

D,L-ATC로부터 L-Cysteine으로의 Bioconversion에 관여하는 효소의 특성

류옥희 · 신철수*

연세대학교 식품공학과

Enzymatic Characteristics in the Bioconversion of D,L-ATC to L-Cysteine

Ryu, Ok-Hee and Chul-Soo Shin*

Department of Food Engineering, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

The bioconversion of D,L-2-aminothiazoline-4-carboxylic acid (D,L-ATC) to L-cysteine was investigated. After the intracellular enzyme of a *Pseudomonas* species was inducibly formed by addition of D,L-ATC in the middle of culture, the cells were isolated and treated with sonication to prepare the crude enzyme solution. The results indicated that the cysteine was produced only in the form of L-isomer from D,L-ATC and its production could be enhanced several tens times by addition of manganese ions which were required as a cofactor in this enzymatic reaction. Besides, this reaction suffered from the feedback inhibition of L-cysteine. On the other hand, since L-cysteine-decomposing enzyme coexisted in the crude enzyme solution, most of the L-cysteine formed disappeared in the absence of its inhibitor. However, hydroxylamine was found to be a potent inhibitor which could successfully prevent the decomposition of L-cysteine.

L-cysteine은 황 함유 아미노산이며 용도로는 간장 약, 해독제 등의 의약품과 화장품, 식품 등의 첨가물로 이용되고 있다. 지금까지 L-cysteine의 산업적 생산은 주로 머리카락이나 동물의 털 등을 산이나 알칼리로 가수분해하여 얻는 방법에 주로 의존하여 왔다. 그러나 이들 방법은 수율이 7-8%로 낮을 뿐만 아니라 폐기물 처리 등의 문제가 있다(1).

다른 방법으로는 화학적으로 cysteine을 합성하는 것인데 여러 단계의 화학반응을 거쳐 D,L-cysteine을 생성하게 된다. 이 경우, D,L-형의 광학적 이성체가 공존하기 때문에 이들을 분리하여 L-형만을 얻는 것은 용이하지 않다(2-6).

한편, 10여년 전부터 화학적 및 생물학적인 방법을

병행하여 L-cysteine만을 얻는 방법이 보고되어 왔다. 즉, 화학적으로 D,L-2-aminothiazoline-4-carboxylic acid(D,L-ATC)를 합성한 후, 세균이 생산하는 효소를 이용하여 L-cysteine으로 bioconversion시키는 방법이다(7-9).

본 연구에서는 D,L-ATC를 기질로 하고 세균이 생산하는 효소를 이용하여 L-cysteine을 생성시키는 반응의 특성과 아울러 이에 관여되는 중요 영향인자에 대해 살펴보았다.

재료 및 방법

사용균주

Pseudomonas species로 D,L-2-aminothiazoline-4-carboxylic acid(D,L-ATC)로부터 cysteine의 생성능을 가지고 있으며, 토양으로부터 분리된 후 유도된

Key words: L-cysteine, D,L-ATC, bioconversion

*Corresponding author

UV-변이주 중에서 효소활성이 가장 높은 *Pseudomonas* sp. CU6가 이용되었다.

균체배양

균체배양은 25 ml의 배지 B를 250 ml 삼각플라스크에 넣고 살균한 후 slant로부터 한 백금이 접종하고, 30°C에서 하룻밤 진탕배양하였다. 본 배양은 위의 배양액 4 ml를 50 ml의 배지 B를 함유하고 있는 500 ml 삼각플라스크에 접종하여 호기적 조건하에 30°C에서 4시간 진탕배양 후, 균체 내에 효소의 유도생산을 위하여 배양액에 0.15% 되게 D,L-ATC를 첨가하여 28°C에서 5시간 계속 진탕배양하였다.

조효소액의 제조

본 배양액을 일정량 취한 후 원심분리기(Hitachi PRP12)를 이용하여 (8,000 rpm, 10분간) 침전물인 균체를 취하고, 이를 0.1 M의 phosphate 완충액(pH 7.8)에 현탁시킨 후, 재원심분리를 수행하여 균체를 세척하였다. 이와 같이 얻은 균체를 sonication에 의해 파쇄하고 원심분리하여 얻은 상등액을 조효소액으로 이용하였다.

효소반응

D,L-ATC 기질용액은 1.5% D,L-ATC 및 1.0% KH_2PO_4 용액(pH 7.8) 1 ml에 150 mM의 hydroxylamine 용액 0.5 ml를 가하여 제조하였다. 위의 기질액 1.5 ml에 0.5 mM의 $MnSO_4$ 가 함유된 조효소액 1 ml를 가하여 33°C에서 6시간 반응시킨 후, 6 N HCl 용액 0.5 ml를 가하여 반응을 정지시켰다. 필요에 따라 hydroxylamine 용액 대신 0.1 M phosphate 완충액을 첨가하였다.

균체농도 측정

균체 배양액을 0.1 N HCl 용액으로 20배 희석하여 교반한 후, spectrophotometer(Shimadzu, UV-120-02)로 550 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

D,L-ATC의 정량

Thin layer chromatography(TLC)를 이용하였다. Micropipette(Drummond Scientific Co.)으로 반응액을 1 μ l 취하여 silicagel plate(Merck 제)에 spot 하고 용매(butanol : H_2O : acetic acid=4 : 1 : 1)로 전개시켜 건조시킨 후, 235 nm에서 TLC scanner(Shimadzu CS-9000)로 흡광도를 측정하여 표준 ATC 용액과

비교 정량하였다.

Cysteine의 정량

TLC 방법 : Cellulose plate에 반응 종료액을 spot 하고 용매(ethanol : H_2O : acetic acid : 28% ammonia water : CCl_3COOH =55 ml : 35 ml : 2 ml : 2 ml : 3.5g)로 전개시켜 건조시킨 후, 그 위에 0.1% ninhydrin spray reagent(Merck 제)를 분사하여 건조 발색시키고 560 nm에서 TLC scanner로 흡광도를 측정하여 정량하였다.

Spectrophotometer 방법 : Cysteine 정량은 Gaitonde법을 사용하였다(10). 반응 종료액을 적당히 희석하고 pH를 8.0-8.5로 조절하였다. 여기에 10 mol/ml의 DL-dithiothreitol 용액(DL-DTT, Sigma 제)을 동량 가하여 30분간 상온에서 방치하였다. 이 혼합용액 0.33 ml에 acetic acid와 ninhydrin 용액(acetic acid : 85% phosphoric acid : H_2O : ninhydrin=48 ml : 4 ml : 28 ml : 2g)을 각각 0.33 ml씩 가하여 10분간 가열하여 발색시킨 후, 이 용액을 4 ml의 ethanol로 희석한 후 spectrophotometer로 560 nm에서 흡광도를 측정하여 환산하였다.

결과 및 고찰

Cofactor로서 Mn 이온의 효과

효소반응에 중요한 영향을 미치는 것으로 알려진 무기질의 영향을 검토하기 위해 배지 A에서 균체를 배양하여 얻은 조효소액을 여러 종류의 무기질이 함유된 기

Table 1. Composition of media.

Media	Composition (w/v, %)
Medium A	2% Glucose 0.5% Yeast extract 0.5% Peptone 0.25% NaCl 0.1% KH_2PO_4 (pH 7.0 with NaOH)
Medium B	2% Glucose 0.5% Yeast extract 0.5% Peptone 0.25% NaCl 0.1% KH_2PO_4 0.05% $MgSO_4$ 0.0007% $FeSO_4$ (pH 7.0 with NaOH)

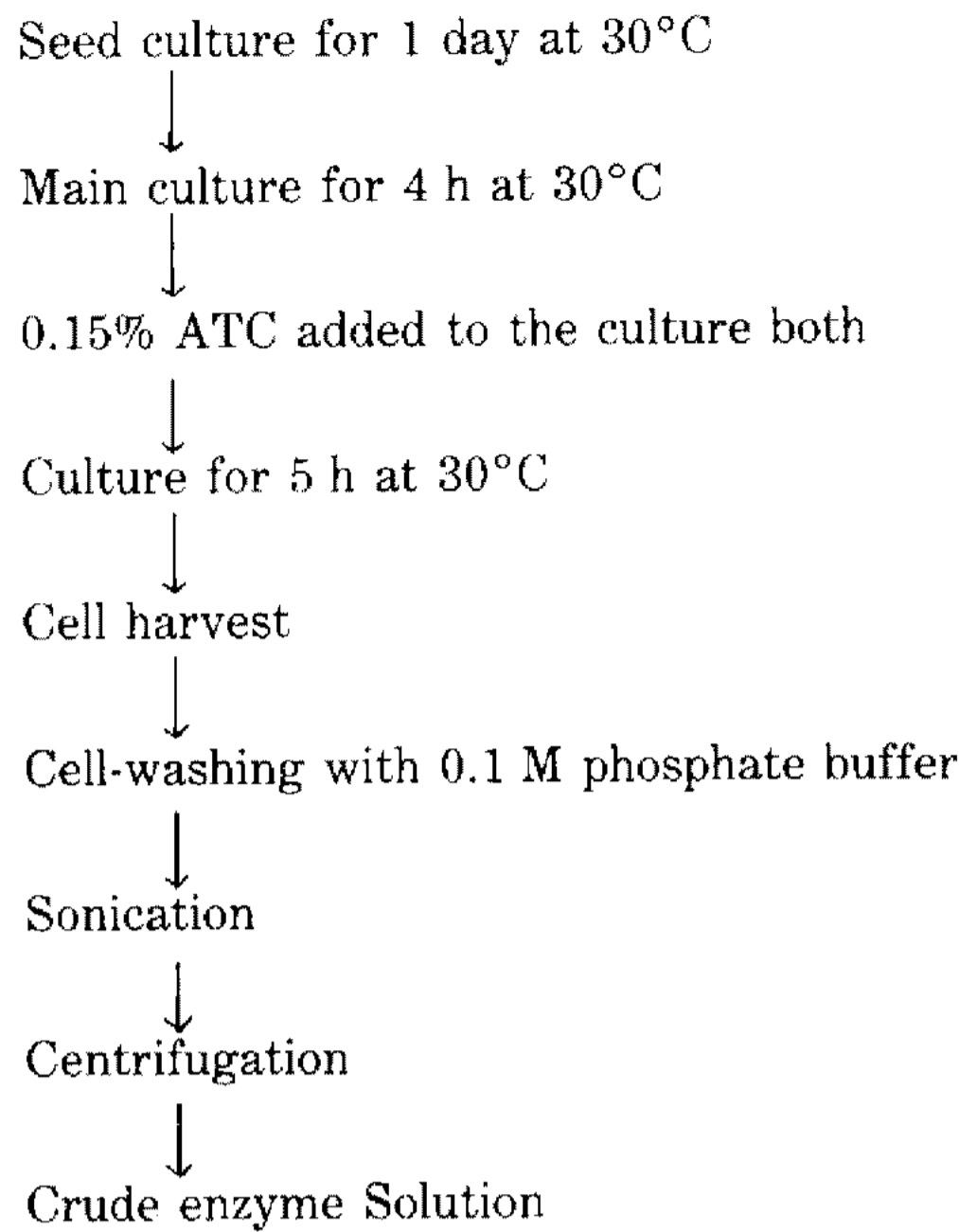


Fig. 1. The procedure for preparing the crude enzyme solution.

질용액에 첨가하여 33°C에서 6 시간 반응시켜 효소활성을 측정하였다(Fig.2).

Fig.2에서 보는 바와 같이 검정으로 나타낸 막대그림은 Mn 이온이 첨가되지 않은 상태에서 각각의 무기질이 첨가된 경우인데, 이 경우 cysteine의 생성은 거의 이루어지지 않았다. 그러나 이들 무기질과 아울러

Mn 이온이 첨가될 때(흰 막대그림) 대부분 cysteine의 생성은 급격히 증가되었다. 한편, CuSO₄와 ZnSO₄의 경우는 효소활성이 별로 증가되지 않았다. 이들 결과로부터 추론할 때, Mn 이온은 cysteine 생성에 관여하는 효소의 활성을 증대시키는 cofactor로서 작용한 것으로 사료되며, Cu나 Zn 이온은 효소저해제 내지는 이들 상승효과를 상쇄하는 작용을 나타내었다.

Yoshio 등의 결과(11)에 의하면 2가 금속이온 Fe⁺⁺, Ni⁺⁺, Co⁺⁺, Zn⁺⁺, Pt⁺⁺ 및 Ba⁺⁺을 반응 중에 10ppm 이상 첨가했을 때 효소활성을 80% 정도 증가시켰다는 보고를 하였는데 본 실험의 결과와는 상이함을 알 수 있다.

Cysteine 생성에 관여하는 효소반응에 대해 cofactor로서 작용하는 Mn 이온의 최적농도를 알아보기 위하여 반응액 중의 Mn 이온 농도를 달리하여 6 시간 반응시켜 생성된 cysteine 양으로 효소활성을 측정하였다(Fig.3). 그 결과, 효소활성은 Mn 이온의 농도가 0.05-5 mM의 범위에서 대체로 좋았으며, 0.1-0.5 mM에서 최대 효소활성을 보였다.

Cysteine 분해효소의 확인

배지 B에서 균체를 배양하여 효소액을 얻고 ATC 기질용액과 반응시킬 때 Fig.4의 검정 원으로 나타낸 바와 같이 cysteine이 생성된 후 시간이 경과함에 따라 점차 감소하였으며, molar yield 역시 50% 미만으

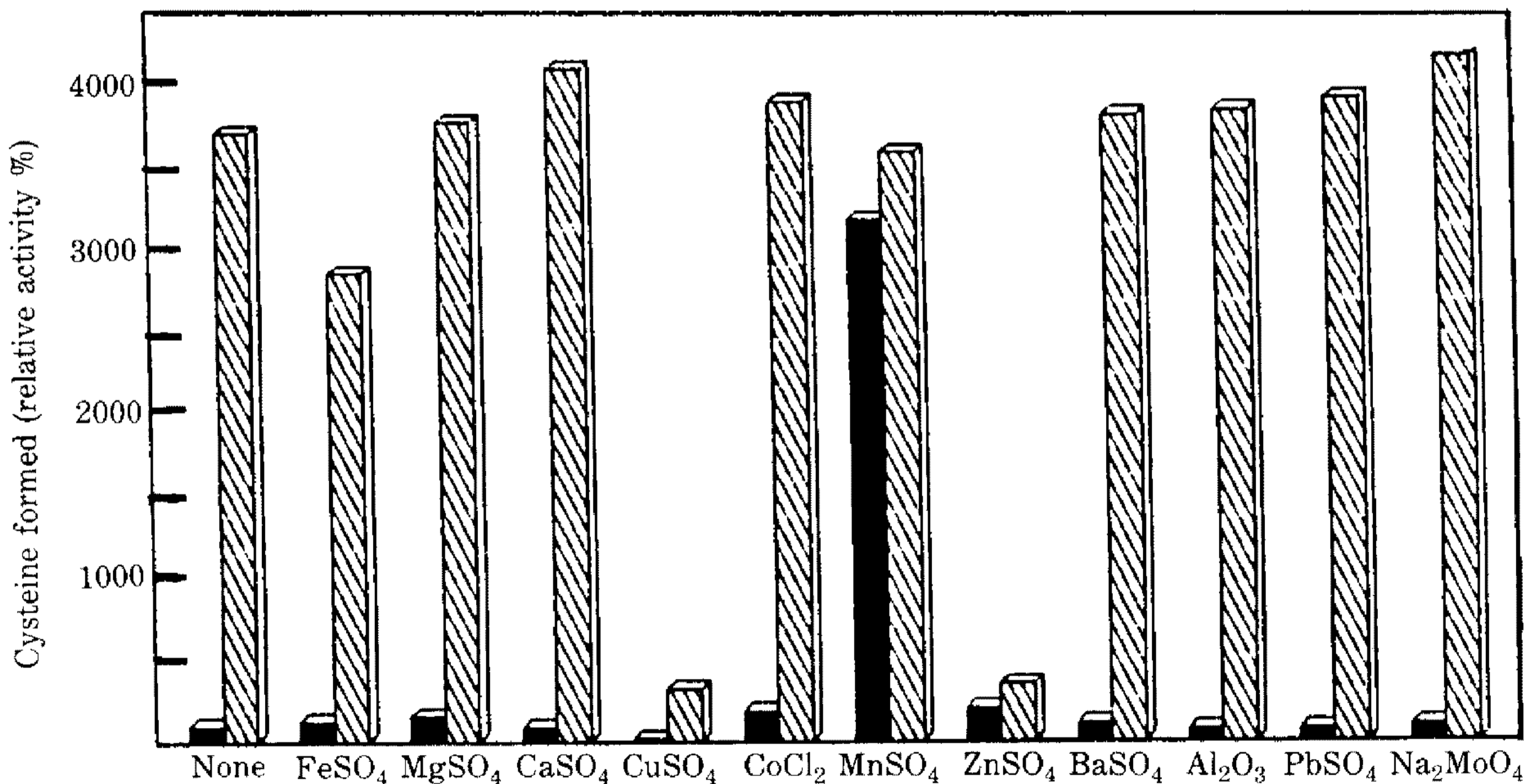


Fig. 2. Effect of mineral ions on the enzymatic conversion of D,L-ATC to L-cysteine.

■ : 0.5 mM manganate not added to the reaction mixture
 ▨ : 0.5 mM manganate added to the reaction mixture

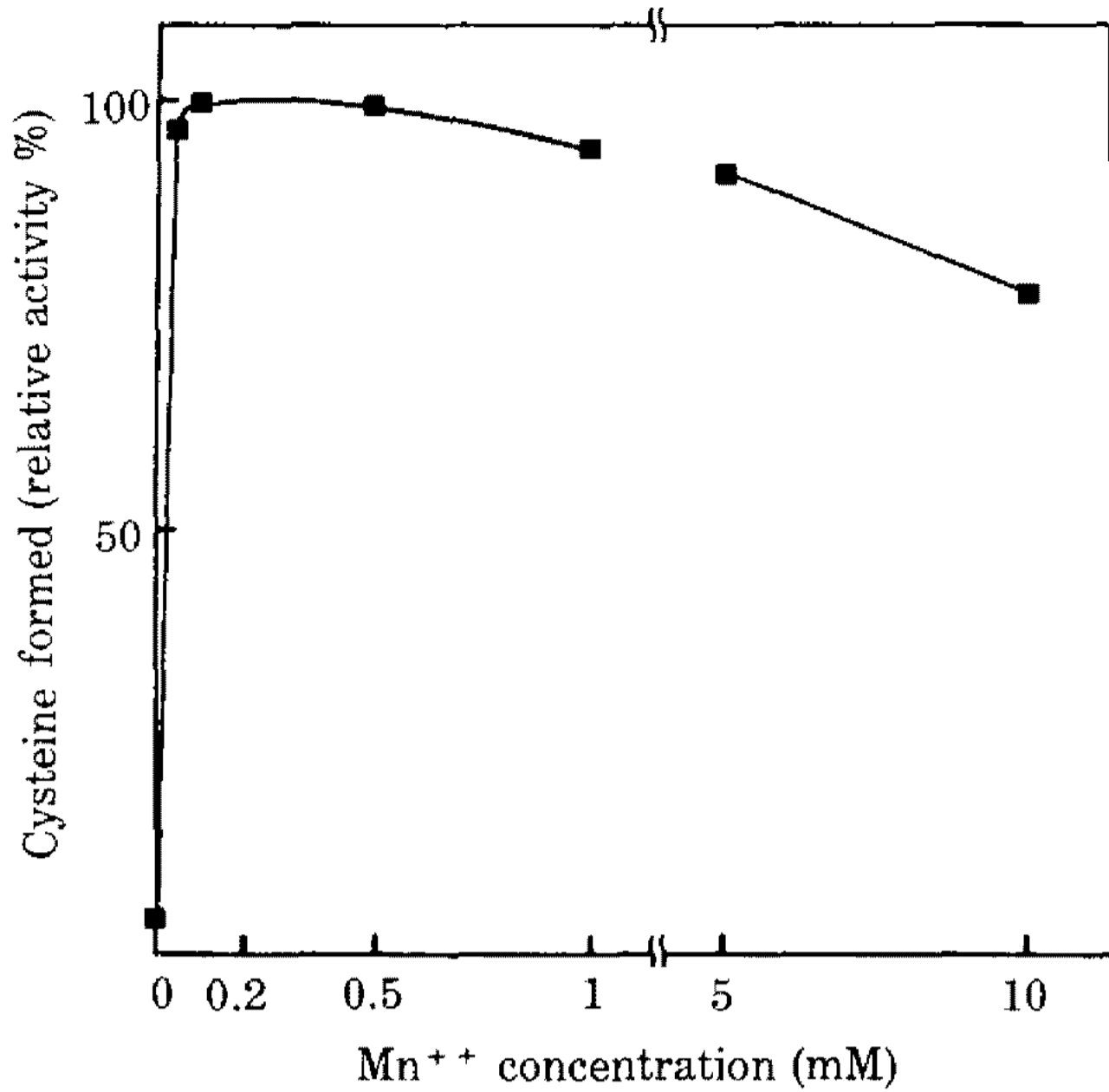


Fig. 3. Effect of the manganese concentration on the enzymatic conversion of D,L-ATC to L-cysteine.

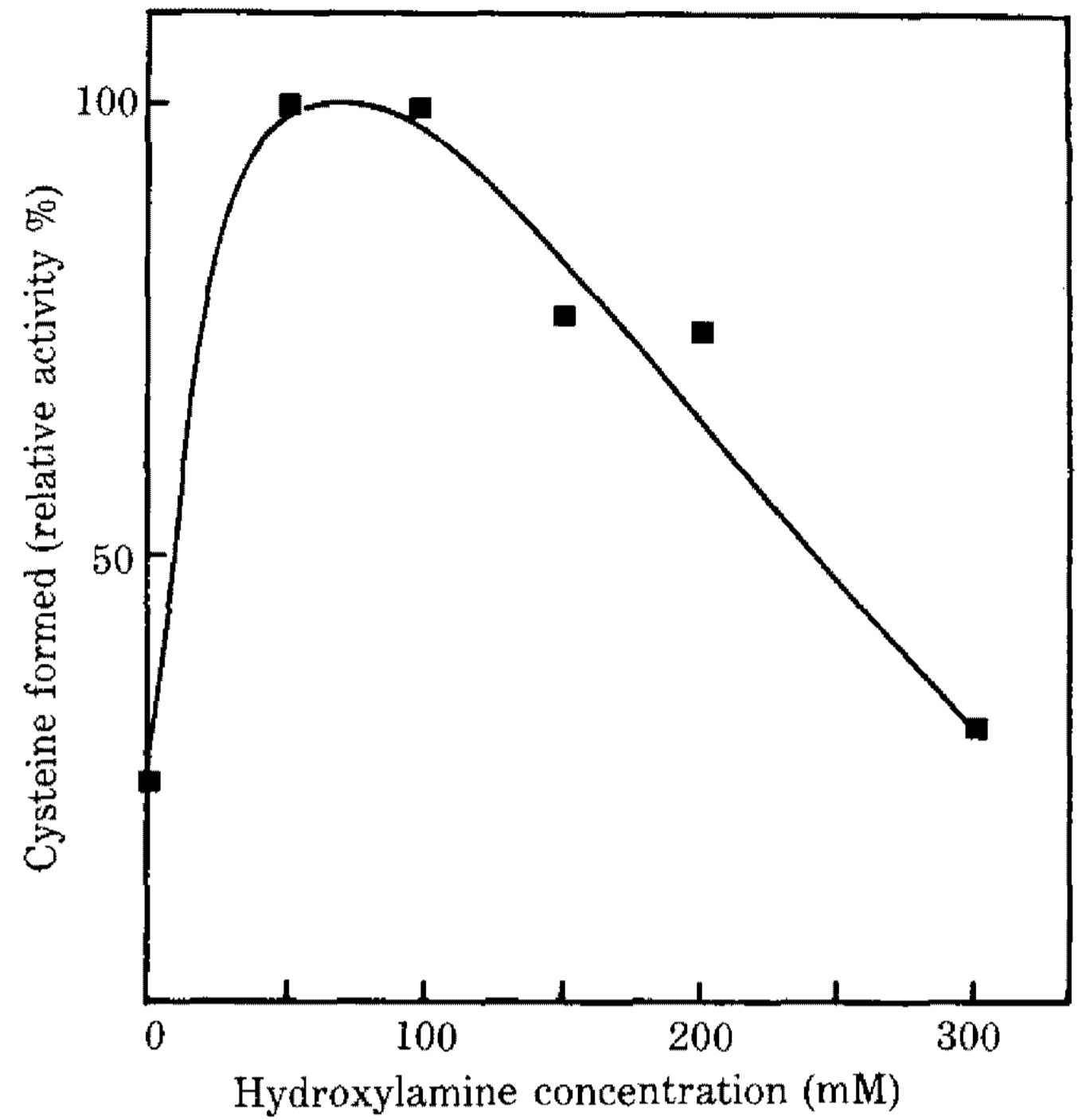


Fig. 5. Effect of the hydroxylamine concentration on the cysteine-forming reaction.

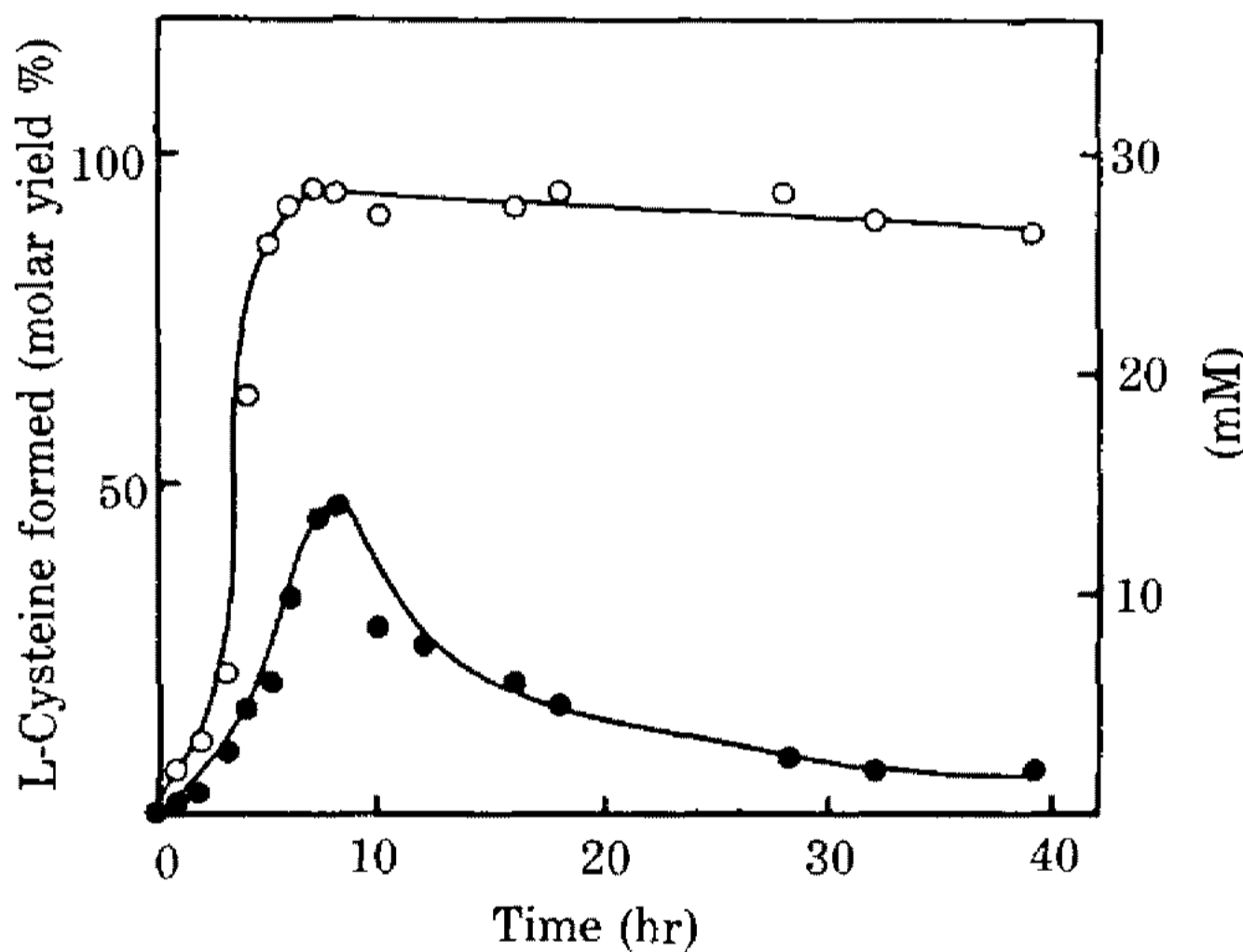


Fig. 4. Time course of the cysteine-forming reaction with or without hydroxylamine.

●: without hydroxylamine, ○: with 30 mM hydroxylamine

로 낮게 나타났다. 이 결과는 생성된 cysteine을 분해하는 효소가 존재함을 보여주는 것이다.

한편, 효소의 저해제로 알려진 hydroxylamine을 효소반응 전에 첨가하였다. Fig.4의 흰 원으로 나타낸 실험치로부터 알 수 있듯이 거의 100%에 가까운 molar yield가 얻어져 hydroxylamine이 cysteine 분해효소의 거의 완벽한 저해제임을 알 수 있었다.

1.5% ATC와 1.0% KH₂PO₄가 함유된 용액 1 ml에 각각 농도가 다른 hydroxylamine 용액을 0.5 ml 첨가하여 기질용액을 만들고, 이 용액에 조효소액 1

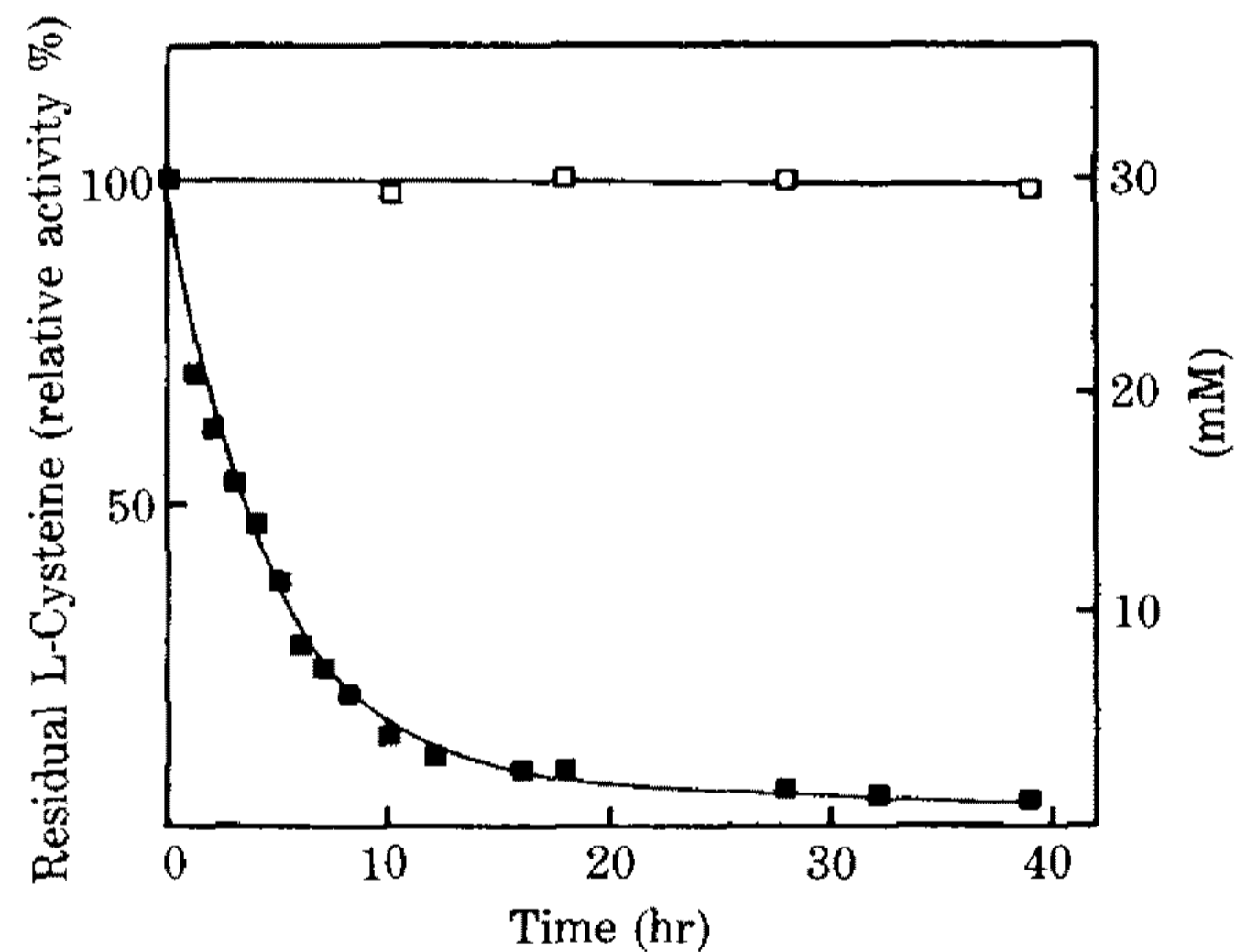


Fig. 6. Time course of the cysteine-decomposition with or without hydroxylamine.

■: without hydroxylamine, □: with 30 mM hydroxylamine

m/을 각각 첨가하여 6시간 반응시킨 후 효소활성을 측정하였다(Fig.5). Fig.5에서 보는 바와 같이 반응액 내의 hydroxylamine 농도가 50 mM 근처에서 최대의 효소활성을 나타냈으며, 그 농도가 더욱 증가될 때 저해효과가 나타났다.

한편, cysteine 분해효소를 재확인하는 방법으로 cysteine 기질에 조효소액을 첨가하여 반응시켰다. Fig.6에서 보는 바와 같이 효소 저해제인 hydroxyl-

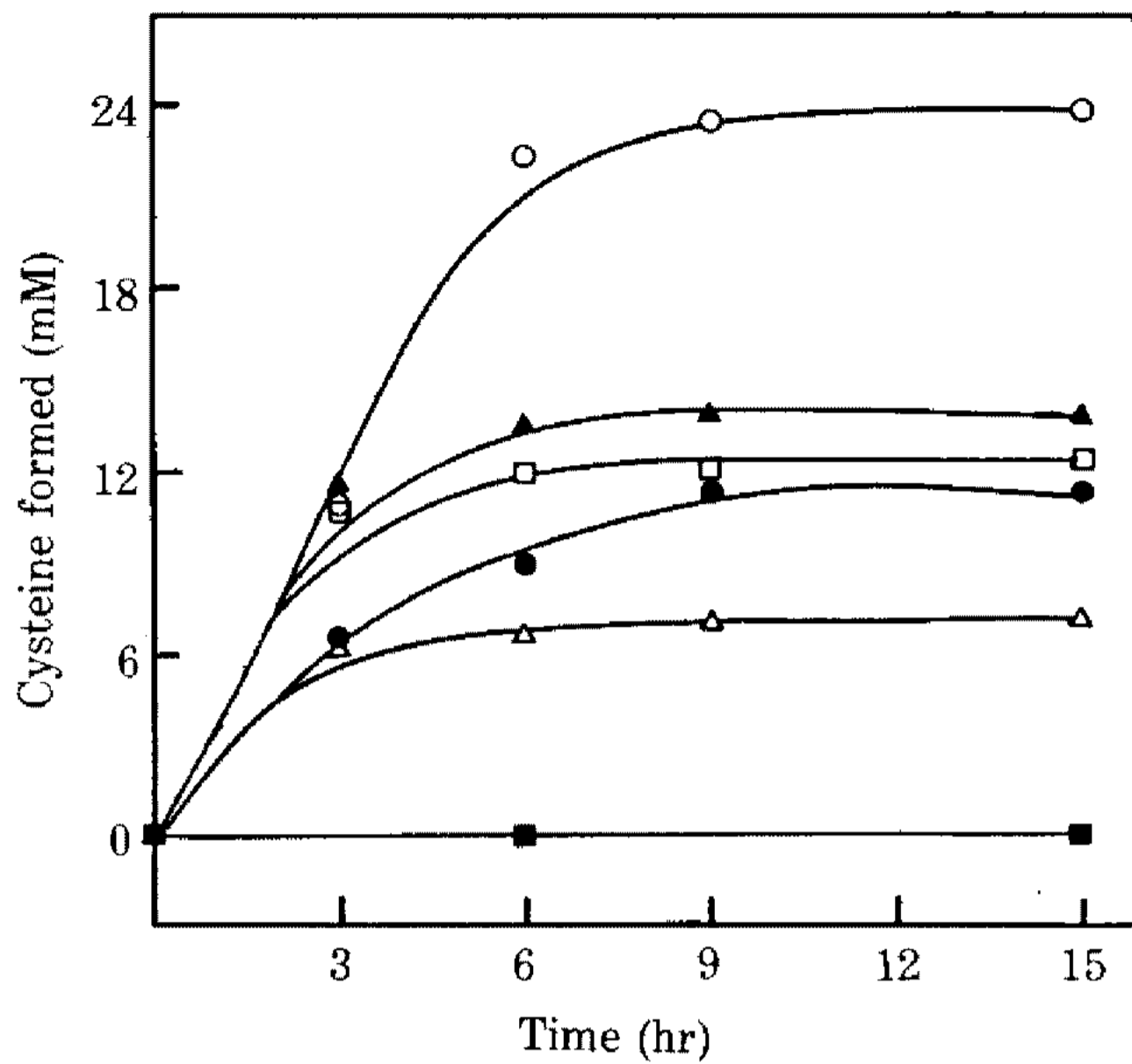


Fig. 7. The inhibition of L-cysteine on the cysteine-forming reaction.

○ : L-cysteine not added, ▲ : 6 mM L-cysteine, □ : 12 mM L-cysteine, ● : 18 mM L-cysteine, △ : 30 mM L-cysteine, ■ : 30 mM L-cysteine The L-cysteine was initially added to each reaction mixture.

ylamine 이 첨가되지 않았을 때 cysteine 은 급속히 분해되었으나, hydroxylamine 의 첨가시에는 cysteine 은 거의 분해되지 않았다.

효소반응에 대한 product inhibition

대부분의 아미노산 발효에 있어 최종 생성물에 의한 feedback inhibition 효과는 널리 알려져 왔다. 이 효과를 알아보기 위하여 ATC 기질용액에 이들 반응의 생성물인 cysteine 을 각각 다른 농도가 되게 첨가하여 효소반응을 진행시켰을 때 D,L-ATC 로부터 생성된 cysteine 의 양을 측정된 결과는 Fig.7 과 같다. 15 시간 반응 후, cysteine 을 전혀 첨가하지 않은 경우 24 mM 의 cysteine 을 생성하였지만, 초기 첨가된 cysteine 의 농도가 증가할수록 cysteine 의 생성량은 점차 줄어드는 경향을 보였다. 이들 결과로부터 cysteine 의 생성에 관여하는 효소반응은 생성물인 cysteine 에 의해 product inhibition 을 받고 있음을 나타내었다.

생성된 cysteine 의 광학활성도

ATC 기질용액을 효소반응에 의해 잔존한 ATC 가 전부 사라질 때까지 계속 반응을 진행시킨 후, 통기적인 조건하에서 cysteine 을 cystine 으로 산화시켰다. 이로부터 cysteine 을 분리하여 1N HCl 용액에 용해시

Table 2. Comparison of the cystine polarities of standards and samples.

Cystine concentration (%)	[α] _D ^{24°}	
	Standard	Sample
0.05	-219.78	-208.22
0.10	-219.06	-199.13
0.15	-216.00	-198.42

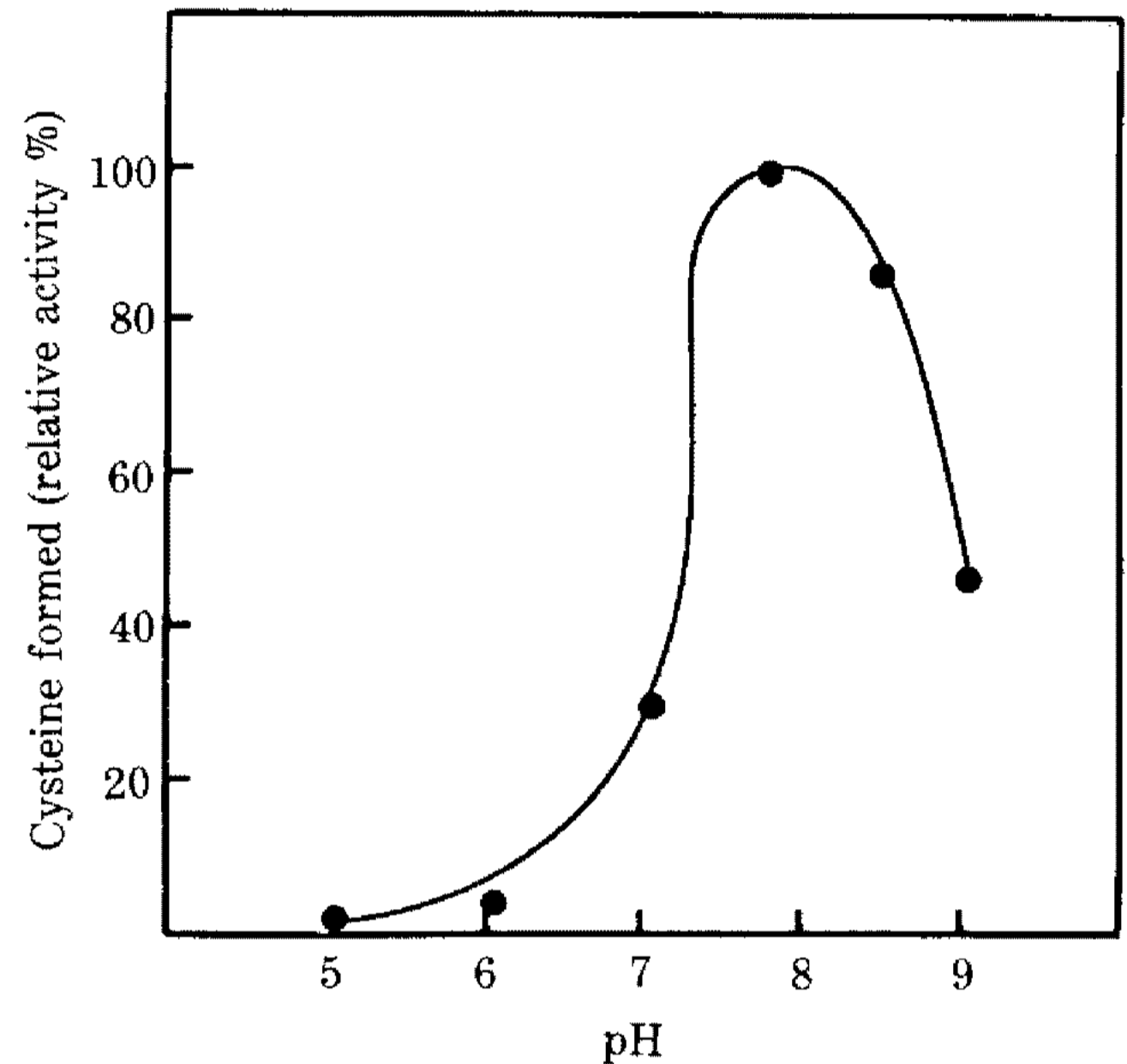


Fig. 8. Effect of pH on the cysteine-forming reaction from D,L-ATC.

켜 0.05-0.15% 가 되게 조절한 후, 이들 용액의 광학활성도를 측정하였다(Table 2). L-cystine 표준시료의 편광값을 측정하여 sample cystine 의 값과 상호비교할 때 Table 2에서 보는 바와 같이 별로 큰 차이가 나타나지 않았다. 이들 결과로부터 효소반응에 의해 생성된 cysteine 은 100% L-form 인 것을 확인할 수 있었다. 이들 값에 있어 약간의 차이는 cysteine 조제시에 균체로부터 유출된 물질에 기인하는 것으로 사료된다.

효소반응의 최적조건

D,L-ATC 로부터 L-cysteine 의 생성반응에 관여하는 효소의 최적 pH 를 살펴보았다. Fig.8에서 보는 바와 같이 pH 7.8에서 최대 활성을 나타냈으며, 약간의 pH 변화에 의해 효소활성의 변화가 심하게 나타났다.

한편, 효소반응의 온도효과를 살펴보기 위하여 28-42°C 의 범위에서 변화시키면서 생성된 cysteine 의 양을 측정하였다. 그 결과, 효소활성은 33°C에서 최대

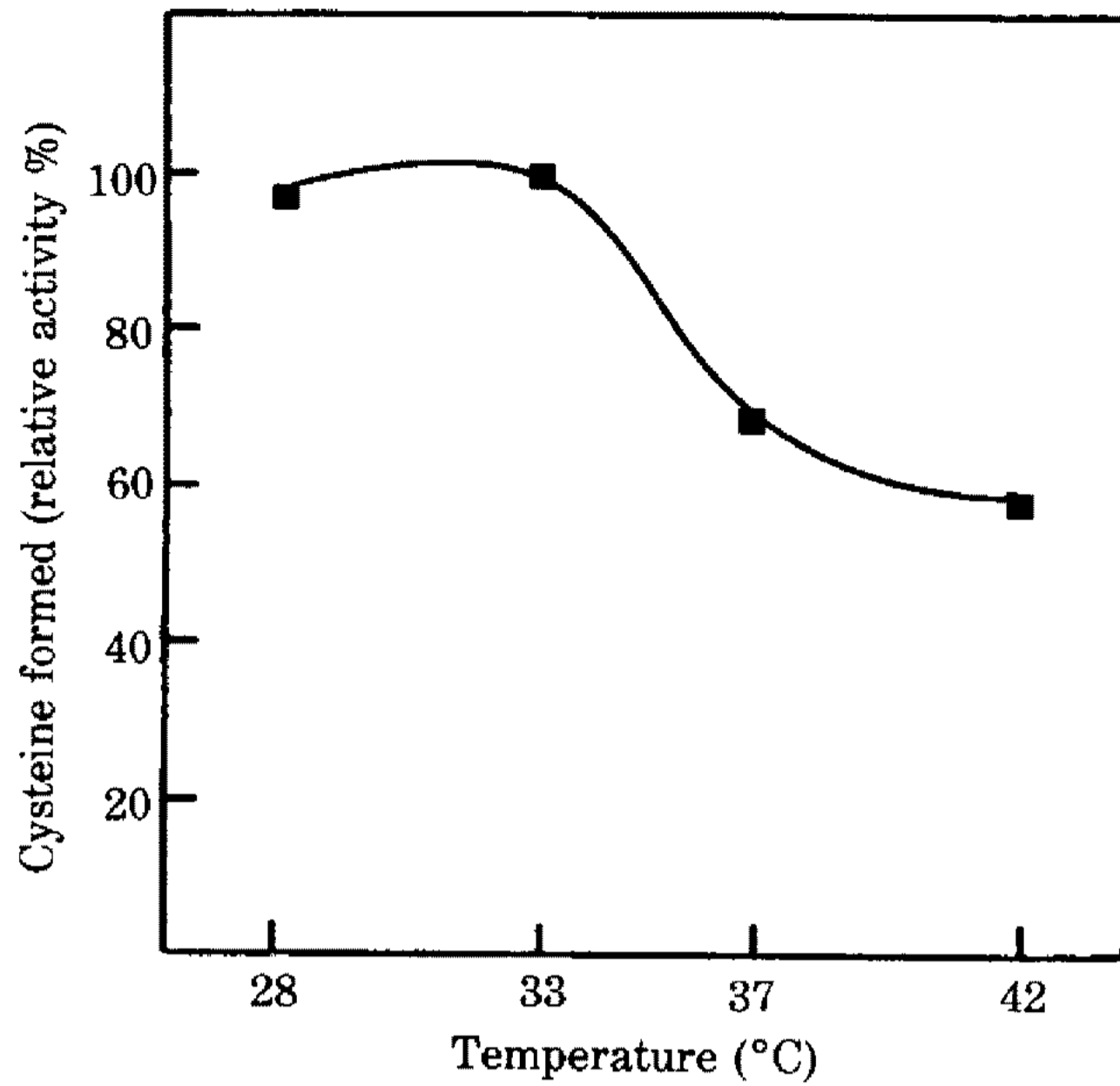


Fig. 9. Effect of temperature on the cysteine-forming reaction from D,L-ATC.

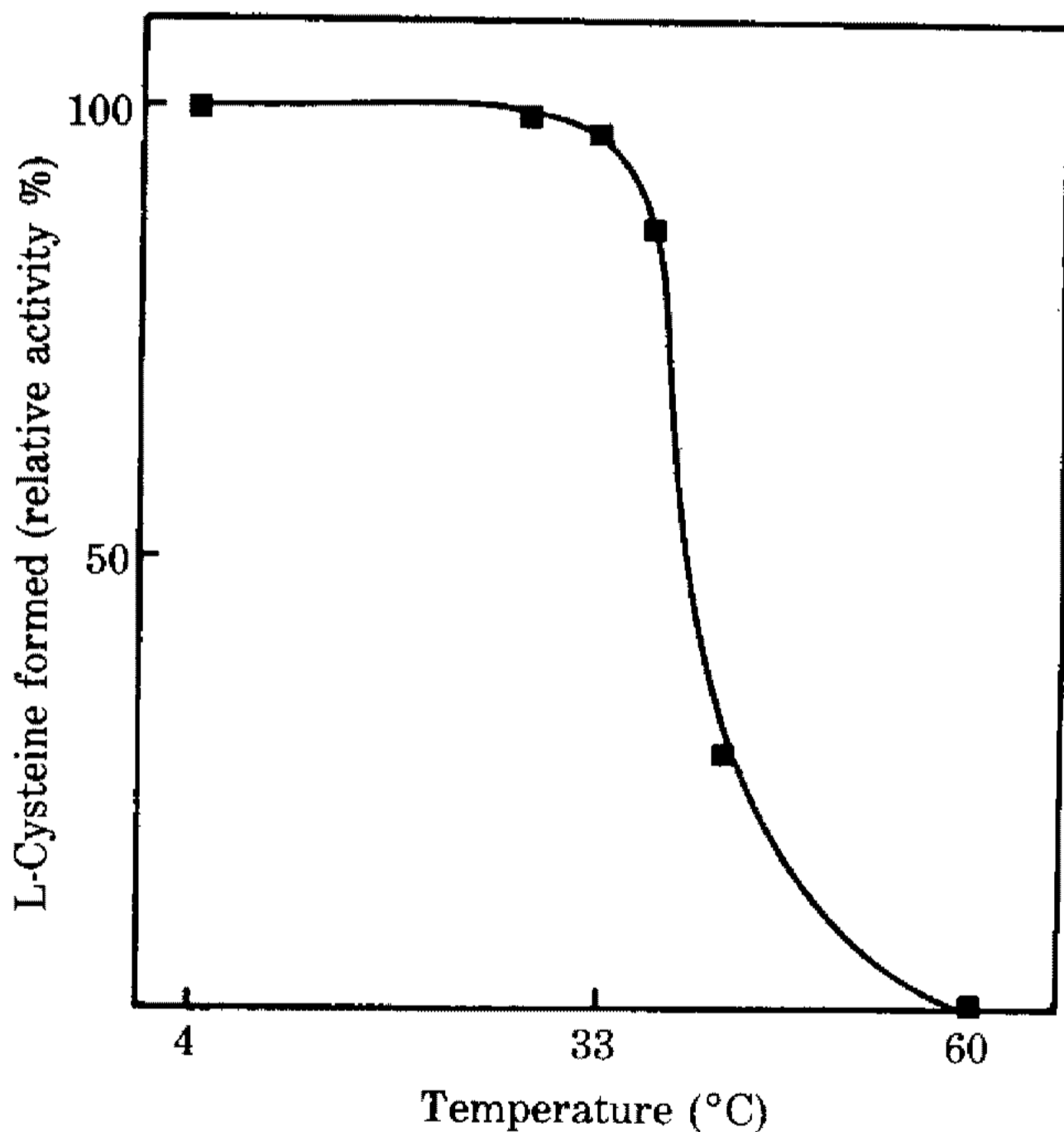


Fig. 10. Thermal stability of the cysteine-forming enzyme.

*Each enzyme solution was kept for 6 hours at the specified temperatures.

치를 나타내었으며 28-33°C의 범위에서는 별로 변화가 없었다(Fig.9). 한편, 33°C 이상에서는 급격히 효소활성이 저하되는 것으로 나타났는데 이는 효소의 열안정성이 감소되는데 기인하는 것으로 사료되며, Fig.10의 결과로부터 예견할 수 있다.

결론

D,L-ATC로부터 L-형의 cysteine만이 생성되었고, 이 반응은 생성물인 L-cysteine에 의한 feedback inhibition을 받아 반응속도가 조절되고, cofactor로서 Mn 이온을 필요로 하며, 33°C 이상의 반응온도에서는 열안정성이 급격히 저하되어 효소반응이 종결되었다.

조효소액에는 L-cysteine을 분해하는 효소가 존재하며, 효소저해제없이 반응시킬 때 생성된 L-cysteine의 대부분이 분해되었다. 효소저해제로 hydroxylamine의 첨가는 거의 완벽한 효과를 나타내어 L-cysteine의 분해를 거의 방지할 수 있었다.

요약

D, L-2-aminothiazoline-4-carboxylic acid (D, L-ATC)로부터 L-cysteine으로의 bioconversion에 대한 특성을 살펴보았다. *Pseudomonas* species의 배양중에 D,L-ATC를 첨가하여 균체내에 그 관여되는 효소를 유도, 생성시키고 균체만을 모은 후 파쇄하여 조효소액으로 조제하였다.

실험결과, D,L-ATC로부터 L-형의 cysteine만이 생성되며, 이 반응에 관여되는 효소는 cofactor로서 Mn 이온을 필요로 하며, Mn 이온의 첨가에 의해 L-cysteine의 생성량이 수십배 증가되었다. 그러나, 이 효소는 생성물인 L-cysteine에 의해 feedback inhibition을 받았다.

한편, L-cysteine의 분해효소가 조효소액 내에 존재하며 그 효소반응의 저해제없이 생성된 L-cysteine의 대부분이 분해되었다. 반면, 매우 효과적인 효소저해제인 hydroxylamine의 첨가로 L-cysteine의 분해를 거의 방지할 수 있었다.

사사

이 연구를 위하여 기초연구비('89년도)를 지원하여 주신 한국과학재단에 감사드립니다.

참고문헌

- Hunt, S.: "Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids", Chapman and Hall Ltd., p376, 1985
- Nippon Kayaku Co., Ltd.: 公開特許公報, 60-142952 (1985).

3. Behringer, H. and P. Zillikens: *Ann.*, **574**, 140 (1951).
4. Behringer, H. and P. Zillikens: *Ger. Pat.*, **954**, 417 (1956).
5. Ajinomoto Co.: 公開特許公報, 49-101371 (1974).
6. Yamada, H. *et al.*: "Biotechnology of Amino Acid Production", Kodansha Ltd. Tokyo, 1986.
7. Sano, K., K. Yokozeki, F. Tamura, N. Yasuda, I. Noda and K. Mitsugi: *Appl. Environ. Microbiol.*, **34**, 806 (1977).
8. Sano, K. and K. Mitsugi: *Agr. Biol. Chem.*, **42**, 2315 (1978).
9. Sano, K., C. Eguchi, N. Yasuda and K. Mitsugi: *Agr. Biol. Chem.*, **43**, 2373 (1973).
10. Gaitonde, M.K.: *Biochem. J.*, **104**, 627 (1967).
11. Ajinomoto Co.: 公開特許公報, 52-82788 (1975).

(Received December 13, 1989)