

D,L-ATC의 L-cysteine으로의 생물학적 전환반응에서의 균체이용 기술

윤현숙 · 류옥희 · 신철수*

연세대학교 공과대학 식품공학과

Bioconversion of D,L-ATC to L-cysteine Using Whole Cells

Hyun-Sook Yoon, Ok-Hee Ryu and Chul-Soo Shin*

Dept. of Food Engineering, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

Abstract — In the conversion of D,L-2-amino- Δ^2 -thiazoline-4-carboxylic acid(D,L-ATC) to L-cysteine using *Pseudomonas* sp. CU6, the effects of surfactants on whole cells and the stabilities of cell-free enzyme solution and continuous reactor packed with immobilized whole cells were investigated. The enzymatic reaction was little accomplished by whole cells without adding surfactants, whereas it was well carried out with SDS or Triton X-100 comparable to the case using cell-free enzyme solution. Enzyme activity of the cell-free solution was lost by 50% after 7 hours of storage at 30°C, but not at all under an anaerobic condition by sparging nitrogen gas. On the other hand, effect of nitrogen gas did not appear in a continuous reactor using immobilized whole cells, and hydroxylamine, an inhibitor of L-cysteine desulphhydrase, lowered the enzyme stability.

L-cysteine은 간장약, 해독제 등의 의약품, 파마액 등의 화장품, 식품첨가물 등에 이용되고 있다(1). L-cysteine의 산업적 생산은 머리카락이나 동물의 털 등을 산 혹은 알카리로 가수분해하는 방법에 의존해 왔으며(2), 또한 화학적 합성법이 개발되었는데 이 방법은 공정상에 많은 단계를 필요로 하고 D,L 형의 cysteine이 동량으로 생성되므로 광학적 분리를 거쳐 야하는 어려움이 있다(3).

한편, 10여년 전부터 미생물 효소를 이용하여 L-cysteine를 생산하는 방법이 시도되었다. *Aerobacter*가 생산하는 cysteine desulphhydrase를 이용하여 H₂S, pyruvate 및 ammonia를 기질로 하거나(4), 이 효소를 이용하여 β -chloro-L-alanine 과 sulfide(5)로부터 L-cysteine을 생산하는 것이 보고되고 있다. 다른 방법으로는, Sano 등(6, 7)과 류 등(8, 9)은 D,L-2-amino- Δ^2 -thiazoline-4-carboxylic acid(D,L-ATC)로부터 L-cysteine을 생산하는데 *Pseudomonas* 계통의 균주를 이용하였다고 알려져 있다. L-cysteine 생성효소는 유도효소로서 세포내에 존재하며 growth-associated

type이라고 한다(10).

본 연구실의 류 등(8, 9)은 D,L-ATC로부터 L-cysteine의 생산에 대한 효소반응 체계를 이미 규명한 바 있다. 본 논문에서는 L-cysteine의 산업적 생산을 위한 기초연구로서 균체를 이용할 시의 계면활성제의 영향, 효소의 안정성에 미치는 인자, 고정화 균체를 이용한 연속생산공정중의 안정성에 대하여 분석하였다.

재료 및 방법

기질

D,L-2-amino- Δ^2 -thiazoline-4-carboxylic acid(D,L-ATC)를 기질로 사용하였으며 한국화학연구소에서 제공받았다.

사용균주

D,L-ATC를 기질로 하여 L-cysteine를 생산하는 균주 *Pseudomonas* sp. CU6를 사용하였다(11).

균체배양(12)

종배양은 기본배지인 glucose 2.0%, yeast extract

Key words: L-cysteine, bioconversion, whole-cell, surfactants

*Corresponding author

0.5%, peptone 0.5%, NaCl 0.25%, KH₂PO₄ 1.0%, MgSO₄ 0.05%, FeSO₄ 0.0007%를 증류수에 용해시켜 pH 7.0으로 조정하고, 살균 후 *Pseudomonas* sp. CU6를 접종하여 30°C에서 20시간 진탕배양하였다.

본 배양은 위와 동일한 살균배지 50 ml을 함유한 500 ml 삼각플라스크에 위의 종배양액을 8%(v/v)되게 접종하여 30°C에서 4시간 진탕배양한 후(150 rpm, 비전파학) 균체내에 효소를 유도생산하기 위하여 최종 농도가 0.15% 되도록 D,L-ATC를 첨가하여 5시간 계속 진탕배양하였다.

조효소액 제조

균체배양액을 원심분리하여 얻은 균체를 초음파 처리하고 상등액을 취하여 조효소액으로 사용하였다 (8, 9).

균체의 계면활성제 처리

균체를 기질과 반응시킬 경우, 원심분리하여 얻은 균체액을 기질액에 첨가하고 각종 계면활성제를 첨가하였다. Triton X-100의 경우 소량의 toluene 혹은 물에 용해시켜 사용하였다.

효소의 안정성

효소와 균체의 안정성은 추출된 조효소액 혹은 균체액을 0.1% Triton X-100 혹은 0.05% SDS와 혼합하여 4°C에서 유지시켜 효소의 잔존활성을 측정하였다.

균체의 고정화

균체배양액을 원심분리하여 10배로 농축한 균체현탁액을 3%(w/v) sodium alginate 용액을 동량으로 혼합하여 21" gauge 주사바늘을 통하여 0.05 M CaCl₂ 용액에 적하시켜 calcium alginate bead를 조제하였다.

L-cysteine 생성반응(효소반응)

1.5% D,L-ATC 용액(0.5 mM MnSO₄ 함유) 1.5 ml에 1 ml의 조효소액 혹은 균체현탁액을 1 ml 가하여 30°C에서 일정시간 반응시켰다.

고정화 균체를 이용한 연속반응공정

Calcium alginate로 고정화된 균체를 용량이 30 ml인 column(1.7×15 cm)에 충진하여 아래로부터 기질용액을 0.2 ml/min 속도로 유입하여 연속반응을

시켰다. 경우에 따라 기질용액을 질소가스로 sparging하여 유입하거나, column내로 공기를 sparging하거나, 혹은 아무 조치없이 기질을 공급하였다. 한편, hydroxylamine이 첨가된 기질액의 경우 최종농도가 150 mM 되도록 조절하였다.

D,L-ATC 및 L-cysteine 정량

L-cysteine의 정량은 Gaitonde법(13)에 의하여 spectrophotometer를 이용하거나 혹은 HPLC를 이용하였다. 한편, D,L-ATC 정량은 HPLC를 이용하였다.

결과 및 고찰

계면활성제의 영향

균체로부터 추출한 효소 대신 균체자체를 효소원으로 이용하는 경우 균체막을 통한 기질 혹은 생성물의 투과가 문제 될 수 있다. Table 1에서 보는바와 같이 균체의 초음파처리로부터 얻은 조효소액을 이용하는 경우에 비교하여 상대적인 반응정도로 나타낼 때, 균체를 이용할 시 5.3%, 즉 아주 적은 양의 L-cysteine이 생성되었다. 이는 균체막을 통한 기질이나 생성물의 투과성이 미약한데 기인하는 것으로 사료되며 이를 증진시키는 방법으로 계면활성제를 반응기질액에 첨가하였다. 여러 계면활성제중 Triton X-100과 SDS는 효소액을 이용한 경우와 유사한 정도로 매우 효과적이었다(Table 1). 한편, Tween계를 포함한 다른 계면활성제는 효과를 나타내지 못하였다. 다음

Table 1. Effect of various surfactants on the conversion of D,L-ATC to L-cysteine using whole cells

Treatment surfactant (0.5%, w/v)	L-cysteine formed (relative activity, %)
None	5.3
Sonication	100.0
Tween 20	7.3
Tween 40	7.5
Tween 80	7.3
SDS	95.2
PEG 4000	6.7
Triton X-100	113.2
Sodium deoxycholate	20.6

*SDS=sodium dodecyl sulfate, PEG=polyethylene glycol

**One hundred in relative activity corresponds to 15.1 mM L-cysteine formed.

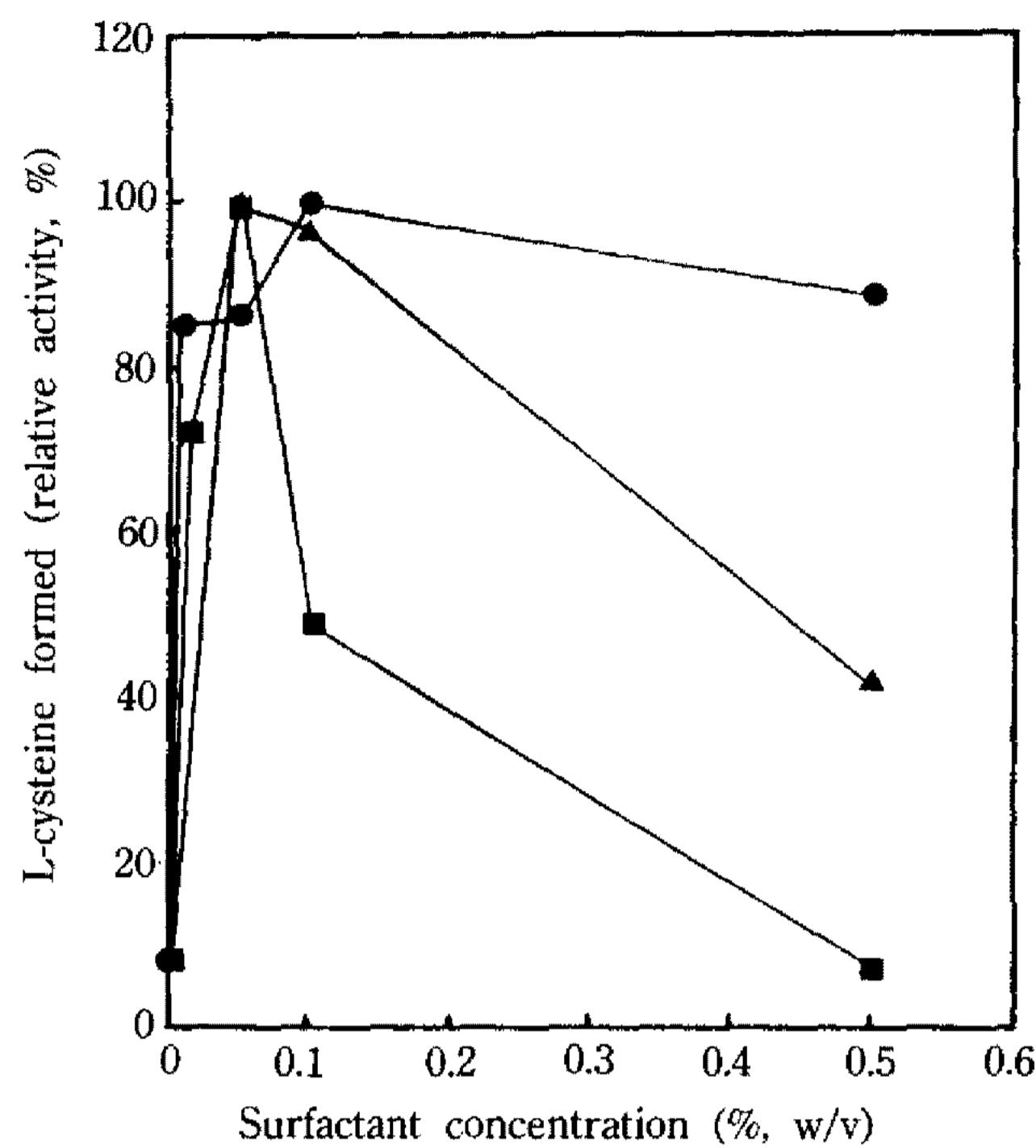


Fig. 1. Effect of Triton X-100 concentration on the conversion of D,L-ATC to L-cysteine using whole cells.

●: Triton X-100 dissolved in toluene.

▲: Triton X-100 dissolved in water.

■: SDS.

**One hundred in relative activity corresponds to 15.0 mM L-cysteine formed.

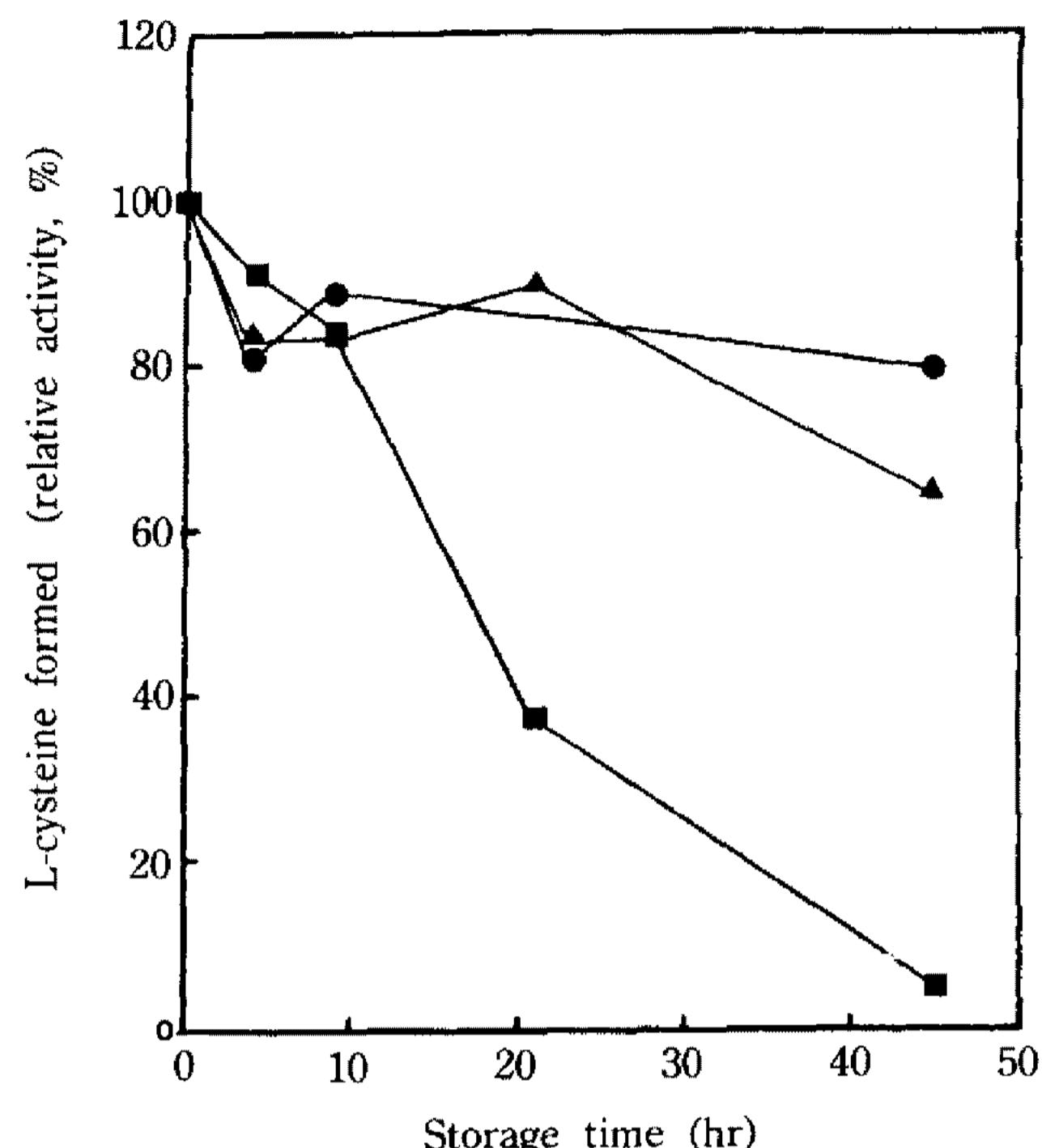


Fig. 2. Storage stability of L-cysteine-forming enzymes in surfactant solution.

●: The enzyme solution was kept for specified hours at 4°C and treated with 0.1% (w/v) Triton dissolved in toluene.

▲: The enzyme solution was treated with 0.1% Triton dissolved in toluene and kept for specified hours at 4°C.

■: The enzyme solution was treated with 0.05% SDS and kept for specified hours at 4°C.

**One hundred in relative activity corresponds to 15.0 mM L-cysteine formed.

으로는 Triton X-100과 SDS를 농도별로 달리하여 첨가효과를 살펴보았다(Fig. 1). SDS는 0.05%에서 최대활성을 나타내었으며, Triton X-100의 경우 물에 용해시켜 사용하는 경우 0.05%가 최적농도이고 그 이상에서는 활성이 감소하였는데 비해 toluene에 용해시킨 경우 0.1% 이상에서 비슷한 정도의 높은 활성을 나타내었다.

Triton X-100과 SDS가 효소의 안정성에 미치는 영향을 관찰하였다. Fig. 2는 추출효소에 대한 결과로서 효소액을 각각의 계면활성제와 혼합하여 4°C에서 저장하여 시간에 따른 효소의 잔존활성을 나타내었다. Triton X-100은 40~50시간의 저장으로 효소활성이 약간 낮아졌으나 SDS의 경우 급격히 활성이 저하되어 효소안정성에 나쁜 영향을 미치었다. 한편, 효소액 대신 균체를 이용할 시 안정성에 대해 살펴보았을 때 Fig. 3에서 보는 바와 같이 SDS의 경우 15시간 동안 저장하는 경우 높은 활성을 나타내었으나 점차 활성이 낮아져 60시간에서는 활성의 50% 정도가 잔존하였다. Triton X-100의 경우 60시간까지 효소활성이 전혀 감소되지 않았다. 이와같이 Triton X-100의 존재하에

서는 효소액 및 균체액 두 경우 동일하게 비교적 안정성이 유지되었다.

효소의 장기안정성에 미치는 산소효과

생성물의 장기적인 연속생산을 위한 주요 인자중의 하나는 효소활성의 안정성이라 할 수 있다. L-cysteine 생성에 관여하는 효소들은 예비적인 실험결과 활성을 쉽게 잃는 것으로 나타났다. 본 실험에 사용하는 조효소액의 저장중에 일어나는 활성의 변화를 살펴본 결과, 30°C 항온조에서 유지시킨 후 잔존활성을 측정하였을 때 시간에 따라 활성이 급격히 저하되어 7시간 후에는 50% 정도의 활성만이 잔존하였다(data not shown). 이러한 효소활성의 저하는 효소활성부위의 -SH기가 산소에 의해 -S-S-기로의 산화, 또는 효소 내에 존재하는 단백질 분해효소에 의한 작용 등을 주요 원인으로 생각할 수 있다(14). 이러한 관

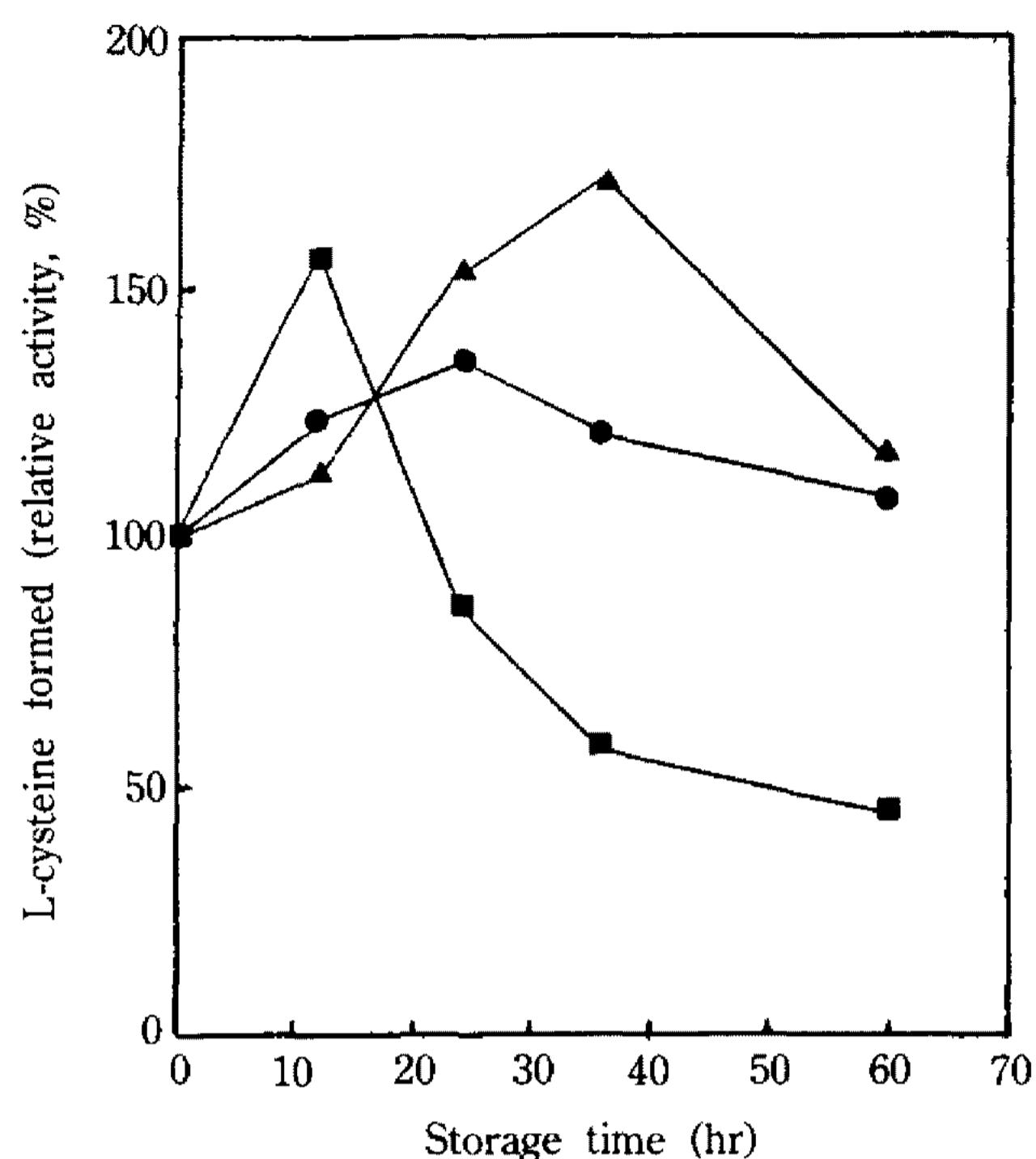


Fig. 3. Storage stability of L-cysteine-forming enzymes activities of whole cells in surfactant solution.

●: Cell suspension was kept for specified hours at 4°C and treated with 0.1% Triton dissolved in toluene.
 ▲: Cell suspension was treated with 0.1% Triton and kept for specified hours at 4°C.
 ■: Cell suspension was treated with 0.05% SDS and kept for specified hours at 4°C.

**One hundred in relative activity corresponds to 15.0 mM L-cysteine formed.

Table 2. Effect of oxygen on the stability of the L-cysteine-forming enzyme

Gas	Treatment time (hr)	L-cysteine formed (remaining activity, %)
Air	0	100
Air	7	27
Nitrogen	0	121
Nitrogen	7	118
Nitrogen+DTT*	7	139

*5 mM D,L-dithiothreitol (DTT) was added to the reaction mixture in final concentration.

**One hundred in remaining activity corresponds to 14.2 mM L-cysteine formed.

점에서 조효소액을 이용하는 경우 질소가스로 충진하여 산소를 차단한 상태에서 효소반응을 시킨 결과 공기에 노출된 조건인 보통의 효소반응(control)에 비하여 L-cysteine의 생성이 약간 증가하였으며, 효

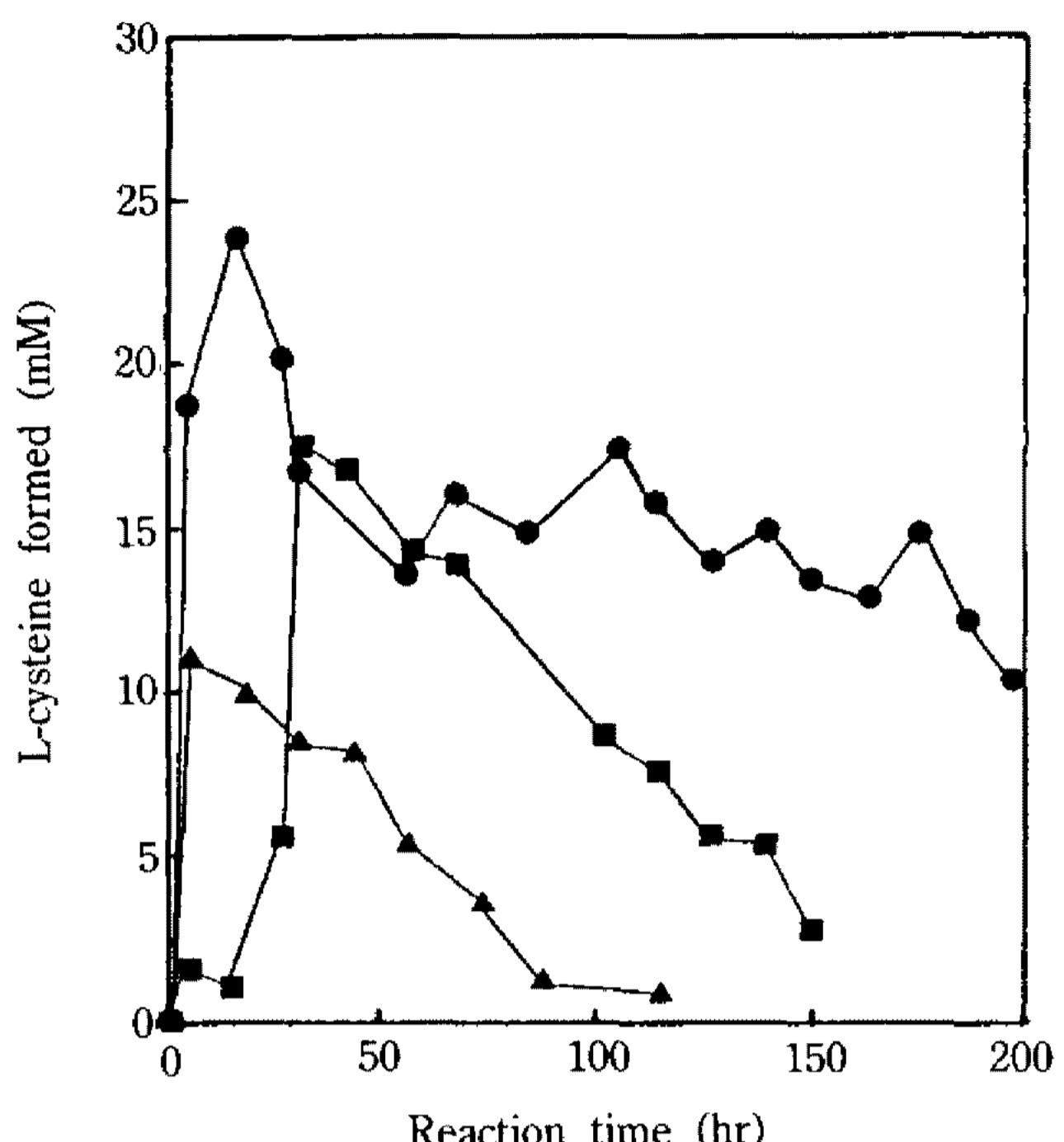


Fig. 4. Effect of various atmospheres on the continuous production of L-cysteine using immobilized cells at a dilution rate of 0.4 hr⁻¹.

●: unaerated, ▲: air sparging, ■: nitrogen sparging

소액을 공기와 질소가스 존재하에서 각각 7시간 유지시킨 후의 잔존활성은 질소가스하에서는 대부분의 활성이 유지된 반면 공기에 노출되었을 때 급격하게 저하되었다(Table 2). 그리고 질소가스와 함께 환원제인 D,L-DTT를 첨가하였을 때 비교적 좋은 결과가 얻어졌다. 이를 결과로부터 L-cysteine 생성에 관여하는 효소는 산소에 노출되었을 때 효소활성을 쉽게 잃는 것으로 생각되었다. 반면, 효소액 중의 단백질 분해효소 활성은 거의 나타나지 않아 L-cysteine 생성효소 안정성 저하에 효과를 미치지 못하는 것으로 사료되었다(data not shown).

Alginate를 담체로 하여 고정화한 beads를 충진한 packed bed reactor로부터 L-cysteine을 연속 생산할 시 효소의 장기안정성을 살펴보았다(Fig. 5). 앞의 결과를 토대로 하여 연속공정 중에 기질용액에 질소를 불어 넣어 용존산소가 존재하지 않는 조건하에서 기질을 주입할 때 얻어진 결과는 예상과 달리 효소의 활성은 지속적으로 감소되어 150시간 이후에는 거의 잃어버렸으며, 산소를 반응기내로 유입하면서 반응시킨 경우에 있어서는 100시간내에 거의 모든 활성이 사라졌다. 반면, 아무 조치없이 기질을 공급할 때(no sparging) 150시간 이후에도 비교적 높은 활성이 유지되었다(Fig. 4). 고정화균체의 경우 반응중 균체가

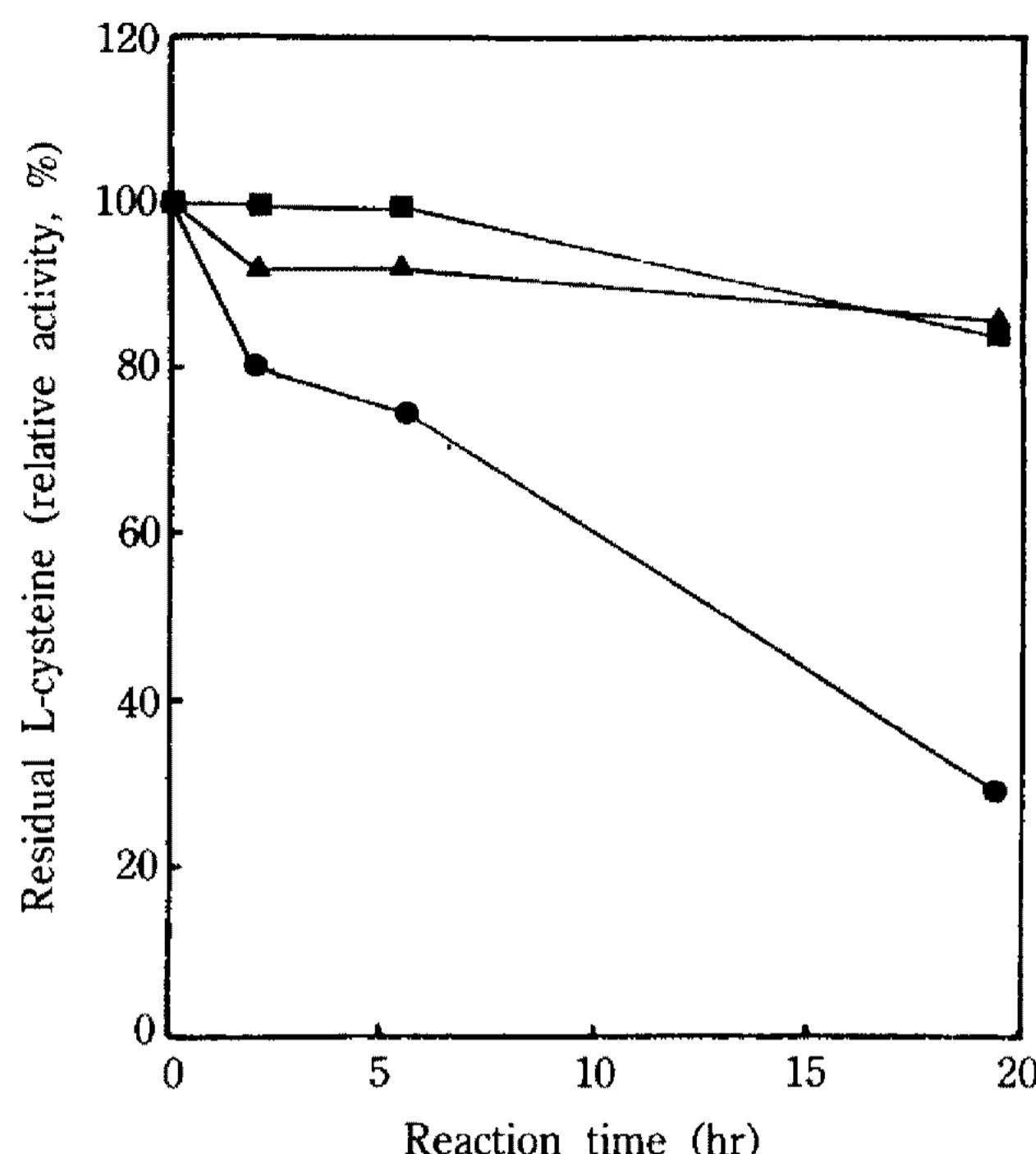


Fig. 5. Effect of hydroxylamine concentration as an inhibitor for L-cysteine decomposition using immobilized cells.

●: 50 mM hydroxylamine added.

▲: 150 mM hydroxylamine added.

■: 300 mM hydroxylamine added.

**One hundred in relative activity corresponds to 15.0 mM L-cysteine formed.

생존한 상태에서 이루어진다. 이러한 경우 질소가스 하에서 균체는 극한적인 상태에 처해 있어 균체내에 생성된 L-cysteine 생성효소는 유도효소이므로 쉽게 분해되어 영양원으로 이용될 수 있다. 즉, L-cysteine 생성에 관여하는 효소의 decay가 일어날 수 있다. 한편, 지나친 산소의 공급은 또한 균체내 L-cysteine 생성효소의 decay 내지는 불활성화를 초래할 수 있을 것으로 생각된다. 이를 해결하는 방안으로 고정화 전에 균체의 효소활성을 유지되나 생존하지 않는 상태로 처리하는 시도가 중요할 것으로 사료된다.

Hydroxylamine의 영향

조효소액을 이용하여 생성된 L-cysteine은 효소액 내에 존재하는 cysteine desulfhydrase에 의해 분해가 일어난다. 이를 억제하는 방법으로 최종농도가 30 mM 되도록 hydroxylamine을 첨가하는 것이 매우 효과적인 것으로 밝혀졌다(8). 한편, 효소액 대신 균체를 이용하는 경우 역시 생성된 L-cysteine이 분해되는 것을 Fig. 6으로부터 알 수 있다. 이를 효과적으로 저지하기 위해서는 hydroxylamine 농도를 150 mM

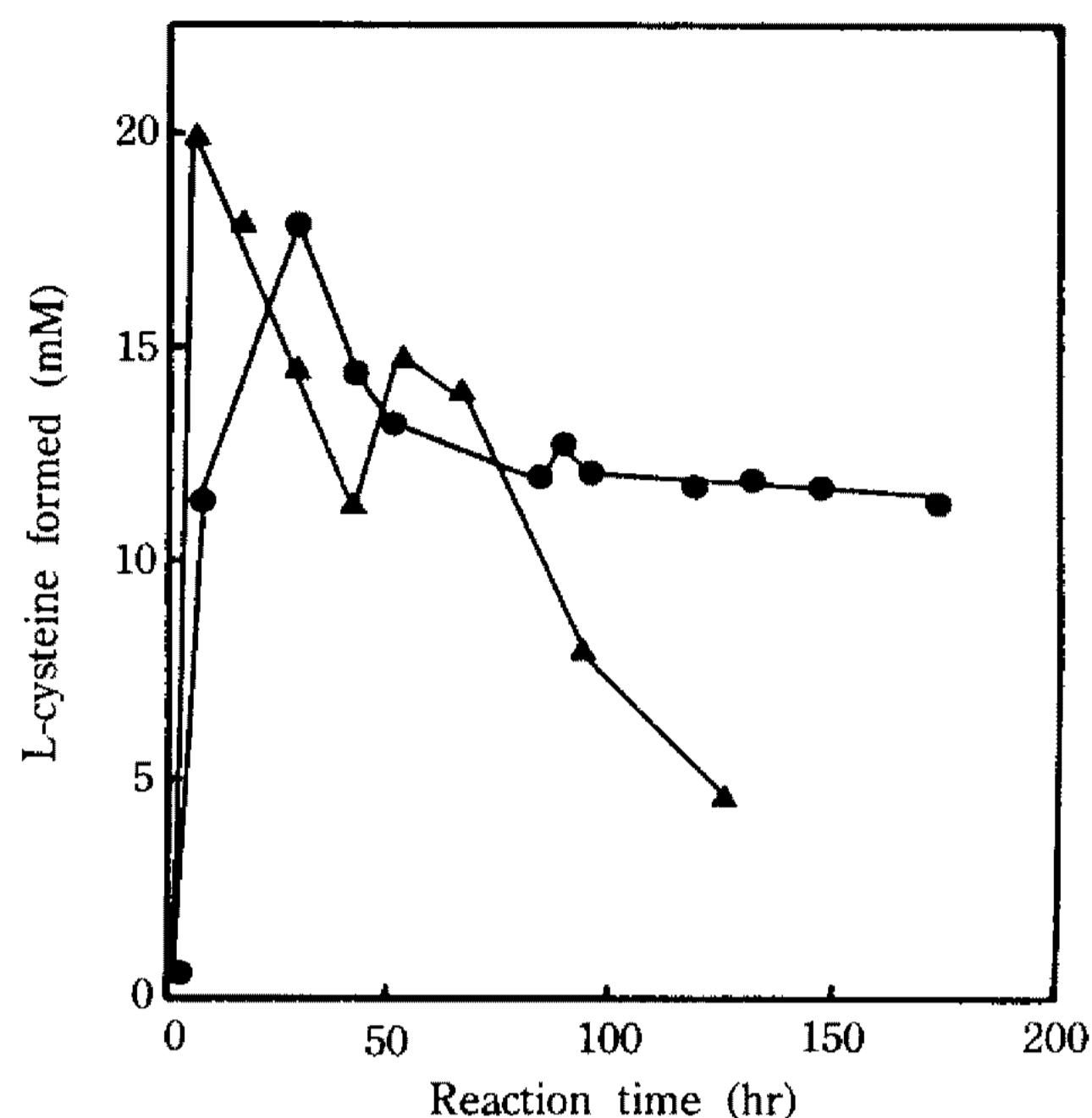


Fig. 6. Effect of hydroxylamine on the continuous production of L-cysteine in an immobilized whole cells reactor at a dilution rate of 0.4 hr⁻¹.

●: L-cysteine formed without hydroxylamine.

▲: L-cysteine formed with hydroxylamine.

이상으로 유지하여야 하는 결과가 얻어졌는데, 이는 조효소액을 이용한 경우에 비교하여 훨씬 높은 값이며 hydroxylamine의 균체막 투과성에 기인하는 것으로 생각된다. Hydroxylamine이 효과적인 저해제인데 반하여 반응성이 강해 다른 효소들을 불활성화시킬 가능성이 있는 것으로 생각되어 고정화균체를 이용하는 연속생산공정에서 hydroxylamine 첨가 유무의 효과를 살펴보았다. Fig. 6에서 나타난 바와 같이 hydroxylamine이 첨가된 경우 반응시간 70시간 이후부터는 효소활성이 급격히 저하된 반면, 첨가되지 않은 경우 150시간 이후까지 비교적 높은 효소활성이 유지됨을 알 수 있다. 이를 결과로부터 hydroxylamine에 의해 야기되는 안정성 저하의 문제를 궁극적으로 해결하기 위해서는 hydroxylamine이 첨가되지 않아야 하며, 이를 위하여 cysteine desulfhydrase를 생산하지 않는 변이주의 개발이나 그 효소를 균체내에 유도생산되지 않도록 하는 방법이 연구되어야 할 것이다.

요약

D,L-ATC의 L-cysteine으로의 생물학적 전환에 있어 균체를 이용할 때, 계면활성제의 영향, 효소의 안정성 및 연속생산공정의 고정화 균체 반응기의 안

정성에 대하여 분석하였다. 계면활성제의 첨가없이 균체만을 이용할 때 반응은 매우 미미하게 이루어졌으나 SDS와 Triton X-100을 첨가할 때 cell-free 조효소액을 이용하는 경우와 비슷한 정도의 결과가 얻어졌다. 효소의 활성은 30°C에서 7시간 저장 후 50% 저하되었으며 질소가스하의 혼기적인 조건에서는 활성저하가 거의 일어나지 않았다. 이와 같은 효소의 불활성화는 효소에 대한 산소의 작용으로 사료되었다. 그러나, alginate로 고정화한 균체를 이용한 연속반응공정에서 혼기적인 조건하에서 150시간 내에 대부분의 활성을 잃어버렸으며, L-cysteine 저해제인 hydroxylamine을 첨가할 때 효소활성이 급속히 감소되었다.

감사

이 논문은 1991년도 교육부 학술연구조성비에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 한국유전공학연구조합. 1989. 생물산업제품 100선. Pp. 146-148.
- Hunt, S. 1985. *Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids*. Pp. 376-398. Barrett, G.C. (ed.), Chapman & Hall Ltd.
- Toru, N. and H. Yamada. 1986. *Biotechnology of Amino Acid Production*. Pp. 217-223. Kodansha Ltd., Tokyo.
- Kumagai, H., Y.J. Choi, S. Sejima and H. Yamada. 1975. Formation of cysteine desulphydrase by bacteria. *Agric. Biol. Chem.* **39**: 387-392.
- Kumagai, H., Y.J. Choi, S. Sejima and H. Yamada. 1977. Elimination and replacement reactions of β -chloro-L-alanine by cysteine desulphydrase from *Aerobacter aerogenes*. *Agric. Biol. Chem.*

- 41: 2071-2075.
- Sano, K., K. Yokozeki, F. Tamura, N. Yasuda, I. Noda and K. Mitsugi. 1977. Microbial conversion of D,L-2-amino- Δ^2 -thiazoline-4-carboxylic acid to L-cysteine and L-cystine: screening of microorganisms and identification of products. *Appl. Environ. Microbiol.* **34**: 806-810.
- Sano, K. and K. Mitsugi. 1978. Enzymatic production of L-cysteine from D,L-2-amino- Δ^2 -thiazoline-4-carboxylic acid by *Pseudomonas thiazolinophilum*: optimal conditions for the enzymatic formation and enzymatic reaction. *Agric. Biol. Chem.* **42**: 2315-2321.
- 류옥희, 신철수. 1990. D,L-ATC로부터 L-cysteine 으로의 bioconversion에 관여하는 효소의 특성. 한국산업미생물학회지 **18**: 49-55.
- Ryu, O.H. and C.S. Shin. 1991. Analysis of the reaction steps in the bioconversion of D,L-ATC to L-cysteine. *J. Microbiol. Biotechnol.* **1**: 50-53.
- Sano, K., C. Eguchi, N. Yasuda and K. Mitsugi. 1979. Metabolic pathway of L-cysteine formation from D,L-2-amino- Δ^2 -thiazoline-4-carboxylic acid by *Pseudomonas*. *Agric. Biol. Chem.* **43**: 2373-2374.
- Ryu, O.H. 1990. Reaction mechanism and kinetic analysis in the bioconversion of D,L-ATC to L-cysteine by *Pseudomonas* sp. CU6. M.S. Thesis, Dept. of Food Engineering, Yonsei Univ., Seoul.
- Yoon, H.S. 1992. Effect of surfactant on L-cysteine bioconversion and studies on the stability of immobilized-cell reaction system. M.S. Thesis, Dept. of Food Engineering, Yonsei Univ., Seoul.
- Gaitonde, M.K. 1967. A spectrophotometric method for the direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acids. *Biochem. J.* **104**: 627-633.
- Agathos, S.N. and A.L. Demain. 1988. *Horizons of Biochemical Engineering*. Pp. 147. Aiba, S. (ed.), Oxford University Press, Oxford.

(Received November 23, 1992)