

Aspergillus oryzae 에 있어서 L-Tyrosine 의 분해효소에 관한 연구

鄭 東 孝 · 朴 性 五* · 金 暎 辰**

(건국대학교 공과대학, **가정대학 · *서울여자대학)

(1971. 7. 10 수리)

Studies on the Degradation of L-Tyrosine by *Aspergillus oryzae*

Dong Hyo Chung, Sung Oh Park,* Young Jin Kim**

College of Engineering, **College of Home Economics, Kon-kuk University · *Seoul Woman's College

(Received July 10, 1971)

Summary

1. L-Tyrosine- α -ketoglutaric transaminase and *p*-hydroxyphenylpyruvic acid oxidase are distributed in *Aspergillus oryzae*.
2. L-Tyrosine oxidation in extracts of acetone powder, cell free extract and culture liquid of *Aspergillus oryzae* cultivated in the shaking culture are considerably accelerated by the addition of α -ketoglutaric acid and then formation of glutamic acid was identified by chromatography method.
3. The roles of α -ketoglutaric acid and pyridoxal phosphate have been shown to be an amino group acceptor in a transamination reaction.
4. Enzyme systems of an extracts of acetone powder and cell free extract also rapidly oxidized L-tyrosine and *p*-hydroxyphenylpyruvic acid to homogentisic acid.
5. The optimum pH for L-tyrosine- α -ketoglutaric acid transaminase was pH values of 6.0 and 6.5, and that for *p*-hydroxyphenylpyruvic acid oxidase was at pH values of 7.5.

서 론

근래 된장을 진공포장하여 저장하게 되면 미립자의 결정이 생겨서 상품 가치가 저하된다. 이 미립자는 L-tyrosine 으로 그 용해도가 낮아 결정으로 석출되는 것이라 한다.^(1,2)

L-tyrosine 의 분해 과정의 연구는 포유동물의 경우에서는 많이 연구되어 있다. 즉 L-tyrosine 은

α -ketoglutaric acid 에 transamination 하므로써 *p*-hydroxyphenylpyruvic acid 로 되고⁽²⁻⁶⁾ 이는 다시 homogentisic acid 로 산화되어⁽⁷⁾ 최후에 maleylacetoacetic acid 와 fumarylacetoacetic acid 를 거쳐 acetoacetic acid 로 전환 된다.⁽⁸⁾

그러나 미생물의 경우는 *Pseudomonas* 속에서 몇 개의 연구와 국균에 대하여 植村은 *Aspergillus oryzae* 30균주가 L-tyrosine 에서 *p*-hydroxyphenylpyruvic acid 를 생성함을 연구 했을 뿐 그 외 L-

tyrosine 분해효소에 대하여는 연구가 거의 없다.⁽⁹⁾ 간장, 된장 제조에 관계되는 균주가 포유동물의 경우와 같이 L-tyrosine 을 분해시켜 주면 이 결정은 없어져 상품가치를 높일수 있을 것으로 생각하고 우선 *Aspergillus oryzae* 중 L-tyrosine 을 분해하는 균주를 분리하고 이의 대사과정을 조사하여 그 결과의 일부를 보고 한다.

실 험

1. 균 주 : 국균(*Aspergillus oryzae*) 180 균주를 Table 1의 사면배지에 접종하여 L-tyrosine의 결정이 없어지는 균주 중 한 균주를 선별하여 이를 시험균으로 하였다.

Table 1. Composition of Screening Medium

Glucose	1.0%
L-Tyrosine	0.5"
KH ₂ PO ₄	0.5"
K ₂ HPO ₄	0.5"
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.01"
MnSO ₄ · 7H ₂ O	2ppm
FeSO ₄ · 7H ₂ O	2ppm
Agar	1.5%
Initial pH	5.5"

Table 2. Composition of Medium Producing Enzyme

Glucose	3.0%
Casein hydrolyzate	0.3"
L-Tyrosine	0.5"
Yeast extract	0.2"
NaCl	0.5"
KH ₂ PO ₄	0.5"
K ₂ HPO ₄	0.5"
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.04"
MnSO ₄ · 7H ₂ O	2ppm
FeSO ₄ · 7H ₂ O	2ppm
Initial pH	5.5%

2. 세포 외 조효소(Crude enzyme)액의 조제 : Table 2의 배지를 진탕후라스크에 70 ml씩 넣고 살균하여 위의 균주를 접종하여 40시간 배양한 후 그 배양액을 그대로 여과하고 그 여액을 세포외조효소액으로 하였다.

그리고 균체는 다음과 같이 처리하였다.

3. Acetone powder의 조제와 Acetone powder extract

상기 균체의 일정량을 L-tyrosine의 결정이 없어질때 까지 수세하고 여기에 찬 acetone 3~5 배량을 가하여 마쇄 시키면서 탈수를 껴하였다. 다시 소정의 물과 10배의 찬 acetone을 가하여 교반하고 이를 glass filter로 여과하여 침전물을 찬 acetone으로 5~6회 씻고 최후에 무수 ether로 2회 씻어 하룻밤 desiccator에서 진공 건조시켜 2주일간 냉장소에 보관하면서 사용하였다.

이의 1g을 취하여 pH 6.2, M/25 phosphate buffer 50 ml로 한 시간 동안 50°C에서 추출하여 3,000 rpm으로 10분간 원침하여 그 상등액을 acetone powder extract로써 조효소용액으로 사용하였다.

4. Cell free extract : 상기의 균체 1g에 모래 3g과 pH 6.2, M/25 phosphate buffer 10 ml를 가하여 빙수 중에서 잘 마쇄하고 이를 물 30 ml로 보정하여 9,000 rpm으로 2분간 원침하여 그 상등액을 cell free extract로서 조효소액으로 하였다.

5. L-Tyrosine의 Transamination : 시험관에 4 mM L-tyrosine 1 ml와 pH 6.6, McIlvaine buffer 1 ml, 효소용액 1 ml을 기본반응액으로 하여 여기에 필요에 따라서 5 mM α -ketoglutaric acid 1 ml와 1 mM pyridoxal phosphate 1 ml를 가하여 40°C에서 3시간 반응시켜 그의 일정량을 취하여 분석에 사양하였다.

6. *p*-Hydroxyphenylpyruvic acid에서 Homogentisic acid로의 산화 : L자형 시험관에 기질로서 5 μ M *p*-hydroxyphenylpyruvic acid 2 ml와 pH 6.2, M/25 phosphate buffer 1ml 및 조효소액 1ml를 가하여 기본 반응액으로 하였다. 다시 필요에 따라서 5M ascorbic acid 1ml를 가하고 공기를 충분히 공급하기 위하여 Monod식 진탕배양기에서(38°C) 3시간 반응시켜 그의 일정량을 취하여 분석에 사용하였다.

7. L-Tyrosine의 정량⁽¹⁰⁾ : L-Tyrosine의 정량은 paper chromatography법을 개량하여 정량법을 확립하였다. 즉 반응의 일정량을 Toyo 여지(No. 50)에 길이 2 cm(폭 5 mm)로 spot 하고 n-butanol : acetic acid : water=4 : 1 : 2의 혼합액으로 15~20시간 전개하였다. 전개된 여지는 draft에서 전개제의 냄새가 없어질 때 까지 충분히 풍건하였다.

다음 0.2% ninhydrin acetone 용액을 여지의 전면에서 분무하여, 60°C에서 3분간 예비발색 시켰다.

이렇게 하여 L-tyrosine의 위치를 확인하고, 그 희미한 spot의 중심에 2% ninhydrin acetone 용액을 pipette로써 균일히 0.3 ml 정도 침투되게 한다. 곧 60°C에서 3분간 다시 가열하여 acetone이 완전히 증발되고 나면, pH 7.0, M/25 phosphate buffer로 여지의 앞 뒤를 충분히 분무한다. 이를 다시 60°C에서 40분간 가열한다. 발색된 L-tyrosine의 spot 사방 약 5 mm 정도의 여백을 남기고 여지를 끊어 크릴프르 輪狀으로 한다. 띠 띠 준비한 증기탕에 여지를 넣어서 90초간 완전히 발색시킨다. 발색이 끝난 여지의 spot 만을 거의 같은 면적으로 오려서 시험관에 넣고 pH 7.0, M/25 phosphate buffer 용액과 methanol을 각각 2.5 ml씩 가하여 30°C에서 약 3시간 방치하여 색소를 완전히 용출시킨다. 이를 광전비색계(570 m μ)에서 흡광도를 측정하였다. 동시에 전개한 표준 L-tyrosine의 흡광도에서 표준곡선을 작성하여 이것에 따라 L-tyrosine을 정량하였다.

8. L-Glutamic acid의 정성: L-glutamic acid는 L-tyrosine의 정량여지에서 Rf 값으로 동정하였다.

9. *p*-Hydroxyphenylpyruvic acid와 α -ketoglutaric acid의 정성: 반응액의 일정량에 0.4%, 2,4-dinitrophenylhydrazine-2N HCl 용액을 가하여 2,4-dinitrophenylhydrazone을 형성시켜 이 침전을 여지 위에 모아 1.5N NaOH 용액 수적을 가하여 용해시켜, 여지에 spot 하여 전개제(n-butanol: ethanol: water=5:1:4)로서 상법에 따라 전개하였다. 이 2,4-dinitrophenylhydrazone은 착색되어 있으므로 발색은 필요 없었다. 이들 Rf 값은 다음과 같다. (11)

α -Ketoglutaric acid의 R_f=0.26

p-Hydroxyphenylpyruvic acid의 R_f=0.54

10. *p*-Hydroxyphenylpyruvic acid의 정량과 Homogentisic acid의 정성: 반응액은 6N H₂SO₄ 1 ml로 산성화시키고 10배의 peroxide free ether로 추출하였다. 이 ether층의 추출물은 다시 물에 이전시켜 그 일정량을 취하여 *p*-hydroxyphenylpyruvic acid를 다음과 같이 정량하였다. 즉 시료의 일정량에 0.1% 2,4-dinitrophenylhydrazine-2N HCl 용액을 가하여 hydrazone을 형성시켜 toluol 8 ml로 추출하고 나서, 수층은 버리고 10% Na₂CO₃ 6 ml에 이전시켜 여기에 4N NaOH 용액 2 ml를 가하여 발색하였다. 일정 시간 방치 후 470 m μ 에서 비색 정량하여, 그 표준곡선에 따라 정량하

였다. (12)

한편 상기 물층을 여지에 spot 하고 이를 물포화 butanol에다 몇 방울의 개미산을 가한 혼액을 전개용액으로 하여 상법에 따라 상승시켰다. (6)

전개가 끝난 여지는 충분히 풍건시켜, 암모니아성 질산은 용액(0.1N Ag NO₃ in 5N NH₄OH) 및 0.1M Na₂S₂O₃ 용액에 한번씩 담갔다가 최후에 수세하면 흰 바탕에 검은 spot를 확인할 수 있었다. Homogentisic acid의 R_f 값은 0.68~0.70이었다.

결과 및 고찰

1. L-Tyrosine- α -ketoglutaric acid transaminase의 Coenzyme: 일정량의 기질에다 acetone powder extract 만을 작용시키면 반응이 진행되지 않았으므로, 여기에서 pyridoxal phosphate와 α -ketoglutaric acid를 각각 가하여서 반응시키고 한편 pyridoxal phosphate 및 α -ketoglutaric acid를 동시에 가하여 작용시킨 결과는 Fig. 1과 같다.

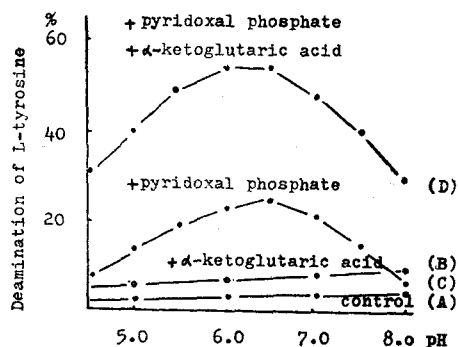


Fig. 1. Effect of α -ketoglutaric acid and pyridoxal phosphate

Fig. 1과 같이 L-tyrosine과 acetone powder extract 만으로는 반응이 진행되지 않았으며 여기에 transaminase의 coenzyme인 pyridoxal phosphate를 가하여도 거의 같은 결과를 나타냈다. 그러나 α -ketoglutaric acid를 가하는 경우에는 반응이 진행되어 -NH₂기가 -CO기로 혐기적으로 옮겨지는 것을 암시해 주었다. (6)

한편 L-tyrosine 기질에 pyridoxal phosphate와 α -ketoglutaric acid를 동시에 가하여 주므로서 반응은 2배 정도로 진행되었다. (3,5) 고로 이 반응은 transamination임을 알 수 있었으며 더욱 본 효소의 L-tyrosine- α -ketoglutaric acid transaminase의 coenzyme는 pyridoxal phosphate임을 명백히 증명해 주고 있다. (13) 그리고 이 효소의 최적 pH는 6.0~6.5이었다.

2. L-Tyrosine의 Deamination : L-Tyrosine을 기질로 하여 여러가지 조효소용액을 반응시킨 결과는 Fig. 2와 같다.

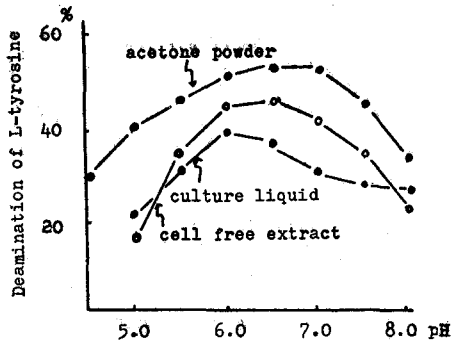


Fig. 2. Deamination of L-tyrosine

Fig. 2와 같이 acetone powder extract, cell free extract 및 culture liquid는 다같이 효소의 활성이 있었다. L-tyrosine의 분해 생성물인 *p*-hydroxyphenylpyruvic acid가 동정되는 것으로 봐서 이 효소는 L-tyrosine- α -ketoglutaric acid transaminase의 작용이 있음을 알 수 있다. 한편 포유동물의 L-tyrosine- α -ketoglutaric acid transaminase의 최적 pH는 7.5이나 이 국균의 효소는 그 최적 pH가 낮아 6.0~6.5 전후이었다.

3. *p*-Hydroxyphenylpyruvic acid에서 Homogentisic acid로의 산화 : 기질에 acetone powder extract만을 가했을 때는 반응은 Fig. 3과 같이 별로 진행되지 않았으나 여기에 ascorbic acid를 가하여 반응시키는 경우는 그 속도가 배나 진행이 되는 것을 알 수 있다.

고로 *p*-hydroxyphenylpyruvic acid의 산화효소인 *p*-hydroxyphenylpyruvic acid oxidase에 ascorbic acid가 어떤 역할을 하는 것 같이 생각이 된

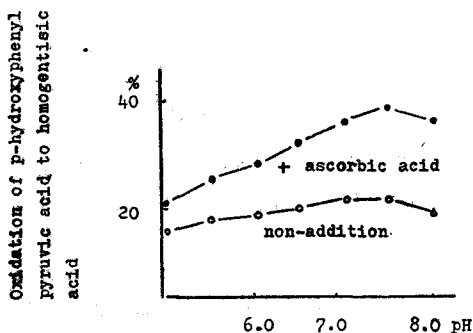


Fig. 3. Effect of ascorbic acid

다. 그리고 이 효소의 최적 pH는 7.5이었다.

모르뫼트에 있어서 ascorbic acid결핍 상태의 경우에는 *p*-hydroxyphenylpyruvic acid의 배설이 많아지나, 이 때 ascorbic acid의 투여로 그 양이 감소되는 것으로 봐서 *p*-hydroxyphenylpyruvic acid의 산화에는 고등동물이나 미생물의 효소에도 다 같이 어떤 관계가 있는 것으로 생각이 된다.⁽¹⁴⁾ 더욱 산화효소인 *p*-hydroxyphenylpyruvic acid oxidase는 benzene핵의 수산화, 측쇄의 전이(轉移) 및 측쇄의 산화적 탈탄산화(脫炭酸化) 작용을 일으키는 특유의 효소이며, 보통 동물의 경우 최적 pH는 6.3~7.8이었고, 국균의 경우도 pH 7.5이었다.

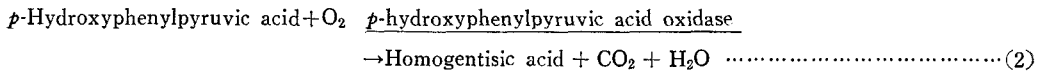
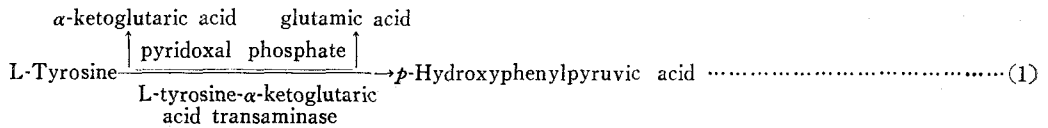
이 효소의 작용에 ascorbic acid의 역할은 아직 해명을 하지 못하고 있으나, benzene핵에 hydroxyl기를 붙이는데나 *p*-hydroxyphenylpyruvic acid의 수산화에 필요하게 되는 것 같다. 그리고 이 효소로 *p*-hydroxyphenylpyruvic acid가 산화되어 homogentisic acid로 전환될 때 기질 한 분자당 2원자의 산소가 소비되어, 한 분자의 CO₂가 생성되는 것이 증명되어 있다. 즉 *p*-hydroxyphenylpyruvic acid + O₂ → homogentisic acid + CO₂ + H₂O. 이 효소의 저해제는 많이 존재하게 되며 더욱 기질인 *p*-hydroxyphenylpyruvic acid가 5 μM 이상의 경우에도 저해하게 된다. 그러나 ascorbic acid로 약간 저해가 감소 된다고 한다.⁽¹⁵⁾

그리고 이 효소의 절대적 저해제로는 SH기의 저해제와 같으며 0.001M의 α , α' -dipyridyl은 강한 저해제이다. 한편 *m*-hydroxyphenylpyruvic acid는 0.002M 농도에서 25%가 저해, 0.0005M 농도에서는 90%가 저해된다고 한다. 그리고 *o*-hydroxyphenylpyruvic acid, 2,5-dihydroxyphenylalanine, 2,5-dihydroxyphenylpyruvic acid, *p*-hydroxyphenylpyruvic acid도 상대적 저해제이며, diethyldithiocarbamate는 강한 저해제이다. 이는 Ca⁺⁺의 첨가로 약간 감소가 된다고 한다.

이상의 실험의 결과로서 *Aspergillus oryzae*는 L-tyrosine을 다음과 같이 분해하는 것을 알 수 있다(반응(1), (2)).

생성된 homogentisic acid는 homogentisicase로 분해되어 비로서 개환되고 최후에 fumaric acid와 acetoacetic acid로서 고등동물과 같이 대사 되는 것 같이 추측이 된다.

이상과 같이 *Aspergillus oryzae* 균주 중에는 L-tyrosine을 분해시켜 주는 효소가 있으니 이런 균



주의 것을 된장, 간장 제조에 이용하면 L-tyrosine 의 석출을 어느정도 막을 수 있을 것 같다.

요 약

1. *Aspergillus oryzae* 의 균체에는 L-tyrosine- α -ketoglutaric acid transaminase 와 p-hydroxyphenylpyruvic acid oxidase 가 존재해 있다.
2. L-Tyrosine 산화효소는 액침배양한 *Aspergillus oryzae* 의 acetone powder, cell free extract 및 배양액에도 존재하며 L-tyrosine 은 α -ketoglutaric acid 의 첨가로 더욱 빨리 전환되었다.
3. α -Ketoglutaric acid 와 pyridoxal phosphate 는 transamination 의 amino 기의 수용체로 생각되었다.
4. 이들 효소계는 L-tyrosine 과 p-hydroxyphenylpyruvic acid 를 homogentisic acid 로 산화시켰다.
5. Ascorbic acid 는 p-hydroxyphenylpyruvic acid 가 homogentisic acid 로 산화되는데 특별한 역할을 하는 것 같다.
6. L-Tyrosine- α -ketoglutaric acid transaminase 와 p-hydroxyphenylpyruvic acid oxidase 의 최적 pH 는 각각 pH 6.0~6.5 와 pH 7.5 이었다.

참고문헌

1. 海老根 英雄, 杉浦 能婦子: 味噌技術(日本),

No. 62(1958).
 2. 海老根 英雄; 味噌技術(日本), No. 64(1958).
 3. Bert, N. La Du and Greenberg, D.M.: *J. Biol. Chem.*, **190**, 245 (1951).
 4. Bert, N. La Du and Fink, M.: *Federation Proc.*, **10**, 212 (1951).
 5. Knox, W.E. and Le May-Knox, M.: *Biochem. J.*, **49**, 686 (1951).
 6. Schepartz, B.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 293 (1951).
 7. Crandall, D. I.: *J. Biol. Chem.*, **212**, 565 (1955).
 8. Knox, W. E. and Edward, S. W.: *Federation Proc.*, **13**, 242 (1954).
 9. 植村 定治郎: 日農化, **15**, 353 (1939).
 10. 渡邊 泰, 渡邊 喜久子, 小出 英樂, 齊藤 董, 志村憲助: 日農化, **34**, 620 (1960).
 11. Dorian, C., Nora, F. and Giovanni, T.: *Nature*, **163**, 568(1949).
 12. Friedmann, T. E. and Haugen, G. E.: *J. Biol. Chem.*, **149**, 415 (1943).
 13. Canellakis, Z. N. and Philip, P. C.: *J. Biol. Chem.*, **222**, 63 (1956).
 14. Sealock, R. R. and Silberstein, H. E.: *J. Biol. Chem.*, **135**, 251 (1940).
 15. Bert, N. La Du and Vincent, G. Z.: *J. Biol. Chem.*, **217**, 777 (1955).