

# Bacteria 가 生産하는 Cystinedesulfhydrase 에 관한 研究

(第二報) L-Cysteine 誘導體의 酵素的 合成에 關하여

崔 瑢 鎭·梁 漢 喆\*

同德女子大學 食品營養學科

\*高麗大學校 農科大學 食品工學科

Studies on Cysteine desulfhydrase Produced by Bacteria

(Part II) Enzymatic Preparation of L-Cysteine

Derivatives by Cystinedesulfhydrase from *Aerobacter aerogenes*.

Choi, Yong-Jin · \*Yang Han-Chul

Dong Duck women's college.

\*College of agriculture, Korea University.

(Received January 29, 1974)

## Abstract

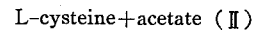
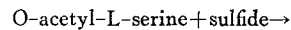
1. With cystinedesulfhydrase(E. C. 4. 4. 1. 1.) from *Aerobacter aerogenes*, an enzyme which catalyzes the stoichiometric conversion of L-cysteine to pyruvate, ammonia and sulfide, reversibility of the degradation of L-cysteine was investigated.

It was found that the enzyme also catalized the reverse reaction of  $\alpha, \beta$ -elimination to synthesize L-cysteine derivatives from pyruvate, ammonia and sulfides when large amounts of substrates were added to the reaction mixtures.

2. The synthetic reaction by cystinedesulfhydrase proceeded linearly with incubation time and enzyme concentrations.

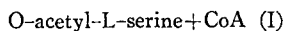
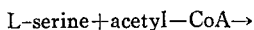
The optimal pH for the synthetic reaction was 10.0.

3. The results of the isolation and identification of the products showed that the L-cysteine derivatives synthesized by this enzymatic method were identical with S-methyl-L-cysteine and S-ethyl-L-cysteine respectively.



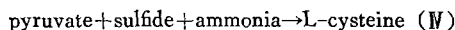
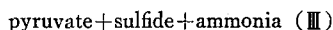
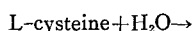
## 序 論

生物體에 있어서 L-cysteine 의 生合成은 現在까지 알려진 바 그炭素骨格은 어느 경우에도 L-Serine 으로부터 由來된다고 한다. 따라서 微生物에서 얻어진 酵素에 의한 L-cysteine 의 合成 역시 L-serine 으로부터 다음 二段階의 反應을 거쳐 合成되고 있다<sup>(1-9)</sup>. (反應 I 과 II).



反應 I 은 serine transacetylase 에 의해 촉매되며 이酵素는 bacteria<sup>(1,2)</sup>, 高等植物<sup>(3)</sup> 등에서 發見되고 있으며 한편 反應 II 는 O-Acetylserine sulfhydrase 가 촉매하며 이酵素 역시 bacteria<sup>(2)</sup>, yeast<sup>(4)</sup>, *neurospora*<sup>(4,5)</sup> 및 高等植物<sup>(6,7)</sup> 등에 널리 分布되어 있음이 報告되고 있다. 특히 最近에는 *Salmonella typhimurium* 에서 誘導된 上記 두酵素에 의한 L-cysteine 의 生合成과 이들 酵素의 精製法, 分子量 및 分子構造 등의 物理化學的 性質에 對한

많은 연구가 進行 되고 있다<sup>(1,2,8)</sup>. 그러나 筆者等은 L-cysteine의 分解反應(反應Ⅲ)을 定量的으로 測定하는 cystinedesulfhydrase에 관한 研究<sup>(10)</sup>를 進行해 오던 바 이 酵素 역시 tyrosinephenol lyase<sup>(11-14)</sup> 및 tryptophanase<sup>(15-17)</sup>와 같은 소위 多機能 酵素의 機能을 가지고 있을 것으로 推定되어 지금까지 非可逆的이라고 생각되고 있는 L-cysteine의 分解反應의 逆反應(Ⅳ)에 依해 즉 pyruvic acid를 炭素骨格으로 해서 L-cysteine 및 이의 誘導體인 含硫 amino acid의 酵素的 合成方法에 對한



研究를 계속해 오던 중 *Aerobacter aerogenes*로 同定된 土壤分離菌株에서 誘導生産된 cystinedesulfhydrase의 部分精製酵素를 使用하여 S-methyl-L-cysteine과 S-ethyl-L-cysteine을 合成하였으므로 그結果를 報告한다.

## 實驗材料 및 方法

### 1. 使用菌株

約 70餘種의 保存 및 土壤分離菌株로부터 L-cysteine 分解能이 가장 높았던 土壤分離菌 No I-3-2를 供試菌株로 選定하여 이에 대한 菌學的 諸性質을 檢討한 結果 No I-3-2菌株는 *Aerobacter aerogenes* 近緣의 菌種으로 同定되었다. <sup>(10)</sup>

### 2. 酵素的 調製

*Aerobacter aerogenes*를 table 1과 같은 組成의 培地에 30°C에서 10時間 培養하고 遠心分離하여 集菌, 10<sup>-5</sup>M pyridoxal phosphate, 10<sup>-4</sup>M EDTA, 및 10<sup>-3</sup>M β-mercaptoethanol을 포함하고 있는 0.05M potassium phosphate buffer (pH7.0)에 菌體를 懸탁시켜 15Kc, 超音波處理를 실시, 菌株를 破碎해서 Cell과 Cell debris를 遠心分離(10,000 rpm, 20分)하여 除去, 粗酵素液을 얻은 다음 硫

Table 1. Composition of the Culture Medium

L-Cysteine HCl	0.2%
Glycerol	0.1
Calcium chloride	0.2
Yeast extract	0.3
Meat extract	0.5
Poly peptone	0.5
NaCl	0.2

PH 7.5

安分割, DEAE-Sephadex column chromatography, 및 Sephadex gel-filtration 등의 精製過程을 거쳐 約 50~100倍 精製한 酵素液을 사용했다.

本酵素의 상세한 精製方法은 추후 報告하고자 한다.

### 3. 酵素活性 測定

L-cysteine·HCl 10 $\mu$ mole, potassium chloride 100 $\mu$ mole, pyridoxal phosphate 0.4 $\mu$ mole 및 Tris buffer (pH9.0) 200 $\mu$  mole을 포함하고 있는 反應液에 全量이 4.0ml가 되도록 酵素液을 加하고 30°C에서 20時間 反應시킨 다음 30% trichloro acetic acid 溶液 1.0ml를 加해 反應을 終止시키고 이때 沈澱되는 酵素蛋白質을 濾過除去하고 濾液 2.0ml를 取해 Firede mann and Haugen method<sup>(18)</sup>에 따라 分解生成된 pyruvic acid를 定量함으로서 酵素活性을 測定 하였으며 酵素單位는 1分間에 1 $\mu$ mole의 pyruvic acid를 生成하는 酵素量으로 表示했다.

### 4. 蛋白質 定量

酵素蛋白質은 280m $\mu$ 의 吸光度를 測定해서 定量하거나 또는 Lowry 등의 方法<sup>(19)</sup>에 따라 定量 하였다.

### 5. S-methyl-L-Cysteine 및 S-ethyl-L-Cysteine의 定量

柳本 Model LC-5S amino acid 自動分析機를 사용하여 試料 一定量을 70×0.9cm의 Aminex A<sub>4</sub> resin column에 吸着시키고 0.2N-sodium citrate buffer (pH3.25)로 溶出해서 定量 하였다.

### 6. NMR Spectrum의 解析

Varian A-60 NMR Spectrometer를 使用하여 測定하였으며 試料는 D<sub>2</sub>O에 溶解하였으며 內部標準物質로는 DSS를 使用 하였다.

### 7. Mass Spectrum의 解析

Hitachi RMS-4 mass spectrometer coupled with a Hitachi K-53 gas chromatograph를 使用하여 測定 하였다.

## 結果 및 考察

### 1. 反應時間 및 酵素濃도에 따른 S-methyl-L-Cysteine의 生成量

Sodium pyruvate 200 $\mu$ mole, methyl mercaptan 300 $\mu$ mole, ammonium sulfate 100 $\mu$  mole, pyridoxal phosphate 0.4 $\mu$ mole, EDTA 1 $\mu$ mole 및 ammonium chloride buffer (pH10.0) 200 $\mu$ mole를 포함하고 있

는 反應液에 0.583 units의 酵素液을 全量이 2.0 ml가 되도록 加하고 20°C의 水浴上에서 一定時間 反應시키고 反應終了와 同時 30% trichloroacetic acid 溶液 0.5ml를 加해 反應을 終止 시킨 後 沈澱된 酵素蛋白質을 濾過 除去한 濾液中的 S-methyl-L-cysteine을 定量하여 反應時間에 따른 S-methyl-L-cysteine의 生成量을 檢討한 結果는 Fig. 1과 같으며 또한 30°C에서 60分間 反應시켜 添加 酵素濃度에 따른 S-methyl-L-cysteine의 生成量

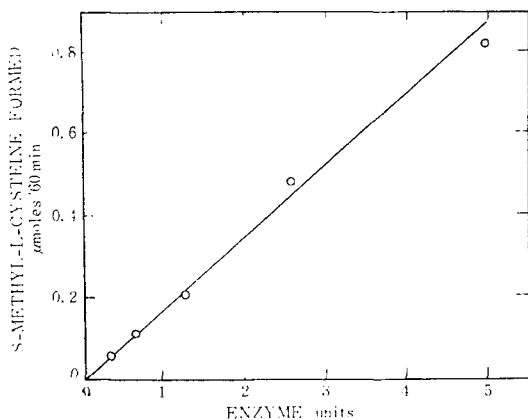


Fig. 1. Effect of Incubation Time on S-methyl L-Cysteine Formation.

The reaction conditions were described in the text. S-methyl-L-cysteine synthesized was determined as described in "Experimental" and expressed as μmoles per 2.5ml of reaction mixture.

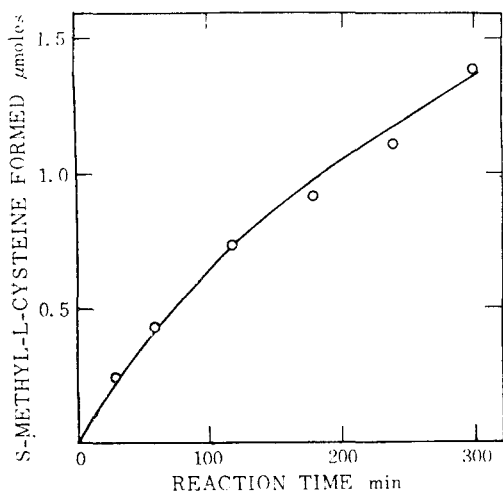


Fig. 2. Effect of Enzyme Concentration on the Synthesis of S-methyl-L-Cysteine.

The reaction conditions were described in the text. S-methyl-L-cysteine formed was determined as described in "Experimental" and expressed as μmoles per 0.25ml of reaction mixture.

은 Fig. 2와 같다. Fig 1과 2에 表示되어 있는 바와 같이 反應時間 및 酵素量이 增加함에 따라 S-methyl-L-cysteine의 生成量 역시 比例的으로 增加함을 보이고 있다.

## 2. 合成反應의 最適 pH

S-methyl-L-cysteine 合成反應에 있어서 potassium phosphate buffer (pH6.0~8.0), Tris buffer (pH 8.0~9.5), ammonium chloride buffer (pH 8.0~10.5) 등의 buffer 溶液을 사용하여 反應液의 pH를 各各 달리한 條件下에서 0.774 units의 酵素를 使用해서 30°C에서 120分間 反應시켰을 때의 S-methyl-L-cysteine의 生成量을 檢討해 본 바 Fig. 3과 같은 結果를 얻었으며 一般的으로 反應液의 pH가 8.0以下 일때는 S-methyl-L-cysteine이 거의 生成되지 않았으며 높은 pH에서 좋은 結果를 나타내고 있어 L-cysteine을 基質로 하는 分解反應에 있어서 本酵素의 最適pH는 9.0인<sup>(10)</sup> 反面 合成反應의 最適 pH는 10.0이었다.

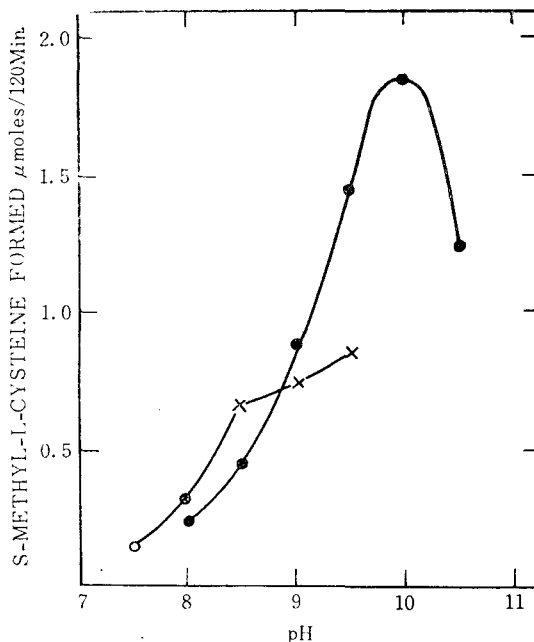


Fig. 3. Effect of pH of the Reaction Mixture on S-methyl-L-cysteine Synthesis.

The reaction conditions were described in the text. S-methyl-L-cysteine formed for 120 minutes was expressed as μmoles per 2.5ml of reaction mixture.

potassium phosphate buffer,

pH6.0~8.0: (○-○)

Tri-HCl buffer,

pH 8.0~9.5: (×-×)

Ammonium chloride buffer,

pH8.0~10.5: (○-○)

### 3. 合成한 S-methyl-L-cysteine 및 S-ethyl-L-cysteine 의 單離 및 同定.

*Aerobacter aerogenes*로부터 誘導生産한 Cysteine desulfhydrase 를 사용하여  $\alpha, \beta$ -elimination reaction 의 逆反應에 依해 酵素의 合成한 S-methyl-L-cysteine 을 反應液으로 부터 單離하여 확인 同定하기 위하여 table 2 와 같은 組成의 全量이 200 ml인 大量의 反應液을 37°C 의 水浴上에서 12時間 反應시키고 反應終了와 同時 30% trichloroacetic acid 溶液 30ml 를 加해 反應을 停止시킨 後 沈澱된 酵素蛋白質을 遠心分離하여 除去한 다음 上澄液 0.05ml 를 取해 生成된 S-methyl-L-cysteine 을 分析해 본 結果 Fig. 4 에 表示되어 있는 바와 같이 Authentic S-methyl-L-cysteine 과 完全 一致되는 Ion exchange chromatogram 을 얻었으며 total 約 4.5 mmole 의 S-methyl-L-cysteine 이 合成되었다.

Fig. 5 에 表示된 單離過程에 따라 上記 上澄液 210 ml 을 Dowex 50 WX 8 ion exchange column 에 吸着시키고 2l 의 蒸溜水 및 1l 의 0.01M NH<sub>4</sub>

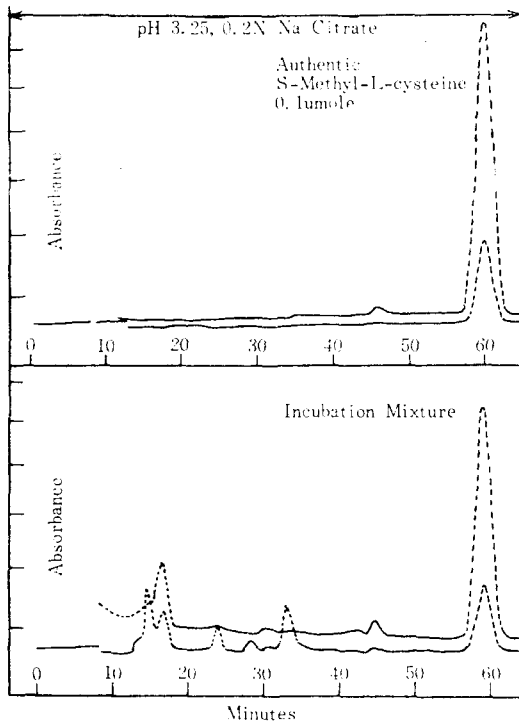


Fig. 4. Ion Exchange Chromatograms of an Incubation Mixture and a standard S-methyl-L-Cysteine Solution.

Samples were I, standard (0.1 $\mu$ mole of S-methyl-L-cysteine); II, incubation mixture (0.05-ml aliquot of a 220 ml mixture). Incubation was carried out at 37°C for 12 hrs. in a reaction mixture described in table 2.

Table 2. Composition of the Incubation Mixture for S-methyl-L-cysteine Synthesis Reaction.

Sodium Pyruvate	90.9mmole
Ammonium sulfate	15.1
Methylmercaptan	156
EDTA	0.25
PLP	0.02
Ammonium buffer, pH 10.0	20
Enzyme	217 units

OH 溶液으로 洗滌한 다음 0.3M NH<sub>4</sub>OH 溶液으로 溶出시켜 (流速; 25ml/hour, 15ml/fraction) Ninhydrin 反應의 陽性部分 105ml 을 모아 40°C 의 水浴上에서 減壓乾固하고 固形物을 少量의 蒸溜水에 溶解시킨 後 active carbon 을 加해 脫色, 吸引濾過했다. 이 濾液에 70% ethanol 을 滴下하여 結晶化 했으며 3次의 再結晶過程을 거쳐 白色 結晶狀 S-methyl-L-cysteine 約 150mg 을 얻었다.

#### Reaction mixture

- 30% TCA
- Filtration

#### Filtrate

- Dowex 50W, X8 column chromatography
- Washing with 0.01M NH<sub>4</sub>OH
- Elution with 0.3M NH<sub>4</sub>OH
- Evaporation *in vacuo*

#### Crude product

- Crystallization with H<sub>2</sub>O-EtOH

#### Crystals

Fig. 5. Procedure for the Isolation of S-methyl-L-cysteine or S-ethyl-L-cysteine from Reaction Mixtures.

S-ethyl-L-cysteine 은 反應液의 組成中 156m mole 의 methyl mercaptan 대신 ethyl mercaptan 156mmole 을 使用한것 外엔 餘러 同一한 反應條件 및 單離過程을 거쳐 約 160mg 의 結晶狀의 S-ethyl-L-cysteine 을 얻었다. 以上과 같이 酵素의 合成法에 依해 얻은 S-methyl-L-cysteine 및 S-ethyl-L-cysteine 을 各各 30mg 씩 秤取하여 D<sub>2</sub>O 에 溶解시켜 NMR Spectrum 을 測定해본 結果는 Fig. 6 및 Fig. 7과 같았으며 또한 이들 合成物에 對한 元素分析 mass spectrometer 에 依한 分子量, 및 융점 등의 測定 結果는 table 3에 表示되어 있다.

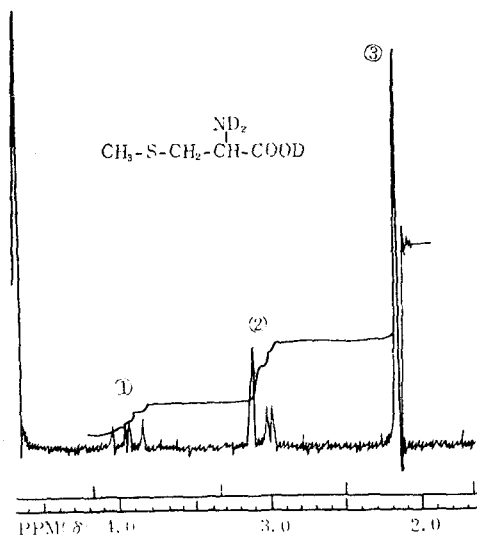


Fig. 6. NMR Spectrum of the enzymatically synthesized S-Methyl-L-Cysteine. The spectrum was recorded on a Varian A-60 spectrometer at 100Hz in D<sub>2</sub>O with DSS as an internal standard.

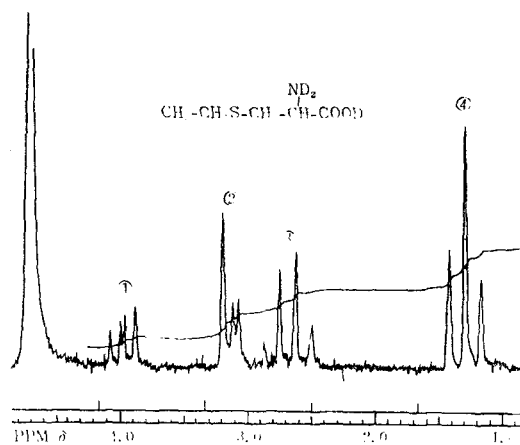


Fig. 7. NMR Spectrum of the enzymatically synthesized S-Ethyl-L-Cysteine. The spectrum was taken with the synthesized S-ethyl-L-cysteine saturated in D<sub>2</sub>O by Varian A-60 spectrometer.

Table 3. Physico-chemical Properties of the enzymatically synthesized S-Methyl-L-Cysteine and S-Ethyl-L-Cysteine.

	S-Methyl-L-Cysteine			S-Ethyl-L-Cysteine		
Molecular formula	CH <sub>3</sub> -S-CH <sub>2</sub> CHNH <sub>2</sub> COOH			C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> -S-CH <sub>2</sub> CHNH <sub>2</sub> COOH		
Molecular weight	135.19			149.21		
Elemental analysis	C%	H%	N%	C%	H%	N%
calcd:	35.54	6.71	10.36	40.21	7.37	9.38
frund:	35.52	6.93	10.25	40.56	7.61	9.29
Molecular ion peak in the mass spectrum	135			149		
Melting point	218—221°C			258—260°C		

以上과 같이 酵素의 合成品인 S-methyl-L-cysteine 및 S-ethyl-L-cysteine의 各種 分析結果는 이들 化合物에 對한 理論値와 잘 一致되고 있어 cysteine의 誘導體인 S-methyl-L-cysteine 및 S-ethyl-L-cysteine이 α, β-elimination reaction의 逆反應에 依해 酵素의 合成 됨을 확인 하였다.

### 要 約

1. L-cysteine을 pyruvate, sulfide 및 ammonia로 分解하는 反應을 촉매하는 酵素인 cysteinedesulf-

hydrase의 촉매機能에 對해 研究해은 바 *Aerobacter aerogenes*로부터 誘導生産한 cysteinedesulfhydrase를 사용하여 分解反應의 逆反應에 依해 pyruvate, ammonia 및 sulfide로부터 cysteine의 誘導體인 S-methyl-L-cysteine 및 S-ethyl-L-cysteine을 合成하였다.

2. 合成反應에 있어 서 S-methyl-L-cysteine 및 S-ethyl-L-cysteine의 生成量은 反應時間과 酵素量에 比例的인 關係를 나타내었고 反應의 最適 pH는 10.0이었다.

3. 酵素의 合成法에 依해 生産된 S-methyl-L-

cysteine 및 S-ethyl-L-cysteine 을 反應液으로 부터 單離, 結晶化해서 이들 合成產物에 對한 Ion exchange chromatogram, NMR spectrum, element analysis, molecular weight 및 melting point 測定 등의 分析試驗을 行한 바 이들 化合物에 對한 理論值와 잘 一致되는 結果를 얻었다.

### 謝 意

이 研究를 遂行함에 있어 始終 指導해 주신 京都大學食糧科學研所 山田秀明 敎授에게 감사드리며 아울러 NMR Spectrum, Mass Spectrum 의 測定 등의 器機分析에 協助해 주신 京都大學化學研究所 關係研究員 여러분께 深堪한 감사를 드립니다.

### REFERENCES

1. Kredich N. M. and G. M. Tomkins. : J. Biol. Chem. **241**, 4955(1966)
2. Kredich, N. M. M. A. Backer and G. M. Tomkins. : J. Biol. Chem. **244**, 2478(1969)
3. Smith I. K. and J. F. Thompson. : Biochem. Biochem. Biophys. Res. Commun. **35**, 939 (1969)
4. Wiebers J. L. and H. R. Garner. : J. Biol. Chem. **242**, 544(1967)
5. Wiebers J. L. and H. R. Garner. : J. Biol. Chem. **242**, 12(1967)
6. Giovanelli J. and S. H. Mudd. : Biochem. Biophys. Res. Commun. **31**, 281(1968)
7. Tommpson. J. F. and D. P. Moore. : Biochem. Biophys. Res. Commun. **31**, 281(1968)
8. Becker, M. A. Kredich, N. M. and Tomkins, G. M. : J. Biol. Chem. **244**, 2418(1969)
9. Smith I. K. and J. F. Thompson. : Biochim. Biophys. Acta. **227**, 288—295(1971)
10. Choi, Y. J. and H. C. Yang: Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng. **2**, (1974)
11. Yamada, H. Kumagai, H. Kashima, N. Torii, H. Enel, H. and Okumura, S. : Biochem. Biophys. Res. Commun. **46**, 370—374(1972)
12. Kumagai, H. Yamada, H. Matsui, H. Ohkishi, H. and Ogata, K. : J. Biol. Chem. **245**, 1767—1772(1970)
13. Kumagai, H. Matsui, H. Ohkishi, H. Ogata, K. Yamada, H. Ueno, T, and Fukami, H. Biochem. Biophys. Res. Commun. **34**, 266 —270(1969)
14. Ueno, T. Fukami, H. Ohkishi, H. Kumagai H. and Yamada, H. : Biochem. Biophys. Aca. **206**, 476—479(1970)
15. Newton, W. tA. Marino, Y and Snell, E. E. ; J. Biol. Chem. **240**, 1211—1218(1965)
16. Morino, Y and Snell, E. E. : J. Biol. Chem, **242**, 2793—2799(1967)
17. T. Watanabe and E. E. Snell. : Prec. Nat. Acad. Sci. **69**, 1086—1090(1972)
18. Friedmann, T. E. and Haugen, G. G. : J. Biol. Chem. **147**, 415(1943)
19. Lowry, O. H. Rosebrough, N. J. Farr, A. L. and Randall, R. J. : J. Biol. Chem. **193**, 265 (1951)