ▲ Manganese chloride, ■ Nickel chloride.

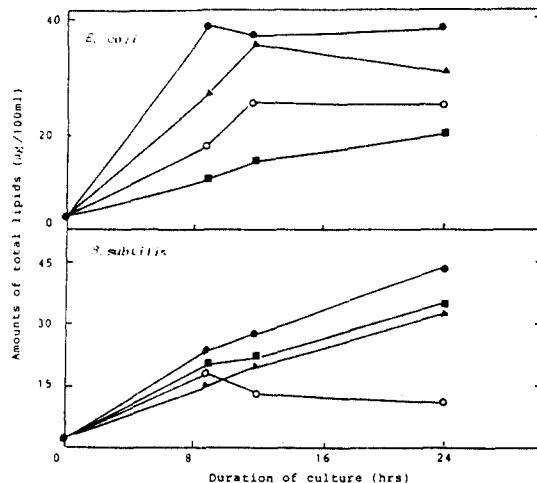


Fig. 2. Changes in contents of total lipids in *E. coli* and *B. subtilis* treated with various metal compounds during the cultivation.
 ● Control, ○ Copper chloride, ▲ Manganese chloride, ■ Nickel chloride.

ride, nickel chloride가 함유된 각각의 배지에서 배양한 *E. coli*와 *B. subtilis*의 세포 생장을 Fig. 1에 표시하였다.

Fig. 1에 나타난 바와 같이 대조구에 비해 금속화합물을 처리한 처리구에서는 생장억제 현상이 나타났다.

즉, 배양기간 동안 *E. coli*에서 copper chloride 처리구는 대조구에 비해 평균 26.35%의 생장 저해를 보였으며, manganese chloride 처리구는 평균 3.33%의 저해효과를 나타내었다. nickel chloride 처리구에서는 평균 65.08%의 생장 억제를 보였다. *B. subtilis*에서 copper chloride 처리구는 58.26%의 저해효과를 나타내었으며, manganese chloride 처리구에서 평균 21.57%와 nickel chloride 처리구에서 평균 11.76%의 완만한 생장을 보여주었다. 이와 같은 결과에서 세균 세포의 생장 저해 효과는 *E. coli*에서는 nickel chloride가 뚜렷하게 작용하였으며, *B. subtilis*는 copper chloride의 억제효과가 가장 뚜렷하게 나타났다.

2. Total lipid 함량 변화

금속화합물을 처리한 배지에서 *E. coli*와 *B. subtilis*의 total lipid 함량 변화는 Fig. 2에 표시하였다.

금속화합물을 처리한 배지에서 배양된 세포의 total lipid 함량은 *E. coli*는 대조구에 비해 copper

chloride 처리구는 평균 45.17%, manganese chloride 처리구는 평균 20.10%, nickel chloride 처리구는 평균 65.01%의 감소를 나타내었다. 대구구에서 total lipid의 함량이 배양 말기까지 계속 증가하는데 비하여 copper chloride 처리구와 manganese chloride 처리구, nickel chloride 처리구는 배양 초와 배양 중기까지 total lipid의 함량이 계속 증가하다가 배양 말기에 뚜렷한 저해효과를 나타내어 copper chloride 처리구 39.06%, manganese chloride 처리구 53.12%, nickel chloride 처리구 20.87%의 감소를 나타내었다. 한편 *B. subtilis*는 대조구에 비해 copper chloride 처리구는 평균 55.85%, manganese chloride 처리구에서 평균 34.04%, nickel chloride 처리구에서 20.21%의 감소를 나타내었다. 또한, copper chloride의 total lipid 함량은 대조구의 total lipid 함량이 계속 증가하는데 비하여 배양 초보다 배양 말기에 계속 감소되어 배양 말기에는 대조구에 비해 76.16%로 뚜렷한 저해 효과를 나타내었다. Manganese chloride 처리구는 배양 초에 다른 금속화합물 처리구에 비해 저해효과가 뚜렷했으나 배양 중기와 배양 말기에 계속 증가하여 배양 말기에는 nickel chloride 처리구와 비슷한 함량을 나타내었다. 이와 같이 *E. coli*와 *B. subtilis* 세포에서 배양 기간동안 total lipid의 함량이 금속화합물에 의하여 대부분 50% 이상의 높은 억제 효과를 나타냄이 관

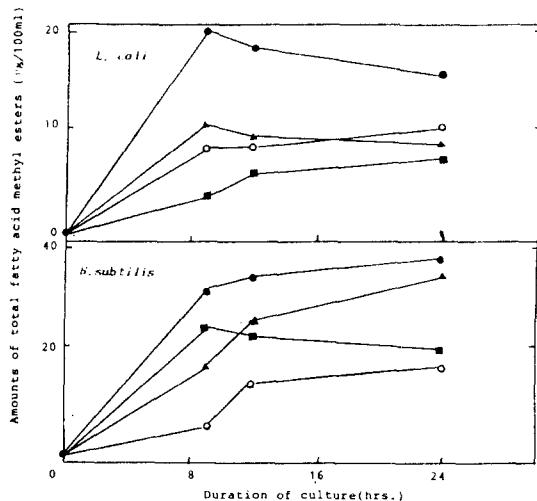


Fig. 3. Changes in contents of total fatty acid methyl esters in *E. coli* and *B. subtilis* treated with various metal compounds during the cultivation.
● Control, ○ Copper chloride, ▲ Manganese chloride ■ Nickel chloride.

찰되었다.

3. Total fatty acid methyl esters의 양적 변화

각 처리구별 total fatty acid methyl esters의 함량 변화는 Fig. 3에 표시하였다.

Fig. 3에 표기된 바와 같이 *E. coli*의 copper chloride 처리구에서 평균 46.09%와 manganese chloride 처리구에서 평균 47.19%의 비슷한 저해를 나타내었고, nickel chloride 처리구는 평균 7.81%의 저해를 나타내었다.

Nickel chloride 처리구와 copper chloride 처리구는 대조구의 total fatty acid methyl esters의 함량이 배양 초기와 배양 말기에 계속 감소되는데 비하여 계속 증가하였으며, manganese chloride 처리구와 copper chloride 처리구는 배양 초기에 total fatty acid methyl esters의 함량이 48.84%, 51.16%로 나타나 비슷한 함량을 나타내었다. *B. subtilis*에서 copper chloride 처리구는 평균 62.50%, manganese chloride 처리구는 평균 25.00%의 저해효과를 나타내었고, nickel chloride 처리구는 평균 33.89%의 감소를 나타내었는데, manganese chloride 처리구는 배양 초에 대조구에 비해 46.43%의 감소를 나타내었으나 배양 초기와 배양 말기에 계속 증가하여 배양 말기에는 대조구와 비슷한 함량을 나타내었다. Cop-

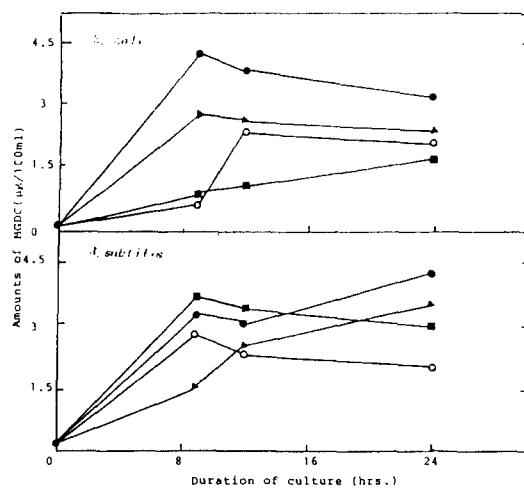


Fig. 4. Changes in contents of MGDG in *E. coli* and *B. subtilis* treated with various metal compounds during the cultivation.
● Control, ○ Copper chloride, ▲ Manganese chloride ■ Nickel chloride.

per chloride 처리구는 배양 초에 비해 배양 중기와 배양 말기에 total fatty acid methyl esters의 함량이 계속 증가하는 반면, nickel chloride 처리구는 계속 감소하여 배양 말기에는 nickel chloride 처리구와 copper chloride 처리구에서 46.15%, 53.85%의 비슷한 감소를 나타내었다.

즉, *E. coli*는 nickel chloride, *B. subtilis*에서는 copper chloride가 다른 처리구에 비해 뚜렷한 억제 현상을 나타내었다.

4. 당지질의 함량 변화

각 처리구별 2가지 당지질의 함량 변화는 Fig. 4, 5에 각각 표시하였다. Fig. 4, 5에 나타난 바와 같이 대조구의 당지질 함량을 보면, *E. coli*에서 MGDG의 함량은 total lipid 중 12.92%, DGDG는 36.75% 함유되어 있고 *B. subtilis* 대조구에서는 total lipid 중 MGDG의 함량은 20.54%, DGDG의 함량은 35.88% 함유되어 있는 것으로 나타나 *E. coli*와 *B. subtilis* 모두 대조구는 당지질중 DGDG의 함량이 더 높은 것으로 나타났다. 금속화합물에 의한 각 당지질들의 함량 변화는 다음과 같다.

Fig. 4에서 보는 바와 같이 MGDG는 대조구에서 46.91% 증가하였고, 배양기간 동안 대조구에 비해 *E. coli*에서 copper chloride 처리구는 54.26%, manganese chloride 처리구는 36.32%의 감소를 나타내

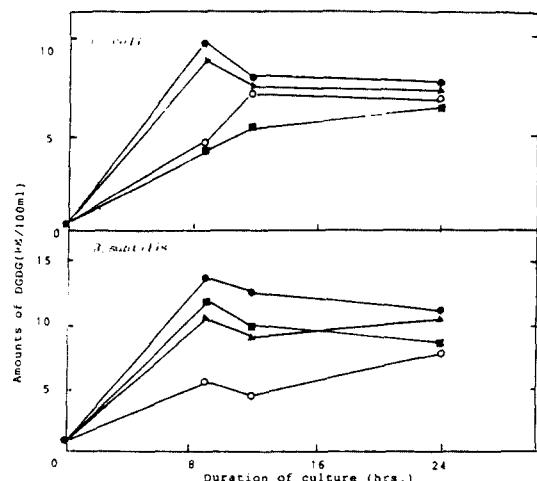


Fig. 5. Changes in contents of DGDG in *E. coli* and *B. subtilis* with various metal compounds during the cultivation.
 ● Control, ○ Copper chloride, ▲ Manganese chloride, ■ Nickel chloride.

었고, nickel chloride 처리구는 68.70%의 뚜렷한 저해효과를 나타내었다. Manganese chloride 처리구는 배양 초에 비해 배양 중기와 배양 말기에 계속 감소하는 대조구의 당지질과 비슷한 함량을 나타내었고, nickel chloride 처리구와 copper chloride 처리구는 배양 초에 대조구에 비해 80.95%, 85.71%의 뚜렷한 저해 효과를 나타내었으나 nickel chloride 처리구는 배양 중기와 배양 말기에 계속 증가하여 배양 말기에 manganese chloride 처리구와 비슷한 함량을 보여 주었고, copper chloride 처리구는 배양 중기의 현저한 증가를 보여 manganese chloride 처리구와 배양 중기에 비슷한 함량을 나타내었다. *B. subtilis*에서는 대조구에서 76.95% 증가하였으며, 대조구에 비해 copper chloride 처리구에서 34.06%, manganese chloride 처리구에서 28.30%의 감소를 나타내었고, nickel chloride 처리구는 6.79%의 저해효과를 나타내었다. Copper chloride 처리구와 manganese chloride 처리구는 배양 중기와 배양 말기에 계속 증가하여 copper chloride 처리구는 배양 말기에 nickel chloride 처리구와 비슷한 함량을 나타내었고, manganese chloride 처리구는 대조구와 비슷한 함량을 나타내었다. Nickel chloride 처리구는 배양 초에 비하여 배양 중기와 배양 말기에 계속 감소하여 배양 말기에는 30.70%의 감소를 나타내었다. MGDG에 대한 copper chloride, man-

ganese chloride와 nickel chloride의 억제 효과는 *B. subtilis*보다 *E. coli*에서 더 높게 나타났다.

DGDG는 Fig. 5에서와 같이 *E. coli*에서 대조구는 77.61% 배양기간동안 대조구에 비해 copper chloride 처리구는 26.95%, manganese chloride 처리구는 5.86%의 감소를 나타내었고, nickel chloride 처리구는 34.37%의 저해효과를 나타내었다. Manganese chloride 처리구는 배양 초에 비해 배양 중기와 배양 말기에 계속 감소하였으며, nickel chloride 처리구와 copper chloride 처리구는 배양 초에 다른 금속화합물에 비해 55.01%, 54.69%의 뚜렷한 저해효과를 나타내었으나, 배양 중기와 배양 말기에 계속 증가하여 배양 말기에 manganese chloride 처리구와 copper chloride 처리구, nickel chloride 처리구의 DGDG는 비슷한 함량을 나타내었다. *B. subtilis*에서는 대조구는 70.22% 증가하였고, copper chloride 처리구에서 51.73%로 현저한 저해를 나타냈으며, manganese chloride 처리구에서 18.27%의 감소를 나타내었고, nickel chloride 처리구는 19.33%의 저해효과를 나타내었다. 대조구의 DGDG 함량이 배양 중기에 비하여 배양 말기에 감소하는데 비하여 copper chloride 처리구와 nickel chloride 처리구는 배양 말기에 계속 증가하였다. Nickel chloride 처리구는 배양 초에 비하여 배양 중기와 배양 말기에 감소하였다. 이와 같이 DGDG는 Fig. 9, 10에서와 같이 배양 기간동안 대조구에 비해 *E. coli*(평균 38.67%)가 *B. subtilis*(평균 30.68%)보다 억제효과가 크게 나타났다.

5. 당지질의 galactose 함량 변화

각 처리구별 당지질의 galactose 함량변화는 Table 1, 2에 각각 표시하였다. *E. coli*에서 MGDG의 galactose 함량은 대조구에서 63.09%의 증가를 보였고, 배양기간동안 대조구에 비해 copper chloride 처리구는 24.03%의 저해효과를 나타내었고, manganese chloride 처리구에서 45.92%와 nickel chloride 처리구에서 40.77%의 감소를 나타내어, *E. coli*에서 당지질에 포함되어있는 galactose의 함량은 manganese chloride 처리구에서 큰 억제 효과를 나타내었다.

한편, *B. subtilis*에서는 대조구에서 63.13% 증가하였고, 대조구에 비해 copper 처리구에서 45.55%의 저해효과를 나타내었고 manganese chloride 처리구에서 31.85%와 nickel chloride 처리구에서 32.22%의 감소를 나타내어, *B. subtilis*에서 당지질에 포함되어 있는 galactose의 함량은 copper chloride 처리구에

Table 1. Changes in contents of galactose in MGDG and DGDG in *Escherichia coli* treated with various metal compounds during the cultivation

Duration of culture (hrs.)	0	9				12				24			
Treatment Galactose	Cont	Cont	CuCl ₂	MnCl ₂	NiCl ₂	Cont	CuCl ₂	MnCl ₂	NiCl ₂	Cont	CuCl ₂	MnCl ₂	NiCl ₂
MGDG	0.05	0.75	0.50	0.30	0.53	0.80	0.60	0.39	0.50	0.78	0.67	0.57	0.35
DGDG	0.02	1.30	1.50	0.75	0.62	1.50	1.20	1.30	0.45	2.25	1.25	1.80	0.80

〈NOTE〉 Unit: μg, Cont.: Control, MGDG: Monogalactosyldiacylglycerol, DGDG: Digalactosyldiacylglycerol.

Table 2. Changes in contents of galactose in MGDG and DGDG in *Bacillus subtilis* treated with various metal compounds during the cultivation

Duration of culture (hrs.)	0	9				12				24			
Treatment Galactose	Cont	Cont	CuCl ₂	MnCl ₂	NiCl ₂	Cont	CuCl ₂	MnCl ₂	NiCl ₂	Cont	CuCl ₂	MnCl ₂	NiCl ₂
MGDG	0.03	1.00	0.50	0.57	0.75	1.05	0.62	0.65	0.63	0.87	0.47	0.77	0.57
DGDG	0.15	4.50	2.00	3.01	4.15	5.02	2.15	4.51	2.45	6.10	1.95	4.22	2.39

〈NOTE〉 Unit: μg, Cont.: Control, MGDG: Monogalactosyldiacylglycerol, DGDG: Digalactosyldiacylglycerol.

서 큰 억제효과를 나타내었다. 한편, DGDG의 galactose 양적 동태를 보면 *E. coli*에서 대조구는 65.41% 증가하였으며, copper chloride 처리구는 17.03%의 저해효과를 나타내었고, manganese chloride 처리구에서는 23.76%의 감소율을 보여 주었으며, nickel chloride 처리구에서는 62.97%의 높은 억제를 나타내어 *E. coli*에서 당지질에 함유된 galactose의 함량은 nickel chloride 처리구에서 현저히 저해된 것으로 분석되었다. *B. subtilis*에서는 대조구에서 42.75% 증가하였고, copper chloride 처리구에서 60.93%의 저해효과를 나타내어 17.03%의 저해효과를 나타낸 *E. coli*와 큰 차이를 보여 copper chloride 처리구에서 서로 다른 저해효과를 나타내었고, manganese chloride 처리구에서는 23.76%의 감소를 보여 *E. coli*의 23.76%와 비슷한 저해효과를 나타내었다. Nickel chloride 처리구에서는 42.48%의 억제를 나타내어, *B. subtilis*에서 당지질에 함유된 galactose의 함량은 copper chloride 처리구에서 현저히 저해되었다.

6. 당지질의 지방산 조성 변화

*E. coli*와 *B. subtilis*의 당지질에서 MGDG, DGDG 합성에 이용되는 지방산중 lauric acid (12 : 0), my-

ristic acid (14 : 0), palmitic acid (16 : 0), palmitoleic acid (16 : 1), stearic acid(18 : 0), oleic acid (18 : 1), linoleic acid (18 : 2), linolenic acid (18 : 3)의 조성변화를 분석하였다.

금속화합물을 처리하였을 때 각 당지질의 지방산 변화는 Table 3에서 Table 6까지 나타내었다. Table 3에서 6까지에서 나타나는 바와 같이 같은 조건의 환경이라 하더라도 생육시기와 처리한 금속화합의 종류에 따라 당지질을 구성하는 지방산의 조성변화가 있는 것으로 관찰되었다.

MGDG를 구성하는 지방산의 조성변화는 Table 3과 4에서 나타난 바와 같이 *E. coli*의 경우 대조구는 배양 9시간에는 linolenic acid 23.07%와 oleic acid 15.14%를 이용하였고, 배양 24시간에는 palmitic acid 30.88%와 limolenic acid 15.03%를 사용하였으며, 배양 24시간에는 myristic acid 33.07%와 palmitoleic acid 10.6%의 이용율을 나타내었다.

Copper chloride 처리구는 *E. coli*의 경우 배양 9시간에 palmitic acid가 17.28%, lauric acid 6.77%, 12시간에 palmitic acid 20.34%, linoleic acid 6.98%, 24시간에 palmitic acid 22.37%, linolenic acid 9.39%가 이용되었다. Manganese chloride 처리구는 *E. coli* 배양 9시간에 palmitic acid 44.28%, palmitoleic acid

Table 3. Changes in contents of fatty acid methyl esters of MGDG in *Escherichia coli* treated with various metal compounds during the cultivation

Duration of culture (hrs.)	0	9				12				24			
	Treatment	Cont	Cont	CuCl ₂	MnCl ₂	NiCl ₂	Cont	CuCl ₂	MnCl ₂	NiCl ₂	Cont	CuCl ₂	MnCl ₂
Lauric acid (12 : 0)	19.96	—	13.74	3.05	16.84	—	2.71	12.48	1.84	14.06	3.86	19.61	—
Myristic acid (14 : 0)	4.73	2.4	6.52	2.28	0.22	4.56	11.60	8.67	3.38	0.01	3.84	0.36	1.78
Palmitic acid (16 : 0)	29.28	13.57	17.28	44.28	31.67	30.88	20.34	34.34	33.29	37.52	22.37	21.43	43.51
Palmitoleic acid (16 : 1)	—	—	0.70	12.90	—	10.74	4.12	4.5	—	7.31	6.93	2.02	—
Stearic acid (18 : 0)	8.69	8.37	7.39	3.19	10.70	8.99	1.34	17.61	1.67	4.52	0.42	0.17	—
Oleic acid (18 : 1)	—	15.14	9.59	1.71	8.79	—	6.82	1.6	5.07	9.68	9.13	1.52	5.42
Linoleic acid (18 : 2)	13.09	—	1.91	1.60	0.76	0.93	18.71	2.79	—	0.01	0.31	0.18	8.06
Linolenic acid (18 : 3)	17.23	23.07	9.86	10.17	—	15.03	4.51	3.48	19.03	3.89	13.79	19.53	10.02
Unknown	7.02	37.45	33.01	20.82	31.02	28.87	29.85	14.53	35.72	23.00	39.35	35.18	31.21
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

〈NOTE〉 Unit: %, Cont.: Control, MGDG: Monogalactosyldiacylglycerol.

Table 4. Changes in contents of fatty acid methyl esters of MGDG in *Bacillus subtilis* treated with various metal compounds during the cultivation

Duration of culture (hrs.)	0	9				12				24				
	Treatment	Cont	Cont	CuCl ₂	MnCl ₂	NiCl ₂	Cont	CuCl ₂	MnCl ₂	NiCl ₂	Cont	CuCl ₂	MnCl ₂	NiCl ₂
Lauric acid (12 : 0)	0.57	0.32	13.42	4.31	—	11.81	—	31.32	12.14	20.01	—	—	—	—
Myristic acid (14 : 0)	5.08	11.24	5.16	7.28	3.04	3.42	5.66	0.55	3.52	0.34	3.36	14.12	0.58	
Palmitic acid (16 : 0)	21.32	34.17	29.03	15.98	25.21	19.87	23.10	25.11	38.56	10.06	34.64	6.11	41.71	
Palmitoleic acid (16 : 1)	12.36	4.43	—	—	17.34	4.70	19.51	0.16	—	3.75	—	24.38	20.08	
Stearic acid (18 : 0)	3.97	6.87	10.46	—	0.58	6.14	9.40	1.49	2.56	0.01	19.88	0.53	7.91	
Oleic acid (18 : 1)	—	0.03	—	23.51	8.61	2.49	6.49	4.29	—	—	5.53	1.57	3.41	
Linoleic acid (18 : 2)	10.12	—	7.03	7.73	2.87	14.17	—	0.59	5.11	—	—	4.24	—	
Linolenic acid (18 : 3)	14.76	11.85	1.15	6.11	7.36	—	—	7.41	—	20.81	8.52	12.89	—	
Unknown	35.82	31.09	33.75	35.08	34.99	37.40	35.84	29.08	36.11	33.01	28.07	36.16	26.31	
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	

〈NOTE〉 Unit: %, Cont.: Control, MGDG: Monogalactosyldiacylglycerol.

12.90%, 12시간에 palmitic acid 34.34%, stearic acid 17.61%, 24시간에 palmitic acid 21.43%, linolenic acid 19.53%의 이용율을 나타냈고, Nickel chloride 처리구는 *E. coli*에서 배양 9시간에 palmitic acid 31.67%, lauric acid 16.84%, 배양 12시간에 palmitic acid 와 linolenic acid가 33.29%와 19.03%, 배양 24시간에 palmitic acid 43.51%와 linoleic acid 8.06%가 주로 이용된 지방산이었다.

한편, *B. subtilis* 대조구는 배양 9시간에 palmitic acid와 myristic acid가 각각 34.17%와 11.24% 이-

용되었으며, 배양 12시간에는 Palmitic acid와 lauric acid가 각각 19.87%와 11.81%, 배양 24시간에는 palmitic acid와 linolenic acid가 각각 25.83%와 10.41%가 도입되었다. Copper chloride 처리구는 배양 9시간에 palmitic acid 29.03%, lauric acid 4.47%, 12시간에 palmitic acid 23.10%, palmitoleic acid 6.50%, 24시간에 palmitic acid 34.64%, stearic acid 13.25%의 이용율을 나타내었다. Manganese chloride 처리구는 배양 9시간에 oleic acid 23.51%와 palmitic acid 15.98%, 12시간에 lauric acid 31.32%,

Table 5. Changes in contents of fatty acid methyl esters of DGDG in *Escherichia coli* treated with various metal compounds during the cultivation

Duration of culture (hrs.)	0	9				12				24			
Treatment Fatty acid	Cont	Cont	CuCl ₂	MnCl ₂	NiCl ₂	Cont	CuCl ₂	MnCl ₂	NiCl ₂	Cont	CuCl ₂	MnCl ₂	NiCl ₂
Lauric acid (12 : 0)	11.58	—	28.01	0.22	—	10.62	11.45	17.71	—	0.32	18.76	—	15.25
Myristic acid (14 : 0)	0.65	0.65	7.08	11.05	3.11	0.66	5.69	6.40	2.69	12.51	0.02	1.59	0.33
Palmitic acid (16 : 0)	32.58	35.03	13.96	33.49	26.28	43.49	30.59	25.24	14.67	24.09	8.36	30.55	25.37
Palmitoleic acid (16 : 1)	1.95	6.13	0.45	16.70	9.12	6.38	0.08	1.38	2.65	3.54	10.22	15.97	0.13
Stearic acid (18 : 0)	18.95	0.62	2.13	7.38	1.23	0.92	3.61	0.05	0.21	7.75	0.08	—	—
Oleic acid (18 : 1)	0.09	—	3.62	0.09	—	2.31	9.91	0.32	14.98	3.28	16.32	4.19	—
Linoleic acid (18 : 2)	4.39	0.63	0.09	—	12.31	1.31	5.64	—	13.61	10.29	0.12	21.59	14.62
Linolenic acid (18 : 3)	3.04	26.17	19.85	—	20.07	14.06	0.06	22.03	15.36	15.76	11.02	—	10.74
Unknown	26.77	30.77	24.81	31.07	27.88	20.35	32.97	26.87	35.83	22.46	35.04	26.11	33.56
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

〈NOTE〉 Unit: %, Cont.: Control, MGDG: Monogalactosyldiacylglycerol.

Table 6. Changes in contents of fatty acid methyl esters of DGDG in *Bacillus subtilis* treated with various metal compounds during the cultivation

Duration of culture (hrs.)	0	9				12				24			
Treatment Fatty acid	Cont	Cont	CuCl ₂	MnCl ₂	NiCl ₂	Cont	CuCl ₂	MnCl ₂	NiCl ₂	Cont	CuCl ₂	MnCl ₂	NiCl ₂
Lauric acid (12 : 0)	1.73	—	5.71	11.83	15.75	10.13	11.39	2.13	3.92	—	—	19.51	27.30
Myristic acid (14 : 0)	10.16	1.64	8.09	8.98	2.91	5.68	3.97	8.77	15.55	5.02	1.37	8.21	4.96
Palmitic acid (16 : 0)	33.47	49.25	20.26	30.09	42.99	39.08	44.01	19.35	27.98	23.36	38.29	15.54	21.01
Palmitoleic acid (16 : 1)	18.40	12.35	27.03	0.29	19.01	4.02	—	0.02	9.61	—	4.56	—	2.29
Stearic acid (18 : 0)	0.19	15.24	—	18.48	10.97	0.63	—	6.91	3.45	—	2.03	—	4.50
Oleic acid (18 : 1)	—	—	0.16	—	5.76	6.12	—	—	3.82	15.01	—	11.09	—
Linoleic acid (18 : 2)	0.99	6.84	25.69	4.85	—	12.39	6.92	—	—	—	19.74	8.91	—
Linolenic acid (18 : 3)	1.24	—	15.99	25.03	—	6.12	18.41	23.69	25.27	20.51	9.78	23.67	22.56
Unknown	33.82	14.68	2.93	0.45	2.61	15.83	15.30	39.13	10.40	36.10	34.23	13.07	17.38
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

〈NOTE〉 Unit: %, Cont.: Control, MGDG: Monogalactosyldiacylglycerol.

palmitic acid 25.11%, 24시간에 palmitoleic acid 24.38%, myristic acid 14.12%를 당지질 생합성에 주로 사용하였으며, nickel chloride 처리구는 palmitic acid와 palmitoleic acid가 배양 9시간에 25.12%와 17.34%, 12시간에는 palmitic acid와 lauric acid가 각각 38.56%와 12.14%, 24시간에는 palmitic acid 41.71%와 palmitoleic acid 20.08%가 도입되었어 *E. coli*와 *B. subtilis* 대조구는 공통적으로 palmitic acid와 linolenic acid의 이용율이 높았다. Table 5, 6에서 DGDG 합성에 참여한 주요 지방산의 양적 동태를 볼 수 있다.

E. coli 대조구의 경우 palmitic acid와 linolenic acid가 각각 배양 9시간에 35.03%와 26.17%, 12시간에 palmitic acid와 lauric acid가 43.49%와 10.62%, 24시간에 palmitoleic acid와 myristic acid가 12.94%와

주로 이용된 반면, *B. subtilis*에서는 stearic acid가 주로 이용되었다. 또한 *E. coli*와 *B. subtilis*의 MGDG는 공통적으로 지방산 중 palmitic acid와 linolenic acid의 이용율이 높았다. Table 5, 6에서 DGDG 합성에 참여한 주요 지방산의 양적 동태를 볼 수 있다.

11.28% 사용되었다. Copper chloride 처리구는 배양 9시간에 lauric acid 28.01%와 linolenic acid 19.85%, 12시간에 palmitic acid 30.59%, lauric acid 11.45%, 24시간에 lauric acid 18.76%, oleic acid 16.32%가 이용되었고, Manganese chloride 처리구는 배양 9시간에 33.49%, palmitoleic acid 16.70%, 12시간에 palmitic acid 25.24%, lauric acid 17.71%, 24시간에 palmitic acid 30.55%, linoleic acid 21.59%가 이용되었다. Nickel chloride 처리구는 palmitic acid 26.28%와 linoleic acid 12.31%가 배양 9시간에, linolenic acid 15.36%와 oleic acid 14.98%가 12시간에, palmitic acid 25.37%와 lauric acid 15.25%가 24시간에 도입되었다. 한편, *B. subtilis* 대조구는 배양 9시간에 palmitic acid와 stearin acid가 각각 49.25%와 15.24%, 12시간에 palmitic acid 39.08%와 linoleic acid 12.39%, 24시간에는 palmitic acid와 linolenic acid가 23.38%와 14.55%로써 주요 구성 지방산으로 관찰되었다.

Copper chloride 처리구는 배양 9시간에 palmitoleic acid 27.03%, linoleic acid 25.69%, 12시간에 palmitic acid 44.01%, lauric acid 11.39%, 24시간에 palmitic acid 38.29%, oleic acid 15.01%로 조사되어 *B. subtilis*의 DGDG 생합성에 palmitoleic acid가 주로 이용되었고, manganese chloride 처리구는 stearic acid와 lauric acid가 각각 배양 9시간에 18.48%와 11.83%, 12시간에 palmitic acid와 myristic acid가 19.35%와 8.77%, 24시간에는 lauric acid 19.51%, oleic acid 11.09%가 이용되었다. Nickel chloride 처리구의 경우 palmitic acid 42.99%와 palmitoleic acid 19.01%가 배양 9시간에, palmitic acid 27.98%와 myristic acid 25.27%, lauric acid 27.30%와 linolenic acid 22.56%가 24시간에 도입되어 *E. coli*와 *B. subtilis* 대구조의 DGDG는 공통적으로 지방산 중 palmitic acid의 이용율이 높았고, *E. coli* 대조구에서 linolenic acid가 많은 이용율을 보인데 비해 *B. subtilis* 대조구는 linoleic acid의 이용율이 높았다. *E. coli*와 *B. subtilis*의 DGDG 생합성시에는 *E. coli*는 linolenic acid를 주로 사용한 반면, *B. subtilis*는 여러 지방산의 이용률이 고르게 나타났고, manganese chloride 처리구에서는 *E. coli*에서 lauric acid, *B. subtilis*에서 myristic acid의 이용율이 증가하였다.

IV. 고 칠

Manganese는 10^{-3} M의 농도에서 5% 이상의 변

이를 일으키는데 세포분열 중기의 세포를 파괴하고, 10^{-3} M 이상의 농도에서는 세포 독성효과가 나타나며 DNA 합성을 방해하고 염색체 이상을 일으킨다.⁹⁾ Copper는 염록체의 전자 전달계에 관여하는 plastocyanine의 구성 성분이며, 부족할 경우 염록소 합성 억제로 인하여 식물체에 황화 현상이 나타나고,²⁶⁾ 과다한 축적은 고등 식물의 광합성 기구의 활성을 저해하여 광계I과 광계II의 활성을 억제하며, 지질의 과산화를 유발한다.²⁷⁾

Nickel은 *Vicia faba*의 핵산 구조의 변형을 일으키고 분열 중인 세포의 chromatin 배열에 이상을 일으킨다.¹⁰⁾

위와 같은 금속 화합물의 저해효과로 인해 본 실험에서도 여러가지 금속화합물이 함유된 배지에서 생육시킨 *E. coli*와 *B. subtilis* 세포의 생장이 대조구에 비해 억제된 것으로 나타났다.

금속 화합물 처리시 total lipid의 합성은 대부분 *E. coli*와 *B. subtilis*에서 50%의 이상의 높은 억제율을 나타냈다. 이는 지질 합성에 관여된 효소활성과 대사에 영향을 미쳐 정상적인 세포 대사가 일어나지 못하기 때문인 것으로 생각된다. 즉, 아미노산이 탈아미노 반응에 의해 케토산으로 전환되는 ketogenic 아미노산은 지방산 합성의 전구체인 acetyl CoA로 번개되는데 이들 금속화합물에 의해 지방산 효소의 활성을 제한하였기 때문이다. 이를 뒷받침 할 수 있는 것은 동식물 뿐만 아니라 미생물에서 지방산 생합성의 key enzyme인 acetyl CoA carboxylase가 금속 화합물의 영향을 받아 지방산 생합성에 참여하지 않은 것으로 설명할 수 있기 때문이다.¹²⁾

금속화합물에 대한 각 당지질 합성은 Fig. 4, 5에서 보듯이 현저히 감소하였는데 *E. coli*의 MGDG 대해서는 nickel chloride가 68.70%, *B. subtilis*에서는 copper chloride가 34.06%로 처리한 금속 화합물 중 가장 높은 억제율을 나타냈다. DGDG에 대해서는 *E. coli*에서 nickel chloride가 34.37%, *B. subtilis*에서는 copper chloride가 51.73%의 높은 억제율을 나타냈다. 이와 같이 본 실험에서 3가지 금속 화합물을 처리하여 관찰한 MGDG와 DGDG의 합성이 감소된 것은 이들 금속화합물들이 막의 투과성과 대사능을 변화시킴으로써 세포내 물질대사를 정상적으로 일어나지 못하게 하여 결과적으로 구성 물질의 변화와 당지질 생합성 억제를 초래했기 때문인 것으로 생각된다.

미생물을 구성하는 주요 당지질에는 MGDG, DGDG, TGDG 등이 있다.

*Dunaliella salina*에서 당지질을 구성하는 지방산

들은 그 지방산 구조에 이중 결합이 많이 포함되어 있어 불포화도가 매우 높은 것이 특징이다.^{19,20)} 당지질은 기본 골격이 되는 diacylglycerol 또는 phosphatidic acid의 합성 장소에 따라서 glycerol backbone의 2번 위치에 c-18 지방산을 포함하는 진핵성 당지질과 glycerol backbone의 2번 위치에 c-16지방산을 포함하는 원핵성 당지질로 나누어진다. 진핵성 당지질의 불포화 반응은 phosphatidylcoline (PC)의 형태로 oleic acid (18 : 1)로부터 linoleic acid (19 : 2)가 합성되는 과정이며 이 반응에서 NADH를 궁극적 전자공급원으로 하는 소포체막의 cytochrome b₅-cytochrome b₅ reductase system이 관여한다.^{21,22)} 원핵성 당지질의 경우 구성 지방산의 불포화 반응은 stearic acid (18 : 0)로부터 oleic acid (18 : 1)로부터 linoleic acid (18 : 2)를 거쳐 linolenic acid (18 : 3)로의 반응과 palmitic acid (16 : 0)로부터 hexadecatrienoic acid (16 : 3)까지의 반응은 당지질과 결합한 상태로 불포화과정의 전과정이 이루어진다.^{23,24,25)}

냉처(4°C/7°C)와 온처(14°C/17°C)에서 생육된 *P. sativum*으로부터 분리한 염록체의 thylakoid막은 저온 처리를 한 경우 당지질의 linolenic acid(18 : 3)의 함량이 증가하였고, linoleic acid(18 : 2)는 감소되었며, nonthylakoid 막에서는 MGDG와 DGDG의 linolenic acid가 증가하여 *E. coli*의 대조구와 manganese chloride 처리구에서 당지질 생합성 과정에 MGDG의 linolenic acid 이용율이 증가된 결과와 비슷하였다.²⁶⁾ C-4 식물인 옥수수의 염육세포와 유관속조세포 사이에서 염록체막 지질조성은 양 조직에서 MGDG와 DGDG가 65~70%를 차지하며, MGDG/DGDG 비율은 유관속조 세포에서 약간 높았다. 이와 같은 결과는 시금치에서의 비율이 grana lamella에서 더 높은 것과는 상반된 것이나²⁷⁾ 담배의 경우 stroma lamella만을 갖는 mutant의 염록체에서 정상 염록체에 비해 더 높다는 보고²⁸⁾와는 일치하여 당지질이 thylakoid막의 구조결정에 영향을 미치지 못한다고 사료된다. 또한 본 실험에서 *E. coli*와 *B. subtilis* 대조구의 total lipid 중 MGDG와 DGDG가 45~50%를 차지하는 점과 비교해볼 때 미생물은 식물보다 적은 양의 당지질을 포함하고 있다고 사료된다. *Phaseolus multiflours*, *medicago sativa*, *Ricinus communis* 같은 식물은 linolenic acid가 90%를 차지하고 있고,^{18,31-33)} *Anacystis nidulans*, *Anabaena variabilis* 같은 blue-green algae는 당지질을 구성하는 주요 지방산중 palmitic acid의 함량이 높았으며,¹⁸⁾ Whateat flour, *Narcissus bulb*의 비광합성

조직은 linoleic acid를 주요 지방산으로 구성하고 있다.¹⁸⁾ 염록체의 내막은 대부분 DGDG로 구성되어 있고, thylakoid막은 MGDG의 함량이 높은데³⁴⁾ 공통적으로 linolenic acid가 주요 지방산으로 나타나 *E. coli*와 *B. subtilis*의 대조구와 MGDG의 경우 *E. coli*의 manganese chloride 처리구와 당지질 생합성에 이용된 주요 지방산이 비슷한 것으로 밝혀졌다. 당지질 생합성 억제와 더불어 이를 당지질을 구성하는 주요 지방산의 조성 변화도 일어났는데, 이는 미생물의 배양조건과 생활사에 따라 지방산 조성에 다양한 변화가 초래된다는 보고³⁵⁾와 일치한다. 또한 불포화 지방산과 포화 지방산이 정상적인 세포 생장과 세포의 생존능력 유지에 필수적이고,³⁶⁾ 지방산은 그 농도와 특성에 의존하여 여러 미생물의 생장에 영향을 미치는데 불포화 지방산의 농도가 높을 때 세포 투과성을 변화시켜 세균세포가 지방산을 흡수함으로써 생장에 저해효과를 나타낸다.

당지질을 구성하는 주요 지방산은 정상 배지에서 배양하는 동안 이들 균주의 당지질 종류에 따라 차이가 있었다. MGDG의 경우 *E. coli*와 *B. subtilis* 공통적으로 palmitic acid와 linoleic acid가 많이 도입되었다. 이와 같이 *E. coli*와 *B. subtilis* 대조구의 경우 당지질 생합성에 이용된 주요 지방산은 linolenic acid와 palmitic acid임을 알 수 있다.

각 처리구별로 주요 지방산의 이용 동태 변화를 보면 다음과 같다.

Copper chloride를 처리한 *E. coli* 당지질에서는 전반적으로 lauric acid와 palmitic acid의 이용율이 증가하였고, MGDG는 myristic acid를 많이 이용하였다. *B. subtilis*에서 copper chloride 처리시는 전체적으로 linoleic acid가 도입되었고, MGDG의 경우 stearic acid, DGDG형성에는 palmitoleic acid의 이용이 증가되었다.

Manganese chloride 처리시 많이 이용된 지방산은 *E. coli*에서 palmitoleic acid, *B. subtilis* lauric acid였으며, 이외에도 *E. coli*의 MGDG와 DGDG는 lauric acid를, *B. subtilis*의 MGDG는 palmitoleic acid를, *B. subtilis*의 DGDG는 myristic acid를 주로 이용하여 당지질을 생합성하였다.

Nickel chloride를 처리한 *E. coli*가 당지질 형성에 주로 사용한 지방산은 palmitic acid와 oleic acid였고, *B. subtilis*의 당지질 합성시 nickel chloride 처리구에서 주로 사용된 지방산은 palmitic acid였는데 DGDG가 생합성될 때 lauric acid를 함께 사용하였다.

*B. subtilis*는 MGDG의 경우 palmitic acid와 lau-

ric acid, myristic acid, DGDG는 myristic acid의 이용율이 대조구에 비해 증가하였다. 이상의 결과에서 보면 금속화합물을 처리한 배지에서 생육된 세균 세포는 당지질 합성시 대조구에 비해 불포화 지방산을 많이 이용했다는 사실을 알 수 있다. 포화지방산과 불포화 지방산의 비율이 변화되어 불균형이 초래되면 정상적인 세포생장과 세포의 생존 능력 유지에도 문제가 생기게 될 뿐 아니라 세포막의 유동성에 변화가 생기게 된다.³⁷⁾

즉, straight-chain fatty acid를 갖는 Gram 음성균은 불포화 지방산 (18:1, 18:2)을 많이 함유하고 있으며 약간의 16:0을 갖는다는 보고^{38,39)}와 branched-chain fatty acid를 갖는 Gram-양성균은 대부분이 포화 지방산 (16:0, 15:0)을 함유한다는 보고는^{38,40)} 본 연구에서 *E. coli* 대조구는 palmitic acid와 불포화 지방산이 조사되었으며 *B. subtilis* 대조구는 약간의 불포화 지방산이 분석되었으나 대부분의 포화 지방산을 함유하고 있는 점과 일치한다.

본 실험에서 *E. coli*와 *B. subtilis* 대조구의 당지질을 구성하는 지방산 중 포화 지방산인 palmitic acid와 불포화 지방산인 linolenic acid가 많은 비율을 차지하는 것은 옥수수와 완두의 당지질에서 MGDG의 경우 linolenic acid가 80% 이상 차지하는 점과 DGDG에서 palmitic acid와 linolenic acid가 90% 이상 차지하는 점³⁴⁾이 본 실험결과와 비슷하게 나타났으나, *E. coli*와 *B. subtilis*에 금속 화합물을 처리하여 생합성된 당지질은 여러가지 불포화 지방산이 다양하게 이용된 점으로 미루어 금속 화합물이 생장 및 total lipid 뿐만 아니라 당지질 생합성에도 많은 영향을 미치고 있다고 사료된다.

V. 적  요

*E. coli*와 *B. subtilis* 당지질과 galactose 생합성 및 지방산 조성에 여러가지 금속 화합물 copper chloride, manganese chloride, nickel chloride 이 어떠한 영향을 미치는가를 분석하였다.

세포의 생장과 total fatty acid methyl esters, monogalactosyldiacylglycerol(MGDG), digalactosyldiacylglycerol(DGDG)의 함량은 대조구에 비해 금속 화합물 처리구에서 현저히 감소하였다. 당지질 생합성 과정에서 MGDG에 함유된 galactose 함량은 *E. coli*에서는 manganese chloride 처리구 45.92%, *B. subtilis*는 copper chloride 처리구 45.55%의 큰 억제 효과를 나타내었다.

DGDG의 galactose의 함량은 *E. coli*는 nickel

chloride 처리구에서 62.97%의 현저한 감소를 보였고, *B. subtilis*에서는 copper chloride 처리구에서 60.93%의 현저한 저해를 나타내었다. *E. coli*의 당지질 생합성에 이용된 주요 지방산은 대조구의 MGDG는 palmitic acid 27.81%와 linolenic acid 14.81%로 나타났으나, copper chloride 처리구는 palmitic acid 20.00%, myristic acid 7.32%, nickel chloride 처리구에서 palmitic acid 36.16%, oleic acid 6.43%, manganese chloride 처리구에서는 lauric acid 11.71%와 linolenic acid 11.06%가 주로 이용되었다. 한편, DGDG에서는 대조구의 경우 palmitic acid 45.93%와 linolenic acid 14.76%로 분석되었으나, copper chloride 처리구가 lauric acid 19.41%와 oleic acid 9.95%, nickel chloride 처리구는 linolenic acid 15.39%, linoleic acid 13.51%가 당지질 형성에 주로 이용되었다.

*B. subtilis*의 경우, 여러가지 당지질 생합성에 이용된 주요 지방산은 대조구의 MGDG에서는 palmitic acid 21.36%와 linolenic acid 11.86%로 나타났으나, copper chloride 처리구는 palmitic acid 28.92%, stearic acid 13.25%, nickel chloride 처리구에서 palmitic acid 35.16%, palmitoleic acid 12.47%, manganese chloride 처리구에서는 palmitic acid 15.73%와 lauric acid 11.88%가 주로 이용되었고, DGDG에서는 copper chloride 처리구가 palmitic acid 34.19%, linoleic acid 17.45%, nickel chloride 처리구가 palmitoleic acid 10.30%, myristic acid 7.81%, manganese chloride 처리구는 lauric acid 11.16%, myristic acid 8.65%가 당지질 형성에 주로 이용되었다.

참고문헌

- Vallee, B. and Ulmer, D. D. : Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. *Ann. Rev. Biochem.* **41**, 91-128, 1972.
- Nieboer, E. and Richardson, D. H. S. : The replacement of the nondescript term "heavy metal" by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environ. Pollution* **1**, 3-26, 1980.
- Song, H. I. and Yu, T. S. : Morphological changes of *hansenula anomala* B-7 by cadmium ion. *Kor. J. Microbiol.* **29**(6), 397-401, 1991.
- Dilley, R. A. and Rothstein, A. : Chloroplast membrane characteristics. *Biochim. Biophys. Acta* **135**, 427-443, 1967.

- 5) Park, I. H. : Effects of cupric ion on the PSII activity in isolated chinese cabbage chloroplasts. *Korean J. Bot.* **30**(3), 181-187, 1987.
- 6) Van Steveninck, J. and Booij, H. L. : The role of polyphosphate in the transport mechanism of glucose in yeast cells. *J. Gen. Physiol.* **48**, 43-59, 1964.
- 7) Choi, M. J., Kim Y. M. and Kim, W. S. : Influence of some metal ions on the cellulase activity. *Kor. J. Microbiol.* **14**, 75-83, 1976.
- 8) Kim, W. S. and Lee, S. J. : Investigation of cellulase of microbrial origin [1]. Studies on some properties of cellulase isolated form *Alternaria* sp. *Ibid* **14**, 65-74, 1976.
- 9) Umeda, M. and Nishimura, M. : Inducibility of chromosomal aberrations by metal compounds in cultured mammalian cells. *Mutation. Res.* **67**, 221-229, 1979.
- 10) Leonard, A. G., Gerber, G. B. and Jacquet, P. : Carcinogenicity, mutagenicity and teratogenecity of nickel. *Mutation Res.* **87**, 1-15, 1981.
- 11) Paton, G. R. and Allison, A. C. : Chromosome damage in human cell cultures induced by metal salts. *Mutation Res.* **16**, 332-336, 1972.
- 12) Ma, H. Y. and Lee, C. S. : The Biosynthesis of phospholipid and Fatty Acid Composition in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*-on the effects of various metal compounds. Thesis of Master. in Microbiology Sungshin Women's Univ., 1994.
- 13) Foster, P. L. : Copper exclusion as a mechanism of heavy metal tolerance in a green algae. *Nature* **269**, 322-323, 1977.
- 14) Vogel, H. J. and Bonner, D. M. : Acetylornithinase of *Escherichia coli* : partial purification and some properties. *J. Biol. Chem.* **218**, 98-106, 1956.
- 15) Radwan, S. S. and Mangold, H. K. : The lipids of plant tissue cultures. *Adv. Lipid Res.* **14**, 171-211, 1976.
- 16) Raetz, C. R. H. : Molecular genetics of membrane phospholipid synthesis. *Annu. Rev. Genet.* **20**, 253-295, 1986.
- 17) Erwin, J. and Bloch, K. : Biosynthesis of unsaturated fatty acids in microorganisms. *Science* **143**, 1006-1012, 1964.
- 18) Nichols, B. W., Stubbs, J. M., and James, A. T. : In "Biochemistry of Chloroplast" (T. W. Goodwin, ed.), Vol. 2, pp. 677-690. *Academic Press*, 1967.
- 19) Roughan, P. G. and Slack, C. R. : Cellular organization of glycerolipid metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **33**, 97-132, 1982.
- 20) Joyard, J. and Douce, R. : Galactolipid synthesis. In The Biochemistry of Plants. P. K. Stumpf(ed.,). Vol. 9. *Academic Press, New York*. pp. 215-274, 1987.
- 21) Smith, M. A., Cross, A. R., Jones, T. G., Griffiths, W. T., Stymene, S. and Stobart, K. : Electron-transport components of the 1-acyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine Δ^{12} -desaturase (Δ^{12} -desaturase) in microsomal preparations from developing safflower (*Carthamus tinctorius* L.) cotyledons. *Biochem. J.* **272**, 23-29, 1990.
- 22) Kearns, E. V., Hugly, S. and Somerville, C. R. : The role of cytochrome b₅ in Δ^{12} desaturation of oleic acid by microsomes of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Arch. Biochem. Biophys.* **284**, 431-436, 1991.
- 23) Cho, S. H. and Thompson, G. A., Jr. : On the metabolic relationship between monogalactosyldiacylglycerol and digalactosyldiacylglycerol molecular species in *Duna liella sallna*. *J. Biol. Chem.*, **262**, 7585-7593, 1987.
- 24) Giroud, C. and Eichenberger, W. : Lipids of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant cell physiology*, **30**, 121-128, 1989.
- 25) Heemskerk, J. W. M., Schmidt, H., Hammer, U. and Heinz, E. : Biosynthesis and desaturation of prokaryotic galactolipids in leaves and isolated chloroplasts from spinach. *Plant physiol.* **96**, 144-152, 1991.
- 26) Park, H. K., Kwon, Y. M. : Effects of cupric sulfate on the chlorophyll fluorescence in isolated chloroplasts from chinse cabbage, *Korean Biochem.*, **19**, 207-212, 1987.
- 27) Chun, H. S., Kwon, Y. M. and Lee, C. B. : Comparision of toxic effects of mercury, copper and zinc on photosystem II of Borley chloroplasts. *Korean J. Bot.* **36**(3), 195-201, 1993.
- 28) Chapman, D. J. De-Felice and Barber, J. : Growth temperature effects on thylakoid membrane lipid and protein content of Pea chloroplast. *Plant Physiol.* **72**, 225-228, 1983.
- 29) Murphy, D. J. and Woodrow, J. E. : Lateral heterogeneity in the distribution of thylakoid membrane lipid and protein components and its implication for the molecular organization of photosynthetic membranes. *Biochim. Biophys. Acta.*, **725**, 104-112, 1983.

- 30) Bednarz, J., Radunz, A. and Schmid, G. H. : Lipid composition of photosystem I and II in the tobacco mutant *Nicotiana tabacum* NC 95. *Z. Naturforsch.*, **43C**, 423-430, 1988.
- 31) Sastry, P. S. and Kates, M. : The structural role of lipids in photosynthetic membranes. *Biochemistry*, **3**, 1271-1280, 1964.
- 32) O'Brien, J. S. and Benson, A. A. : Glycerolipid synthesis in leaves. *J. Lipid Res.*, **5**, 432-436. 1964.
- 33) Jamieson, G. R. and Reid, E. H. : In Phytochemistry.: Tightly bound sulfolipids in chloroplast $\text{CF}_0\text{-CF}_1$. **8**, 1489-1494, 1969.
- 34) Douce, R. and Joyard, J. : In the Biochemistry of Plants. lipids: Structure and Function C.P.K. Stumpf, ed.), Vol. 4, pp. 321-362. *Academic Press, New York*, 1980.
- 35) Viljoen, B. C., Kock, J. C. F. and Lategan, P. M.: The influence of culture age on the cellular fatty acid composition of four selected yeasts. *J. Gen. Microbiol.*, **132**, 1895-1898, 1986.
- 36) Henry, S. and Halvorson, H. I. : Lipid synthesis during sporulation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, **114**, 1158-1163, 1973.
- 37) McGarry, J. T. and Armstrong, J. B. : The effects of salt on phospholipid fatty acid composition in *Escherichia coli* K-12. *Biochim. Biophys. Acta.*, **398**, 258-264, 1975.
- 38) Kaneda, T. and Simth, E. J. : Relationship of Primer specificity of fatty acid *de novo* synthesis to fatty acid composition co species of bacteria and yeasts. *Can J. microbil.*, **26**, 893-898, 1980.
- 39) Moss, C. W., Samuels, S. B., Liddle, J and McKinney, R. M. : Occurrence of branched-chain hydroxy fatty acid in *Pseudomonas maltophilia*. *J. Bacteriol.*, **114**, 1018-1024, 1973.
- 40) Kaneda : Fatty acids of the genus *Bacillus*; an example of branched-chain preference *Bacteriol. Rev.*, **41**, 391-418, 1977.
- 41) Tuner, J. D and rouser, G : Precise quantitative determination of human blood lipids by thin-layer and triethylamino ethylcellulose column chromatography; II plasma lipids. *Anol Biochem*, **38**, 437-445, 1970.
- 42) Bligh, E. C and Dyer, W. J. : A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911-917, 1959.
- 43) Allen, C. F and Good, P. : Acyl lipids in photosynthetic system. *Method Enzymol.*, **23**, 523-547, 1971.