

효모 *Saccharomyces cerevisiae*의 ATP 생성계와 XMP aminase에 의한 5'-XMP로부터 5'-GMP 발효생산

조정일*

고려대학교 농화학과

Fermentative Production of 5'-GMP from 5'-XMP by XMP aminase and ATP-generation System of *Saccharomyces cerevisiae*

Jung-Il Cho*

Department of Agricultural Chemistry, Korea University Seoul 136-701, Korea

ABSTRACT: For the enzymatic conversion of 5'-XMP to 5'-GMP, partially purified XMP aminase from *Escherichia coli* was coupled with the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, capable of ATP regeneration through glycolytic pathway. In order to elevate the level of XMP aminase in *E. coli*, *guaB*⁻ (IMP dehydrogenase-less) mutant were introduced, and the yeast used as ATP supplier was treated by some method to increase its membrane permeability. The optimum conditions for efficient conversion reaction by energy-coupled system were investigated. As the results, a CH 41, *guaB*⁻ mutant of *E. coli* K-12, showed 2.75 fold increase in the level of XMP aminase, compared with its parent cell. And the lyophilized yeast was the most effective as the ATP supplier. The optimum temperature and pH of conversion reaction were 40°C and pH 7.4, and the highest conversion ratio was shown under the reaction condition of 100 mM glucose, 100 mM inorganic phosphate and 6 mM AMP. When 36 units/ml XMP aminase used under the above conditions, the amount of 60 mg/ml yeast was sufficient to be used. Under the optimum condition, 71% of 1.8 mM(65.6 mg/100 ml) 5'-XMP was converted to 5'-GMP within 8 hr.

KEYWORDS: *Saccharomyces cerevisiae*, XMP aminase, ATP-generation system, 5'-GMP production

생체내의 많은 효소반응은 에너지원으로서 adenosine 5'-triphosphate(ATP)를 요구하는 endergonic reaction이기 때문에 이러한 효소를 이용하여 유용한 물질을 생산하기 위해서는 ATP 공급문제를 해결해야만 한다. 지금까지 알려진 ATP 생산 및 재생방법에는 동물이나 미생물에서의 추출법, 화학 합성법(Smith *et al.*, 1958), 미생물이나 효소에 의한 생산법 등이 있는데, 미생물에 의한 생산법은 Laufer (1964) 등에 의해 효모의 glycolysis와 공역하여 AMP 또는 adenosine이 ATP로 인산화되는 것이 발견된 이후 활발히 연구되었으며, 1961년에 Tochikura 등은 Baker's yeast의 마쇄 균체와 acetone

건조 균체를 이용하여 glucose를 에너지원으로 해서 AMP의 약 71%를 ATP로 전환하는 효율적인 방법을 개발하였고, Tanaka(1972) 등은 효모를 계면활성제로 처리하여 ATP 생산을 효율화하는 방법을 개발하였다. 또한 *Brevibacterium ammoniagenes*의 salvage 합성계를 이용하여 adenine으로부터 ATP를 생산하는 방법이 연구되었으며(Lieberman *et al.*, 1956), 이외에도 acetate kinase(Gardener *et al.*, 1974; Nemet *et al.*, 1978), photosynthetic system(MacCarty *et al.*, 1971; Avron *et al.*, 1960)을 이용한 ATP 재생법이 다수 보고되어 있다.

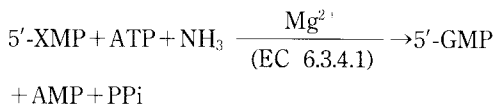
핵산 관련물질인 5'-GMP(5'-guanylic acid)는 5'-AMP(5'-adenylic acid)와 더불어 purine nucleotides 생합성 회로의 최종 산물로서 1964년에 Kuninaka

*Corresponding author

등에 의해 항미강화성분 중의 하나라는 것이 밝혀진 이후 그 수요가 급증하게 되었으며 지금까지 미생물 및 효소를 이용하여 5'-GMP를 생산하는 여러가지 방법이 알려져 왔다(Abe *et al.*, 1966; Demain *et al.*, 1966; Fujio *et al.*, 1984; Furuya *et al.*, 1973; Maruyama *et al.*, 1986; Ogata *et al.*, 1963). 이 중에서 현재 산업적으로 많이 이용되고 있는 방법은 5'-XMP(5'-xanthylic acid)를 직접 발효법에 의해 생산한 후 이를 미생물이나 효소를 이용하여 5'-GMP로 전환하는 방법인데, 5'-XMP를 고농도로 생산하는 균주들이 개발되어 있으며, 5'-XMP를 5'-GMP로 전환하는 균주 또한 개발된 것으로 보고되어 있으므로 가능하다(Fujio *et al.*, 1984).

5'-XMP를 전환하는 방법으로는 5'-XMP의 생성 균주와 전환 균주를 혼합배양하는 방법, 배양액 내의 5'-XMP를 resting 상태에 있는 전환 균주 내의 XMP aminase(xanthosine 5'-phosphate; ammonia ligase (AMP), EC 6.3.4.1)를 이용하여 전환하는 방법, 그리고 5'-XMP를 미생물로부터 추출된 XMP aminase를 직접 이용하여 전환하는 방법 등이 있는데, 두번째 방법에 의해 Fujio(1984) 등은 *B. ammonia-genes* KY13510의 resting cell을 사용하여 5'-XMP를 전환시킨 결과 87%의 전환율을 보였다.

한편 XMP aminase의 촉매반응은 에너지를 요구하는 반응으로서 1 mole의 5'-XMP를 5'-GMP로 전환시키는데 2 mole의 고에너지 인산화합물, 즉 ATP(adenosine 5'-triphosphate)를 요구한다.



생체로부터 추출된 XMP aminase를 직접 이용하여 5'-XMP를 5'-GMP로 전환하기 위해서는 비교적 고가의 시약인 ATP 공급문제를 해결해야 한다.

따라서 본 연구에서는 *E. coli* K-12를 돌연변이 원인으로 처리하여 XMP aminase 활성이 강화된 변이주를 얻고, 이로부터 XMP aminase를 조정제하여 5'-XMP를 5'-GMP로 전환하고자 하였다. Fig. 1은 전체 반응 모식도를 나타낸 것으로 에너지원으로 사용된 glucose는 효모의 glycolysis 초기 단계에서 FDP(fructose 1,6-diphosphate)의 형태로 되며 다음 단계에서 FDP는 ethanol과 CO₂로 분해되면서

ADP로부터 ATP를 생성한다. 이 때 생성된 ATP는 XMP aminase 효소 반응에 이용되어 AMP로 되며, AMP는 다시 효모의 adenylate kinase에 의해 ADP로 된다. 이와같은 공역 전환 반응의 원리를 토대로 하여 5'-XMP를 5'-GMP로 전환하는 반응 조건을 검토하고 최적 반응 조건에서 5'-GMP를 발효 생산하고자 한다.

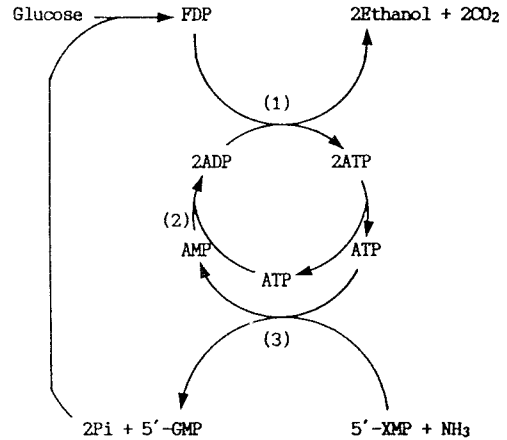


Fig. 1. Schematic representation of coupled reaction system.
 (1) glycolytic enzymes
 (2) adenylate kinase
 (3) XMP aminase

材料 및 方法

사용한 미생물

XMP aminase의 효소원으로 사용된 균주는 *E. coli* K-12를 선정하였으며, ATP 생성계의 효소원으로는 *Saccharomyces cerevisiae*를 사용하였다.

배지 및 배양

S. cerevisiae 배양을 위한 배지는 glucose 10%, yeast extract 0.2%, KH₂PO₄ 0.1%, NaCl 0.1%, (NH₄)₂SO₄ 0.4%, MgSO₄·7H₂O 0.07%를 사용하였으며, 30℃에서 20시간 진탕배양하였다. *E. coli* K-12의 배양을 위한 LB(Luria-Bertani) 배지조성은 Bacto tryptone 1%, yeast extract 0.5%, sodium chloride 0.5%, pH 7.2이다. 최소 배지는 0.5% KH₂PO₄, 0.7% K₂HPO₄, 0.05% Na₃·Citrate·3H₂O, 0.01% MgSO₄·7H₂O, 0.1% (NH₄)₂SO₄, 0.8% glu-

cose, pH 7.2로 조성되었으며 XMP aminase 생산을 위한 배지는 최소 배지에 0.2% casamino acid, 0.0005% thiamine·HCl을 첨가한 것으로 하였다.

XMP aminase의 효소원으로 이용할 *E. coli* 균체를 수확하기 위해 사면배지로부터 한 백금니의 균체를 50 ml의 XMP aminase 생산용 배지를 함유하는 500 ml용 삼각 flask에 접종하여 rotary shaker에서 생육의 대수 증식기 말기까지 37°C에서 진탕배양하였다. 얻어진 균체는 7.5 mM potassium phosphate buffer(pH 7.4)로 두번 세척하여 -70°C에서 보관하면서 사용하였다.

Xanthine 영양요구주의 분리

E. coli K-12를 LB배지에 접종하여 하룻밤 배양하고, 0.1 M citrate buffer(pH 7.0)로 세척하고 회수된 균에 돌연변이원으로 MNNG(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine)을 최종농도가 200 µg/ml 되도록 첨가한 후 37°C, 30분간 배양하여 xanthine 영양요구주를 분리하였다. 한편, 변이주의 야생균주로의 전환여부를 확인하기 위해 주기적으로 최소배지와 xanthine을 함유하는 최소배지에서 유전형질을 확인하였다.

XMP aminase의 추출 정제

XMP aminase의 조정제는 Sakamoto(1972) 등의 방법을 약간 변형하여 수행하였다. 전 과정은 4°C에서 수행하였으며 원심분리는 12,000 rpm에서 30분간 수행하였다.

10 g(wet weight) *E. coli* 균체를 7.5 mM potassium phosphate buffer(pH 7.4) 400 ml에 현탁시킨 후 10KC에서 8분간 sonication 하였으며 원심분리 후 상징액을 취하여 같은 buffer 800 ml에서 16시간 투석하였다. 여기에 10%, 5%의 streptomycin sulfate 용액을 순서대로 각각 10% 되게 첨가하여 원심분리하고 상징액을 취하여 같은 buffer 600 ml에서 16시간 투석하였다. 위에서 얻은 조효소액을 ammonium sulfate(pH 7.4)를 46%까지 포화시켜 원심분리 후 상징액을 취하여 다시 ammonium sulfate를 가하여 63%까지 포화시켰다. 이 용액을 원심분리하여 침전물을 20 mM potassium phosphate buffer(pH 7.4) 15 ml에 현탁시킨 후 같은 buffer에서 16시간 투석하였으며 이를 -20°C에서 보관하였다.

XMP aminase의 활성측정

XMP aminase 활성은 Sakamoto(1972) 등의 방법을 변형하여 측정하였다. 기질 혼합액의 조성은 0.12 M 5'-XMP, 1.0 M (NH₄)₂SO₄, 0.2 M ATP(pH 7.0), 0.4 M MgCl₂, 1.0 M tris-HCl buffer(pH 8.5)였으며, 대조구로는 기질 혼합액에 5'-XMP 대신 증류수를 첨가한 것으로 하였다. 효소반응은 상기 기질용액 0.1 ml을 cap tube(70×120 mm)에 넣고 효소액 0.15 ml(27~29 units)을 가하여 0.25 ml이 되도록 한 후에 15분간 30°C의 수조에서 수행하였으며, 3.5% perchloric acid를 2.75 ml 가하여 반응을 중지시키고 원심분리하여 상징액의 흡광도를 290 nm에서 측정하였다. 효소의 1 unit는 1분간 1 nmole의 5'-GMP를 생성할 수 있는 효소량으로 정의하였으며, 비활성은 조효소액 내의 단백질 1 mg이 나타내는 units의 수로 정의하였다.

Units(nmole 5'-GMP produced/min)

$$= \frac{V \times 10^6 \times A_{290}}{\alpha \times t}$$

V=perchloric acid 첨가 후의 최종 부피(3 ml)

α =5'-GMP와 5'-XMP의 290 nm에서의 mole 흡광계수의 차이(5.8×10^3)

t=반응 시간(15분)

IMP dehydrogenase의 활성 측정

Lambden(1973) 등의 방법에 준하여 수행하였다. 즉, 효소활성은 NADH 형성에 의한 340 nm에서의 흡광도의 증가로서 측정하였는데 그 과정은 100 µmoles tris-HCl buffer(pH 7.5), 5 µmoles reduced glutathione, 100 µmoles KCl, 3 µmoles IMP를 포함하는 기질혼합액에 0.6 ml의 조효소 용액 0.2 ml을 가한 후 잠시 가온하고 NAD를 첨가하여 반응을 개시한다. 효소활성은 상온에서 15분 동안 1분 간격으로 340 nm에서의 흡광도 변화를 조사하여 결정한다.

단백질 정량

단백질 정량은 표준 물질로 bovine serum albumin을 이용하여 Lowry(1951) 등의 방법에 의해 750 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

ATP 재생계의 효소원 제조

Glucose를 이용하여 XMP aminase 반응계에 ATP의 형태로 에너지를 공급하는 효소원으로서 이용된 효모의 막투과성을 향상시키기 위해 다음과 같이 막처리 과정을 수행하였다. Acetone 건조 효모는 Tochikura(1961) 등의 방법으로 제조하였으며, 동결 건조 효모는 40 g(wet weight) 효모를 동결 건조기(LABCONCO, FREEZE DRYER 8)로 2일간 동결 건조(-70°C, 7.5 mm Hg)하여 제조하였다. 또한 toluene-treated 효모는 Murata(1981) 등의 방법을 변형한 것으로, 즉 20 g(wet weight) 효모를 0.1 mM dithiothreitol(DTT)을 포함하는 5.0 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0) 100 ml에 현탁시킨 후 toluene을 10% 되도록 처리하여 흔들어 주면서 25°C 에서 30분간 방치하였다. 상기에서 제조된 효모는 모두 -20°C 에서 보관하여 사용하였다.

XMP aminase와 ATP 재생계의 공역 반응을 위한 표준 반응 혼합액 및 반응 조건

공역 반응에 의해 5'-XMP를 5'-GMP로 전환하기 위한 표준 반응 혼합액의 조성은 1.8 μ moles 5'-XMP, 240 μ moles (NH₄)₂SO₄, 120 μ moles tris-maleate buffer(pH 8.0), 7.5 μ moles AMP, 83.5 μ moles glucose, 166.5 μ moles potassium phosphate buffer (pH 8.0)로서 각 조성물이 0.5 ml 용액에 포함되도록 제조하여 멸균 cap tube(70×120 mm)에 넣고 40°C 에서 가온한 다음 XMP aminase 효소액 0.2 ml(35~38 units)과 ATP 재생계의 효소원으로 쓰인 효모가 25 mg 포함된 효모 현탁액 0.2 ml을 가하여 최종 부피가 1 ml이 되도록 한 후 밀봉하여 진탕 반응을 수행하였다. 다음 3.5% perchloric acid 4 ml을 첨가하여 반응을 중지시킨 후 원심분리하여 상침액을

Table 2. Purification of XMP aminase from *E. coli* CH 41.

Fraction	Volume (ml)	Total activity (units)	Total protein (mg)	Specific activity* (units/mg)	Recovery (%)
Crude extract dialyzed	36.4	6969.8	1463.3	4.8	100
Streptomycin sulfate precipitation dialyzed	39.7	6579.9	706.7	9.3	94.7
Ammonium sulfate fractionation (46~63%) dialyzed	13.8	2582.1	106.3	24.3	37.4

* Specific activity is the number of enzyme units per milligram of protein.

HPLC(high performance liquid chromatography)로 5'-XMP와 5'-GMP에 대하여 정성 및 정량분석을 하였다.

結果 및 考察

Xanthine 영양요구주의 분리

E. coli K-12을 MNNG 처리하여 IMP dehydrogenase가 결핍된 변이주(*guaB*-mutant) 4주를 선별하였으며 각각 *E. coli* CH 41~44로 명명하였다. 이를 제한된 양의 xanthine을 포함하는 XMP aminase 생산용 배지에서 배양한 후 XMP aminase와 IMP dehydrogenase의 활성을 조사한 결과 변이주 CH 41이 모균 *E. coli* K-12보다 XMP aminase 비활성이 2.75배 증가되었다(Table 1).

Table 1. XMP aminase and IMP dehydrogenase levels in xanthine-starved *guaB*⁻ mutants.

Strains	Relative specific activities*	
	XMP aminase	IMP dehydrogenase
<i>E. coli</i> K-12	1.00	1.00
CH 41	2.75	0.46
CH 42	1.33	0.64
CH 43	1.75	0.46
CH 44	1.44	0.47

*Relative to specific activities for strain *E. coli* K-12.

XMP aminase의 추출 정제

Streptomycin sulfate 침전과 ammonium sulfate 분획 과정을 수행하여 약 5.1배 정제된 효소액을 얻을 수 있었으며 그 수율과 비활성을 Table 2에

Table 3. Conversion of 5'-XMP to 5'-GMP by various yeast preparation used for coupled reaction.

Sources of ATP	Conversion ^{a)} ratio(%)	Relative conversion ^{b)} ratio(%)
Acetone-dried yeast	14.6	98
Lyophilized yeast	14.9	100
Toluene-treated yeast	11.0	74
Fresh yeast	5.0	34

a) Conversion ratio = $\frac{\text{wt of 5'-GMP produced}}{\text{wt of 5'-XMP added}} \times 100$

b) Relative to conversion ratio of lyophilized yeast

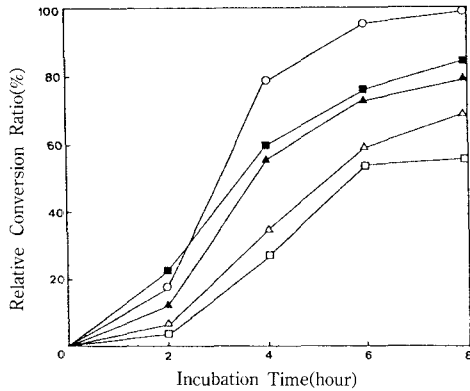


Fig. 2. Effect of glucose concentration on conversion of 5'-XMP to 5'-GMP by coupled reaction. The reaction mixture was contained 1.8 μmoles 5'-XMP, 240 μmoles $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 120 μmoles tris-maleate buffer(pH 8.0), 7.5 μmoles AMP, 166.5 μmoles potassium phosphate buffer(pH 8.0).

-□- : 0.0 M, -△- : 0.05 M, -○- : 0.1 M, -■- : 0.15 M, -▲- : 0.2 M

나타내었다. 이와같이 부분 정제된 효소를 실험에 사용하였다.

XMP aminase와 ATP 재생계의 공역 반응에 의한 5'-XMP의 5'-GMP로의 전환

ATP 재생계의 효소원 : 상기의 실험방법에서 제조한 여러 ATP 재생계의 효소원을 XMP aminase의 전환반응에 도입하여 전환율을 조사한 결과 Table 3 과 같았다. 동결 건조 효모가 가장 높은 전환율을

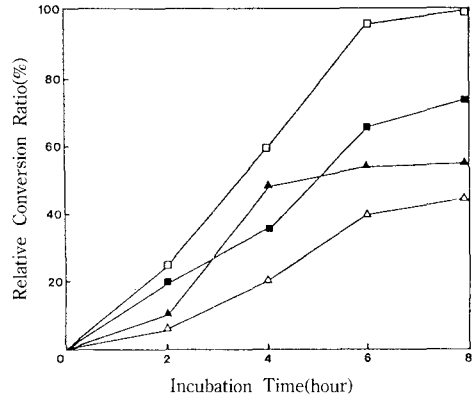


Fig. 3. Effect of phosphate buffer concentration on conversion of 5'-XMP to 5'-GMP by coupled reaction. The reaction mixture was contained 1.8 μmoles 5'-XMP, 240 μmoles $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 120 μmoles tris-maleate buffer(pH 8.0), 7.5 μmoles AMP, 83.5 μmoles glucose.

-▲- : 0.0 M, -■- : 0.05 M, -□- : 0.1 M, -△- : 0.2 M

보였으며 5'-GMP 분해 활성에 있어서도 acetone 건조 효모보다 낮은 것으로 나타났다. 따라서 동결 건조 효모를 ATP 재생계의 효소원으로 선정하였으며 다음 실험에 사용하였다.

공역 전환 반응에 미치는 glucose 농도의 영향 :

Glucose는 glycolysis를 통해 효모의 ATP 재생을 위한 에너지원으로서 이용되는데 XMP aminase와 효모의 ATP 재생계와의 공역 전환 반응에 미치는 효과를 검토하기 위해 반응계에 glucose 농도를 변화시키면서 전환율을 조사한 결과 0.1 M glucose에서 가장 높은 전환율을 보였으며 0.1 M 이상의 glucose에서 전환율이 점차 감소함을 알 수 있었다(Fig. 2).

공역 전환 반응에 미치는 phosphate buffer 농도의 영향 :

ATP의 재생계의 효소원으로서 효모는 adenylate kinase와 glycolysis를 통해 AMP를 ADP와 ATP로 인산화시킨다(Tochikura *et al.*, 1961). 이 때 무기 인산의 농도는 AMP 대사의 영향을 미치는데 AMP는 낮은 농도나 높은 농도의 무기 인산에서 다른 purine계 nucleoside나 nucleotide로 분해되고 적당한 농도의 무기 인산에서 ADP와 ATP로 인산화되는 것으로 밝혀졌다. 따라서 공역 전환 반응에 미치는 무기 인산 농도의 영향을 조사한 결과 0.1 M에서 가장 높은 전환율을 보였다(Fig. 3).

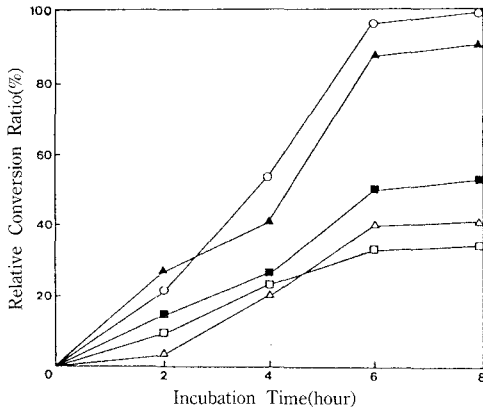


Fig. 4. Effect of AMP concentration on conversion of 5'-XMP to 5'-GMP by coupled reaction. The reaction mixture was contained 1.8 μ moles 5'-XMP, 240 μ moles $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 120 μ moles tris-maleate buffer(pH 8.0), 83.5 μ moles glucose, 166.5 μ moles potassium phosphate buffer(pH 8.0).
 -□- : 0 M, -△- : 2 M, -■- : 4 M, -○- : 6 M, -▲- : 8 M

공역 전환 반응에 미치는 AMP 농도의 영향 : 반응계에 AMP를 고농도로 첨가할 경우 AMP는 ADP나 ATP로 되지 않고 IMP로 전환하는 것으로 알려졌다(Tochikura *et al.*, 1961). 따라서 공역 전환 반응에 미치는 AMP 농도의 영향을 조사하기 위하여 AMP 농도를 변화시키면서 전환율을 조사한 결과 6 mM AMP에서 최적을 나타내었으며 그 이상의 농도에서는 전환율이 감소하였다(Fig. 4).

공역 전환 반응에 미치는 pH 및 온도의 영향 : 공역 전환 반응에 미치는 pH 및 온도의 영향을 Fig. 5에 나타내었다. 공역 전환 반응에 있어서 초기 pH의 영향을 조사하기 위하여 반응계의 pH를 6.6에서 8.6까지 변화시키면서 전환 반응을 수행한 결과 최적 pH는 7.4였으며, 반응 온도의 영향을 알아보기 위하여 온도를 31°C에서 43°C까지 변화시켜 반응을 수행한 결과 40°C에서 가장 높은 전환율을 보였다.

공역 전환 반응에서 효모의 ATP 재생 활성과 XMP aminase 양의 비율

XMP aminase 농도의 영향 : 공역 전환 반응에 미치는 XMP aminase 농도의 영향을 조사하기 위하여 반응 혼합액 내의 XMP aminase의 농도를 0 unit/ml에서 108 unit/ml까지 변화시켜 반응을 수행한 결과 Fig. 6의 a)에서 볼 수 있는 바와같이 XMP aminase 양을 36 unit/ml보다 2배, 3배 더 많은 양으로 반응계에 첨가하였을 경우에도 전환율이 36 unit/ml 첨가하였을 때와 비슷하거나 그보다 낮았다.

효모 농도의 영향 : 공역 전환 반응에 사용된 XMP aminase와 효모 농도의 비율을 결정하기 위해 반응 혼합액 내의 효모의 농도를 20 mg/ml에서 80 mg/ml로 변화시켜 반응을 수행한 결과 Fig. 6의 b)에서 알 수 있듯이 효모의 농도를 20 mg/ml에서 60 mg/ml까지 증가시켰을 때는 효모 농도의 증가에 따라 전환율이 증가하였으나 효모 농도를 80 mg/ml 사용했을 때보다 전환율이 증가하지 않았다.

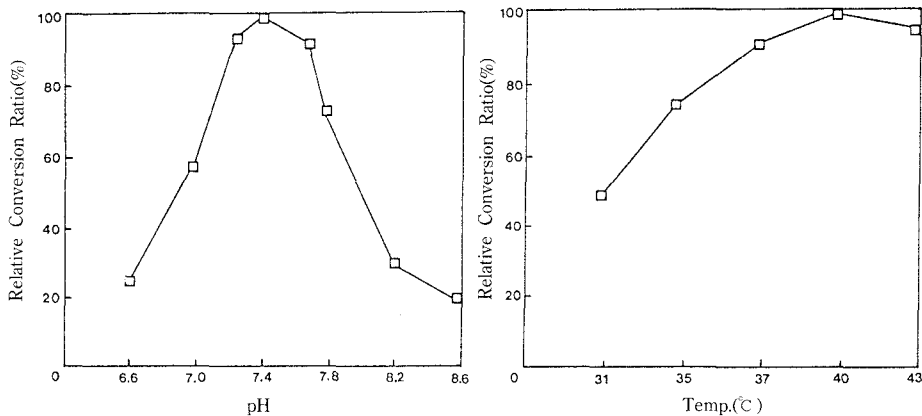


Fig. 5. Effect of pH and temperature on conversion of 5'-XMP to 5'-GMP by coupled reaction. The reaction mixture was contained 1.8 μ moles 5'-XMP, 240 μ moles $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 120 μ moles tris-maleate buffer(pH 8.0), 7.5 μ moles AMP, 83.5 μ moles glucose, 166.5 μ moles potassium phosphate buffer(pH 8.0).

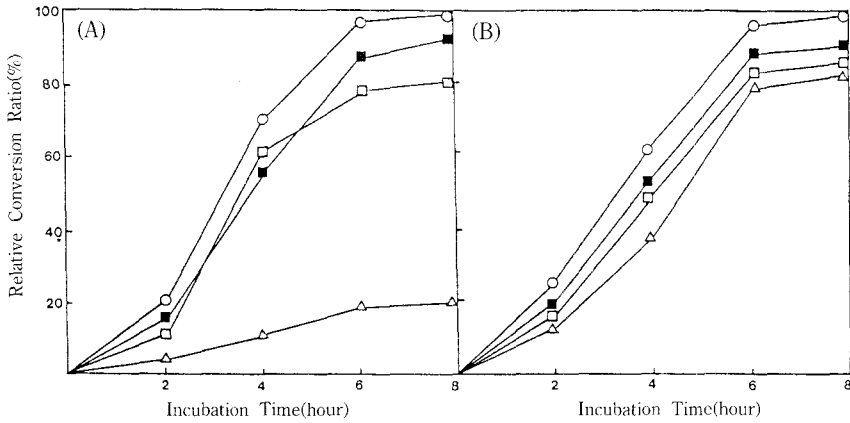


Fig. 6. Effect of concentration of XMP aminase and yeast cells on conversion of 5'-XMP to 5'-GMP by coupled reaction. The reaction mixture was contained 100 mM glucose, 1.8 mM 5'-XMP, 17 mM MgCl₂, 240 mM (NH₄)₂SO₄, 120 mM tris-maleate buffer(pH 7.4), 6 mM AMP, 100 mM potassium phosphate buffer(pH 7.4). (A) The concentration of yeast cells was fixed at 60 mg/ml and the concentration of XMP aminase was changed as follows.
 -△- : 0 unit/ml, -■- : 36 unit/ml, -○- : 72 unit/ml, -□- : 108 unit/ml
 (B) The concentration of XMP aminase was fixed at 36 unit/ml and the concentration of yeast cells was changed as follows.
 -△- : 20 mg/ml, -■- : 40 mg/ml, -○- : 60 mg/ml, -□- : 80 mg/ml

반응 최적 조건에서 5'-XMP의 5'-GMP로의 전환

상기의 실험으로부터 최적화된 반응 혼합액에

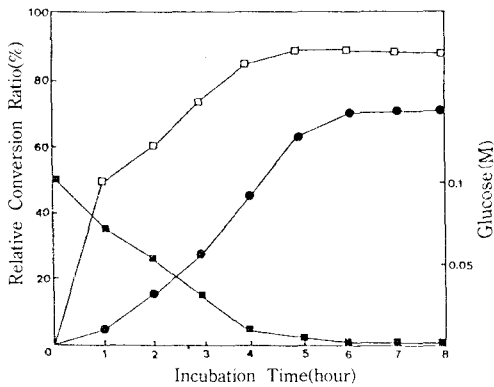


Fig. 7. Conversion of 5'-XMP to 5'-GMP by coupled reaction. The reaction mixture was contained 1.8 mM 5'-XMP, 17 mM MgCl₂, 240 mM (NH₄)₂SO₄, 120 mM tris-maleate buffer (pH 7.4), 6 mM AMP, 100 mM potassium phosphate buffer(pH 7.4) and 36 unit/ml XMP aminase. As the source of ATP, 60 mg/ml yeast cells and 6 mM ATP was used, respectively.
 Glucose concentration: -■-
 Conversion ratio(%): -●- (yeast cells) -▲- (ATP)

XMP aminase 36 unit/ml와 동결 건조 효모 60 mg/ml을 가하여 5'-XMP의 5'-GMP로의 전환 반응을 수행한 결과 Fig. 7에서 알 수 있듯이 1.8 mM(65.6 mg/100 ml) 5'-XMP의 약 71%가 5'-GMP로 전환되었다. 한편 ATP원으로서 동결 건조 효모 대신 분석용 ATP를 6 mM 가했을 경우 5시간만에 89%의 전환율을 보였다.

摘 要

에너지 요구 반응인 5'-XMP의 5'-GMP로의 효소적 전환을 위해 *Escherichia coli* CH 41(*guaB* mutant)로부터 추출 정제한 XMP aminase에 *Saccharomyces cerevisiae*의 glycolysis를 통한 ATP 재생계를 도입하였다. 전환 반응의 ATP원으로는 동결 건조 효모가 가장 효율적이었으며, 전환 반응의 최적 온도 및 pH는 각각 40°C, pH 7.4였다. 또한 100 mM glucose, 100 mM inorganic phosphate 및 6 mM AMP에서 가장 높은 전환율을 보였다. 상기의 조건에서 36 unit/ml의 XMP aminase가 이용될 경우 효모 농도는 60 mg/ml로 충분하였으며, 최적 조건에서 6시간 반응시 1.8 mM(65.6 mg/100 ml) 5'-XMP의 약 71%가 5'-GMP로 전환되었다.

参考文献

- Abe S. and Udagawa K. 1966. Process for Producing Guanosine 5'-Monophosphate by Fermentation. Japanese Patent Publication. No. 41-13797.
- Avron M. 1960. Photophosphorylation by Swiss-Chard Chloroplasts. *Biochem. Biophys. Acta.* **40**: 257-264.
- Demain A. L., Jacson M., Vitali R. A., Headlin, D. and Jacob T. A. 1966. Production of Guanosine 5'-Monophosphate and Inosine 5'-Monophosphate by Fermentation. *Appl. Microbiol.* **14**: 821-825.
- Fujio T., Kotani Y. and Furuya A. 1984. Production of 5'-Guanylic Acid by Enzymatic Conversion of 5'-Xanthylic Acid. *J. Ferment. Technol.* **62**(2): 131-137.
- Furuya A., Abe S. and Kinoshita S. 1970. Production of Nucleic acid-Related Substances by Fermentative Processes part XXXV. *Amino Acid and Nucleic Acid.* **22**: 9-14.
- Furuya A., Okachi R., Takayama K. and Abe S. 1973. Production of Nucleic acid-Related Substances by Fermentative Processes. *Biotechnol Bioeng.* **18**: 289-294.
- Gardener C. R., Colton C. K., Langer R. S., Hamilton B. K., Archer M. C. and Whitesides G. M. 1974. Enzymatic Regeneration of ATP from ADP: Part I. Thermodynamics, Kinetics and Process Development. *Enzyme Engineering.* E. K. Pye and L. B. Wingard, Jr., ed., Plenum Press, New York. **2**: 209.
- Kuninaka A., Kobi M. and Sakaguchi K. 1964. History and Development of Flavor Nucleotides. *Food Technol.* **18**: 289-293.
- Lambden, P. R. and W. T. Drabble. 1973. Assay of IMP dehydrogenase. *J. Bacteriol.* **115**: 992-997.
- Laufer L. and Guteho S. 1964. Preparation of 5'-Polyphosphate Nucleotides. U.S. Patent. 3,138,539.
- Lieberman I. 1956. Inorganic Triphosphate Synthesis by Muscle Adenylate Kinase. *J. Biol. Chem.* **219**: 307.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Far A. L. and Randall R. J. 1951. Protein Measurement With the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 285.
- McCarty R. E. 1971. Preparation and Properties of Phosphorylating Subchloroplast Particles. *Meth. Enzymol.* **23**: 302.
- Maruyama A., Nishi T., Ozaki A., Ito S. and Fujio T. 1986. Construction of a Plasmid for High Level Expression of XMP Aminase in *Escherichia coli*. *Agric. Biol. Chem.* **50**(7): 1879-1884.
- Murata K., Tani K., Kato, J. and Chibata I. 1981. Glycolytic pathway as an ATP generation system and its application to the production of glutathione and NADP. *Enzyme Microb. Technol.* **3**: 233.
- Nemet M. I., Solomon B. A., Langer R. S. and Colton C. K. 1975. Enzymatic Regeneration of ATP from AMP and ADP: Kinetic Studies with the Coupled Enzyme System. *Enzyme Engineering.* E. K. Pye and H. H. Weetall, Plenum Press, New York. **3**: 85-91.
- Ogata K., Nakao Y., Igarashi S., Omura E., Sujio Y., Yoneda M. and Suhara I. 1963. Studies on 5'-phosphodiesterase in Microorganisms, Part II: Properties and Application of *Penicillium* 5'-phosphodiesterase. *Agric. Biol. Chem.* **27**: 110-115.
- Sakamoto N. 1972. GMP synthetase(*Escherichia coli*). *Meth. Enzymol.* **51**: 213-218.
- Smith M. and Khorana H. G. 1957. Nucleoside Polyphosphates. VI. An Improved and General Method for the Synthesis of Ribo- and Deoxyribonucleoside 5'-Triphosphates. *J. Amer. Chem. Soc.* **80**: 1141.
- Tanaka A. and Hironaka J. 1972. Studies on Enzymatic Production of ATP. *Agric. Biol. Chem.* **36**: 867.
- Tochikura T., Kuwahara M., Yagi S., Okamoto H., Tomimaga Y., Kino T. and Ogata K. 1961. Fermentation and Metabolism of Nucleic Acid-Related Compounds in Yeast. *J. Ferment. Technol.* **45**: 511.