

본 실험에서는 PAL 역가를 지닌 *Rhodotorula glutinis*를 사용하여 trans-cinnamic acid로 부터 L-phenylalanine 생산시의 반응 최적 조건을 검토하였으며, 또한 최적 조건하에서 L-phenylalanine 생산량 증가를 위하여 비수용성 유기용매의 사용 효과를 검토하였다.

실험재료 및 방법

1. 사용균주

본 실험에 사용한 균주는 효모인 *Rhodotorula glutinis* IFO 0559로서 한국 종균 협회에서 구입한 것을 사용하였다.

2. 배 지

전 배양 배지는 Yamada¹⁵⁾ 등의 방법에 준하였으며, 본 배양 배지는 전 배양 배지에 0.5% isoleucine이 첨가된 배지를 사용하였다. 또한 균주의 보관에는 전 배양 배지에 1.5% 환천이 포함된 평판 배지 및 사면 배지를 사용하였다.

3. 실험방법

1) 균체배양 및 반응 균체의 제조

공시 균주를 한천 평판 배지에 한 백금니 접종하여 30°C에서 24시간 배양하였다. 배양후 한 균락으로부터 한 백금니를 취하여 50ml의 전 배양 배지를 함유하는 250ml 용 삼각 플라스크에 접종하여 30°C에서 24시간 전 배양하였다.

본 배양은 본 배양배지 1l와 silicon oil을 0.001% 지닌 5l 용 플라스크에 전 배양액 10ml를 접종하여 30°C에서 16시간 동안 교반 배양하였다. 반응 균체는 상기 배양액을 4°C에서 원심분리(5000 rpm 20분)하여 수확하였으며, 수확후 냉동건조하여 -70°C 냉동고에 보관하면서 필요시마다 사용하였다.

2) 균체량 측정

PAL의 specific activity를 측정하는 실험에서 균체의 혼탁도와 생균체량과의 관계를 알기 위하여 상기에서 수확된 균체를 증류수에 현탁시켜 660nm에서 spectrophotometer를 사용하여 혼탁도를 측정하였으며, 이 용액 10ml를 취하여 4°C에서 원심분리하여 상등액을 버린 후, 생균체 무게를 측정하였다.

3) 효소 활성의 측정

PAL의 활성은 Yamada 등¹⁵⁾의 방법을 약간 변

형하여 측정하였다. 즉, 배양액 1ml을 12,000rpm에서 5분간 원심분리하여 회수한 균체를 0.01% cetylpyridinium chloride을 함유하는 50mM tris-HCl 완충용액(pH 8.8) 2.5ml에 현탁시킨 후, 50mM L-phenylalanine 용액 2.5ml을 첨가하였다. 이 반응액을 30°C에서 10분간 반응시킨 후, 6N HCl 0.1ml을 가하여 반응을 중지하였다. 상기 반응액을 원심분리한 후, 상등액을 취하여 L-phenylalanine으로부터 생성된 trans-cinnamic acid 농도를 Evans 등¹⁶⁾의 방법에 따라 spectrophotometer를 사용하여 278nm에서 흡광도를 측정하였다. PAL의 1 unit는 1분당 생성된 1μmole의 trans-cinnamic acid로 정의하였으며, 1 unit의 specific activity는 분당 생균체당(mg) 생성된 1μmole의 trans-cinnamic acid로 정의하였다.

4) trans-cinnamic acid로 부터 L-phenylalanine 생산시의 반응 조건

trans-cinnamic acid로 부터 L-phenylalanine을 생산하기 위한 표준 조건은 다음과 같았으며 각각의 실험때마다 반응 조건의 성분을 변화하였다. 즉 반응 표준용액 조건으로는 200mM trans-cinnamic acid, 4M NH₄OH, 250mM (NH₄)₂SO₄ 및 0.005% cetylpyridinium chloride을 지닌 반응액에 H₂SO₄을 첨가하여 pH를 10.5로 조정한 후, PAL 효소의 source로서 냉동 건조된 균체를 20mg/ml 첨가하여 37°C에서 진탕(100 strokes/min)하면서 L-phenylalanine 생산 반응을 수행하였다. 반응이 진행되는 동안 일정 시간마다 반응액을 적량 취하여 원심분리(12,000rpm, 5분)한 후, 상등액을 취하여 L-phenylalanine을 정량하였다.

5) L-phenylalanine의 정성과 정량

반응액중에 생성된 L-phenylalanine의 정성과 정량을 위하여 paper chromatography 방법¹⁷⁾과 HPLC 방법¹⁸⁾을 사용하였다.

결과 및 고찰

1. 균체 생육시간에 따른 PAL 효소의 활성 변화

PAL의 활성이 높은 생균체를 얻기 위하여 배양 시간에 따른 PAL 효소의 활성을 조사하였으며, 그 결과를 Fig. 1에서 보여주고 있다. Fig. 1은 공시 균주의 성장 곡선, PAL 효소의 활성 및 pH 변화를 나타낸 것으로 최대 비증식 속도(μ max)는 0.36h⁻¹ 이었으며, 증배시간(td)은 1.93h 이었다. 또한 PAL의 활성이 가장 높은 시점은 균체 성장의

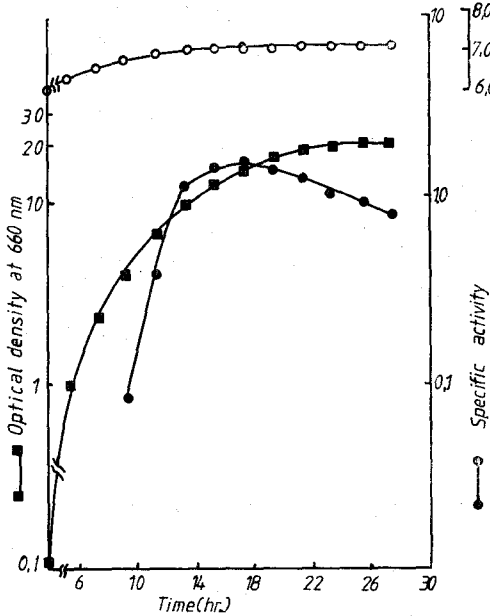


Fig. 1. Growth curve of *Rhodotorula glutinis* and specific activity of phenylalanine ammonia-lyase.

대수기로부터 정상기로 전환되는 배양 16시간 후였으며 specific activity는 1.57이었다.

이와 같은 결과는 PAL 효소 활성이 균체 증식과 연관을 갖고 증가하는 것을 보여준다. pH 변화는 초기에는 6.0이었으나, 배양 12시간까지는 서서히 증가하여 pH 7.0에 도달하였으며 그 이후는 변화가 없었다.

2. L-Phenylalanine 생산에 미치는 trans-cinnamic acid 농도의 영향

L-phenylalanine 생산에 미치는 기질 농도의 영향을 검토하기 위하여 반응 용액에 서로 다른 농도의 trans-cinnamic acid를 사용하였다. 본 결과는 Fig. 2에서 보여주고 있다. 즉, Fig. 2에서 볼 수 있는 바와 같이 trans-cinnamic acid 농도가 25mM 되었을 때 상대 전환율이 최고치에 이르렀으며, 25mM 이상 사용되었을 때에는 상대 전환율이 감소하는 경향을 나타내었다. 그러나, 최대 L-phenylalanine 생산은 200mM trans-cinnamic acid를 사용하였을 때였다.

3. L-Phenylalanine 생산에 미치는 ammonium sulfate 농도의 영향

Ammonium sulfate는 PAL에 의하여 L-phen-

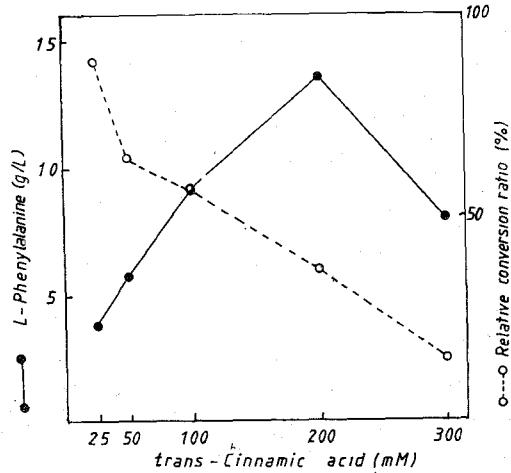


Fig. 2. Effect of trans-cinnamic acid concentration on the production of L-phenylalanine. Reaction was carried out at 37°C for 24hr.

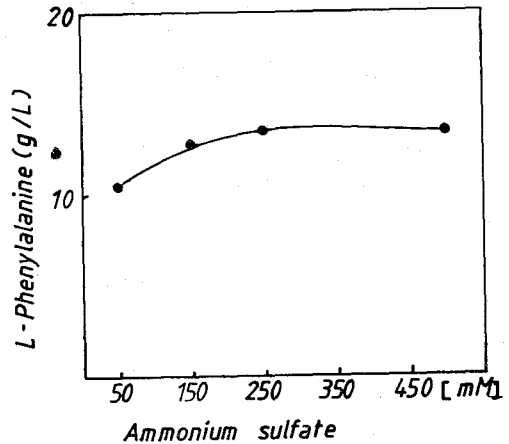


Fig. 3. Effect of ammonium sulfate concentration on the production of L-phenylalanine. Reaction was carried out at 37°C for 24hr.

ylalanine을 생산할 때, trans-cinnamic acid와 마찬가지로 기질로 사용되며, 또한 안정제로도 사용된다.¹⁴⁾ 서로 다른 ammonium sulfate 농도가 L-phenylalanine의 생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 ammonium sulfate의 농도를 50mM에서부터 500mM까지 변화시켰다.

Fig. 3은 본 실험의 결과를 나타낸 것이며 Fig. 3에서 볼 수 있는 바와 같이 ammonium sulfate 농도가 250mM 사용되었을 때 최대의 L-phenylalanine 생산을 나타내었다.

4. L-Phenylalanine 생산에 미치는 pH의 영향

trans-cinnamic acid로부터 L-phenylalanine을 생산할 때에 PAL의 최적 pH를 검토하기 위하여

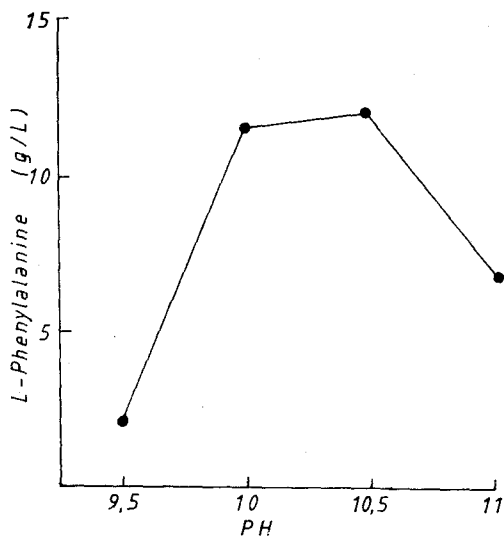


Fig. 4. Effect of pH on the production of L-phenylalanine. Reaction was carried out at 37°C for 24hr.

Table 1. Effect of the various non-aqueous organic solvents on the production of L-phenylalanine

Solvents	L-Phenylalanine (g/L)
Petroleum ether	13.2
Hexane	12.0
Heptane	10.0
Cyclohexane	10.3
Ether	3.1
Benzene	4.0
Toluene	8.5
Xylene	0.45
None	10.8

* Reaction was carried out at 37°C for 24hr.

Table 2. Effect of ratio of non-aqueous solvents to reaction mixture on the production of L-phenylalanine

Solvents	Solvents (V) Reaction mixture (V)	L-Phenylalanine (g/l)	Relative L-phenylalanine yield (%)
None		10.8	100
Petroleum ether	0.5	10.8	100
	1.0	13.2	122
	3.0	12.7	118
	7.0	11.0	102
Hexane	0.5	10.1	94
	1.0	12.0	110
	3.0	11.0	102
	7.0	10.3	95
Heptane	0.5	8.0	79
	1.0	10.0	93
	3.0	9.5	88
	7.0	8.5	79
Cyclohexane	0.5	9.0	83
	1.0	10.3	95
	3.0	10.8	100
	7.0	9.7	90

* Reaction was carried out at 37°C for 24hr

pH를 9.5에서 11.0까지 변화하였다. Fig. 4는 본 실험의 결과를 나타낸 것이며, Fig. 4에서 볼 수 있는 바와 같이 pH 9.5에서 10.5 사이에서는 L-phenylalanine 생산이 증가하는 추세를 보였으나, pH 10.5 이상에서는 급격히 감소하는 경향을 나타내었다. 또한 pH 10.5에서는 L-phenylalanine 생산이 가장 높은 값을 나타내었다.

5. L-Phenylalanine 생산에 미치는 비수용성 유기용매의 효과

trans-cinnamic acid로부터 L-phenylalanine을 생산시에 비수용성 유기용매의 첨가 효과를 검토하였다. 이 때 사용된 반응액의 조성은 실험방법에 기술한 표준 반응액이었으며, 반응액과 비수용성 유기용매의 양은 1 : 1이었다. 본 실험의 결과는 Table 1에 나타난 바와 같으며 petroleum ether를 사용하였을 때에 수율이 가장 많이 증가하였으며, 그 다음으로 수율이 향상된 것은 hexane을 사용하였을 때였다. 그러나 다른 비수용성 유기용매를 사용하였을 경우에는 비수용성 유기용매를 사용하지 않았을 때와 거의 같은 수율을 나타내거나 훨씬 낮은 수율을 나타내었다.

상기의 실험에서 L-phenylalanine의 수율의 증가를 나타낸 petroleum ether, hexane과 이외에도 heptane, cyclohexane의 서로 다른 농도가 L-phenylalanine 생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 비수용성 유기용매의 사용 농도비를 변화시켰다. Table 2에서 볼 수 있는 바와 같이 petroleum ether의 경우에는 petroleum/반응액의 비율을 1.0로 사용했을 경우에 L-phenylalanine 수율이 22% 정도 증가하였다. 또한 hexane의 경우도 반응액과 1 : 1로 첨가하였을 때 L-phenylalanine 수율이 10% 정도 증가하였다.

6. 최적 조건에서 trans-cinnamic acid 로 부터 L-phenylalanine 생산

상기 실험결과들로부터 L-phenylalanine의 생산에 사용되는 최적 반응 용액은 200mM trans-cinnamic acid, 4M NH₄OH, 250mM (NH₄)₂SO₄, 및 0.005% cetylpyrimidinium chloride (pH 10.5)이었다. 상기 반응액에 petroleum ether를 1 : 1로 섞어 사용하였으며, 반응액 1ml 당 dry cell 50mg을 첨가하고 반응시간에 따른 L-phenylalanine 생산의 증가를 시도하였다.

Fig. 5에서 볼 수 있는 바와 같이 반응 12시간

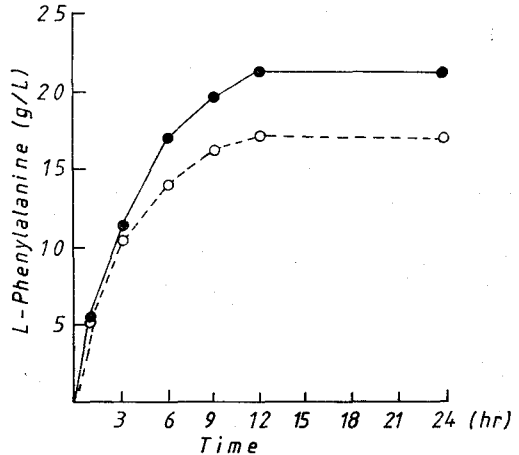


Fig. 5. Time course of the production of L-phenylalanine by *Rhodotorula glutinis*

후에는 L-phenylalanine 생산량이 거의 증가하지 않았다. 이 때의 trans-cinnamic acid로부터 L-phenylalanine으로의 전환율은 63.9%이었다.

초 록

Rhodotorula glutinis IFO 0559에 의한 trans-cinnamic acid와 암모니아로부터 L-Phenylalanine 생산의 최적 조건을 검토하였다. L-phenylalanine 생산은 반응액으로 200mM trans-cinnamic acid, 4M NH₄OH, 250mM (NH₄)₂SO₄, 0.005% cetylpyridinium chloride (pH 10.5), 50mg/ml 건조균체를 사용하였을 때 최대 생산량을 나타내었다. 비수용성 유기용매중에서 petroleum ether가 가장 효과적인 유기용매이었으며 반응액에 50% 첨가시 가장 효과가 좋았다. 최적 반응조건하에서 12시간 반응후 L-phenylalanine이 21.1g 생성되었으며, 이때의 trans-cinnamic acid의 전환율은 63.9%이었다.

참 고 문 헌

1. 相田浩, 瀧波弘一, 千畑一郎, 中山清, 山田秀明 : In 'アミノ酸發酵,' 學會 出版センター (1986)
2. Zucker, M.: Plant Physiol., 40 : 779(1965)
3. Tanaka, Y., and Uritani, I.: J. Biochem., 81 : 963(1977)
4. Koukol, J., and Conn, E.E.: J. Biol. Chem.,

- 236 : 2692(1961)
5. Fritz, R.R., Hodgins, D.S., and Abell, C.W.: J. Biol. Chem., 251 : 4646(1976)
 6. Hodgins, D.S.: J. Biol. Chem., 246 : 2977(1971)
 7. Kalghatgi, K.K., and Subba Rao, P.V.: Biochem. J., 149 : 65(1975)
 8. Bezanson, G.S., Desaty, D., Emes, A.V. and Vining, L.C.: Can. J. Microbiol., 16 : 147 (1970)
 9. Parkhurst, J.R., and Hodgins, D.S.: Phytochemistry, 10 : 2997(1971)
 10. Havir, E.A., and Hanson, K.R.: In 'Method in Enzymology XVII, PART A.', Academic Press, N.Y. and London (1971)
 11. Sikora, L.A., and Marzluf, G.A.: J. Bacterio., 150 : 1287(1982)
 12. Zaks, A., and Klivanov, A.M.: Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 82 : 192(1985)
 13. Fukui, S., and Tanaka, A.: In Endeavour New Series, 9(1) : (1985)
 14. Evans, C.T., Dayle, C., Kim, H., Wendy, P., Christin, C., and Masanaru, M.: Appl. Microbiol. Biotechnol., 25 : 399(1987)
 15. Yamada, Y., Nabe, K., Izuo N., Nakamichi, K. and Chibata, I.: Appl. Environ. Microbiol., 42 : 773(1981)
 16. Evans, C.T., Kim, H., Dayle, C., Wendy, P. and Masanaru, M.: Appl. Microbiol. Biotechnol., 25 : 406(1987)
 17. Tochikura, T., Tachiki, T., Nakahama, K., Baich, A., and Cheldelin, V.H.: Agric. Biol. Chem., 37 : 1161(1973)
 18. Kang, B.K., Choi, J.Y., and Chung, K.M.: Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng., 15 : 80(1987)