

Alcaligenes eutrophus A 52의 무세포 추출액에 의한 D- α -Amino- ϵ -Caprolactam으로 부터 L-Lysine으로의 전환

박희동*·최선택·이인구

경북대학교 농화학과

Conversion of D- α -Amino- ϵ -Caprolactam into L-Lysine Using Cell-free Extracts of *Alcaligenes eutrophus* A52

Park, Heui Dong*, Sun Taek Choi and In Koo Rhee

Department of Agricultural Chemistry, Kyungpook National University, Taegu 635, Korea

D- α -Amino- ϵ -caprolactam racemase (EC 5.1.1) and L- α -amino- ϵ -caprolactam hydrolase (EC 3.5.2) were fractionated from cell-free extracts of *Alcaligenes eutrophus* A52 using ammonium sulfate precipitation and DEAE-cellulose ion exchange chromatography. It was made sure that D- α -amino- ϵ -caprolactam was converted to L- α -amino- ϵ -caprolactam by racemase, and then hydrolyzed into L-lysine by hydrolase in *Alcaligenes eutrophus* A52. For the conversion of D- α -amino- ϵ -caprolactam into L-lysine by cell-free extracts of *Alcaligenes eutrophus* A52, the optimum temperature and pH were 60°C and 8.5 respectively. The results showed that 0.5% D- α -amino- ϵ -caprolactam was converted to L-lysine at 55°C for 10 hr with a conversion rate of 98% by cell-free extracts containing 3.1 mg of protein.

석유화학공업의 부산물인 ϵ -caprolactam, cyclohexane 및 dehydropyran 등으로 부터 합성되어질 수 있는(1, 2) D- α -amino- ϵ -caprolactam(DAC) 및 L- α -amino- ϵ -caprolactam(LAC)은 미생물에 의하여 L-lysine으로의 전환이 가능하다. Fukumura는 DAC가 α -amino- ϵ -caprolactam racemase(EC 5.1.1 이하 racemase)에 의해 LAC로 전환된 후 L- α -amino- ϵ -caprolactam hydrolase(EC 3.5.2 이하 hydrolase)에 의해 가수분해되어 L-lysine으로의 전환경로를 제안한 바 있다(3-6). Hydrolase의 생산 균주로는 *Aspergillus ustus*(7), *Cryptococcus laurentii*, *Candida humicola* 및 *Trichosporon cutaneum* 등(3)의 곰팡이와 효모가 있으며 racemase와 hydrolase를 동시에 생산할 수 있는 균주로는 *Achromobacter obae*, *Achromobacter cycloclastes*, *Alcaligenes faecalis* 및 *Flavobacterium arbores-*

cens 등이 알려져 있으나 이들 세균들은 racemase의 생산력은 강하나 hydrolase의 생산력은 아주 약하였다(5). 그래서 Fukumura는 *Cryptococcus laurentii*가 생산하는 hydrolase와 *Achromobacter obae*가 생산하는 racemase를 동시에 사용한 2단계 효소반응으로 DAC로 부터 L-lysine으로의 전환을 시도하였으며(6) 그 후 *C. laurentii*의 hydrolase(8)와 *A. obae*의 racemase(9~14)를 정제하여 그 성질을 조사한 보고가 있을 뿐 단일 미생물에 의한 DAC로 부터 L-lysine으로의 전환에 관한 보고는 없는 실정이다. 그래서 본인 등은 racemase와 hydrolase를 동시에 생산하며 두 효소의 활성이 높은 *A. eutrophus*를 분리하여 그 특성을 조사한 바 있다(15). 본 연구에서는 *A. eutrophus* A 52의 무세포 추출액을 사용하여 DAC로 부터 L-lysine으로의 전환을 시도하였으며 이 두 효소를 DEAE-cellulose 이온교환 크로마토

Key words: D- α -Amino- ϵ -caprolactam, L-lysine, *Alcaligenes eutrophus*

* Corresponding author

그래피로서 분획한 후 DAC로 부티의 L-lysine 전환 경로 및 각각의 효소학적 성질을 조사하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

본 실험에 사용된 균은 *Alcaligenes eutrophus* A 52(15)로서 한천사면배지에 1개월마다 계대배양하면서 4°C에 보관하였다. 배지로는 DAC 0.2%, K₂HPO₄ 0.2%, KH₂PO₄ 0.05%, MgSO₄·7H₂O 0.02%, FeCl₃·6H₂O 0.01% 및 yeast extract 0.05%를 증류수에 녹여 pH를 6.0으로 조절한 후 120°C에서 15분 멸균한 배지(이하 DAC 배지)를 사용하였다.

배양방법

종배양은 DAC 배지에 한천사면으로부터 한 백금이의 균을 접종한 후 30°C에서 120 strokes/min의 속도로 진탕시키면서 20시간 배양하였다. 본 배양은 DAC 배지에 종배양액을 1%되게 접종한 후 35시간 종배양 방법과 동일하게 배양하였다.

생육도 측정

균의 생육도는 Bausch & Lomb사의 Spectronic 20으로 600 nm에서의 흡광도를 측정하였으며 건조균체 중량은 배양액의 세척균체를 105°C에서 항량이 될 때까지 건조한 균체의 중량과 흡광도와와의 관계로부터 환산하였다. 600 nm에서의 흡광도가 1.0인 배양액은 건조균체 0.62 mg/ml에 상당하였다.

무세포 추출액의 조제

배양액을 원심집균하고 50 mM Tris·HCl 완충액(pH 8.5)으로 2회 세척한 후 현탁시켜 영국 Ultrasonics사의 초음파 파쇄기로 90 μA에서 8분간 처리시킨 다음 27,000×g로 30분간 원심분리하여 얻은 상등액을 -20°C에 보관하면서 무세포 추출액으로 사용하였다.

단백질의 정량

단백질의 정량은 Bradford의 방법(16)에 따라 coomassie brilliant blue G 250을 사용하여 행하였으며 표준물질로는 소의 혈청 알부민(BSA)을 사용하였다.

Racemase 활성의 측정

50 mM DAC 0.2 ml, 50 mM Tris·HCl 완충액(pH 8.5) 0.7 ml 및 효소액 0.1 ml를 가하여 55°C에서 1시간 반응시킨 후 100°C에서 5분간 가열하여 반응을 중지시키고 hydrolase 분획 5 unit를 가하여 1시간 반응시켜 생성된 LAC를 L-lysine으로 전환시킨 다음 산성 ninhydrin법(17)으로 생성된 L-lysine을 정량하였다. Racemase의 활성단위는 본 실험 조건에서 1시간 동안에 1 μmole의 L-lysine을 생성하는 효소의 양을 1 unit로 표시하였다.

Hydrolase 활성의 측정

50 mM LAC 0.2 ml, 50 mM Tris·HCl 완충액(pH 8.5) 0.7 ml 및 효소액 0.1 ml를 혼합하여 55°C에서 1시간 반응시킨 후 생성된 L-lysine을 산성 ninhydrin법(16)에 의해 측정하였다. Hydrolase 활성의 단위는 본 실험 조건에서 1시간 동안에 1 μmole의 L-lysine을 생성하는 효소의 양을 1 unit로 표시하였다.

Racemase와 hydrolase의 분획

무세포 추출액을 유안염석시킨 후 투석 및 농축시킨 액을 DEAE-cellulose 이온교환 크로마토그래피로서 racemase와 hydrolase를 분획하였다. DEAE-cellulose 이온교환 크로마토그래피는 20 mM Tris·HCl 완충액(pH 7.5)을 사용하여 2.1×35 cm의 column에서 행하였으며 흡착 단백질은 20 mM Tris·HCl 완충액(pH 7.5~9.0) 및 0~0.4M NaCl의 직선 농도기울기로 용출하였다. 유속은 시간당 30 ml이었으며 4 ml씩 분획하였다.

박층 크로마토그래피와 선풍도 측정에 의한 효소 반응 생성물의 동정

2.0% DAC 0.25 ml, 50 mM Tris·HCl 완충액(pH 8.5) 0.65 ml 및 효소액 0.1 ml를 혼합하여 55°C에서 12시간 반응시킨 후 100°C에서 5분간 가열하여 원심분리한 상등액을 20 mM Tris·HCl 완충액(pH 8.5)으로 10시간 투석시켰다. 반응 생성물은 n-propanol : 28% NH₄OH(7 : 3v/v)을 전개용매로, 0.2% ninhydrin을 발색제로 사용한 silica gel 박층 크로마토그래피 확인 및 digital 선풍계(Jasco DIP-360)로서 선풍도를 측정하여 동정하였다.

시 약

본 실험에 사용된 DAC, LAC 및 L-lysine은 Fluka사, BSA 및 coomassie brilliant blue G 250은 Sigma사의 특급시약을 사용하였으며 그 외의 시약은 시판 특급을 사용하였다.

결 과

Racemase와 hydrolase의 분획

무세포 추출액에 유안을 90% 포화시켜 4°C에서 5시간 방치후 원심분리하여 얻은 침전물을 20 mM Tris·HCl 완충액(pH 8.5) 소량에 녹인 다음 동일 완충액에서 10시간 투석시키고 원심분리하여 불용성 물질을 제거시켰다. 상등액을 고체상의 polyethylene glycol 15,000~20,000으로 농축시킨 다음 DEAE-cellulose 이온교환 크로마토그래피에 사용하였다. 농축시킨 효소액을 20 mM Tris·HCl 완충액(pH 7.5)으로 평형화한 DEAE-cellulose column에 충전시킨 후 비활성 단백질을 동일 완충액으로 세척한 다음 흡착된 단백질을 용출하여 racemase와 hydrolase의 활성을 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. Racemase의 활성은 129~143번 fraction에서, hydrolase의 활성은 101~127번 fraction에서 나타났다. 그래서 132~138번 fraction을 racemase 분획으로, 107~118번 fraction을 hydrolase 분획으로 사용하였다.

효소반응 생성물의 동정

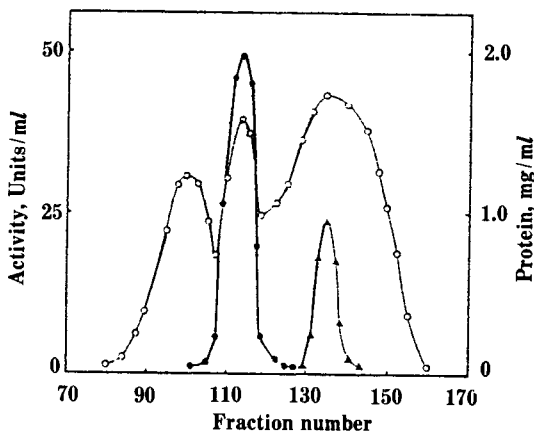
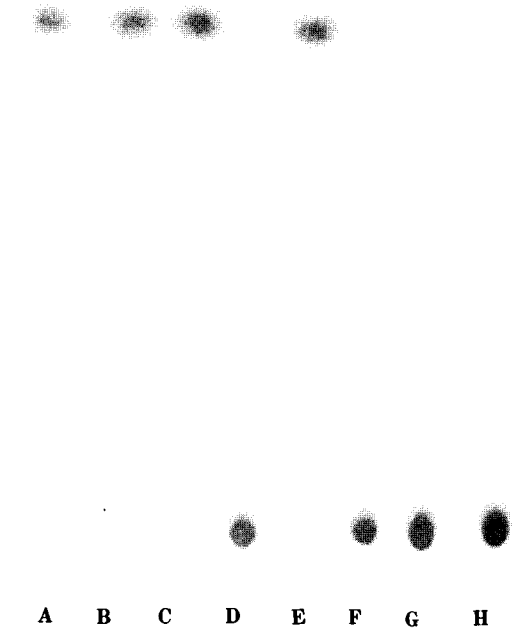


Fig. 1. Fractionation of racemase and hydrolase on DEAE-cellulose column chromatography.

○ - ○: protein, ● - ●: hydrolase, ▲ - ▲: racemase.

분획한 racemase와 hydrolase를 각종 기질과 12시간 반응시켜 반응 생성물을 박층 크로마토그래피와 선광도 측정으로 확인하였다. 표준 DAC와 L-lysine의 선광도는 각각 $[\alpha]_D^{25} = +31^\circ, +19.5^\circ$ (C=0.5, 20 mM Tris·HCl 완충액 pH 8.5)으로서 racemase는 DAC를 LAC로 전환시켰으며 hydrolase는 LAC를 L-lysine으로 잘 가수분해하였으나 DAC는 가수분해하지 못하였다. DAC에 무세포 추출액을 작용시킨 결과 L-lysine이 생성됨을 확인하였다(Fig. 2).



A	B	C	D	E	F	G	H
Sample						$[\alpha]_D^{25}$	
A	Std. DAC					+ 31°	
B	Std. LAC					- 31°	
C	DAC + racemase					+ 1.0°	
D	LAC + hydrolase					+ 19.15°	
E	DAC + hydrolase					+ 31°	
F	DAC + racemase + hydrolase					+ 19.10°	
G	Std. L-lysine					+ 19.5°	
H	Std. D-lysine					- 19.5°	

Fig. 2. Identification of enzyme reaction product with thin layer chromatography and polarimeter.

* $[\alpha]_D^{25}$ was determined at a concentration of 0.5% in 20mM Tris-HCl buffer (pH 8.5).

이로 미루어보아 racemase 분획과 hydrolase 분획은 서로 완전히 분리된 것으로 추측되며 *A. eutrophus* A52는 이 두 효소를 모두 생산하는 균으로서 racemase에 의해 DAC가 LAC로 전환된 후 hydrolase에 의해 L-lysine으로 전환됨을 확인하였다 (Fig. 3).

Racemase와 hydrolase의 반응 조건

Racemase와 hydrolase의 활성에 대한 온도의 영향을 알아보기 위하여 반응온도를 40~75°C에서 5°C 간격으로 조절하여 활성을 조사한 결과 racemase 분획은 55°C, hydrolase 분획은 65°C에서 최대활성을 나타내었으며 두 효소를 모두 함유하는 무세포 추출액의 최적 반응온도는 60°C이었다 (Fig. 4).

반응액의 pH를 7~10에서 5간격으로 조절하여 효소의 활성을 조사한 결과 racemase 분획은 pH 8, hydrolase 분획은 pH 9에서 최대활성을 나타내었으며 무세포 추출액의 반응 최적 pH는 8.5이었다 (Fig. 5).

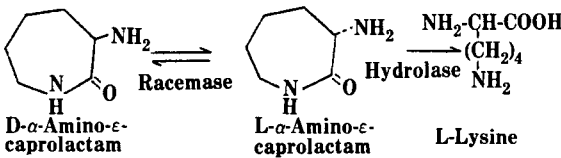


Fig. 3. Conversion of D-α-amino-ε-caprolactam into L-lysine in *Alcaligenes eutrophus* A52.

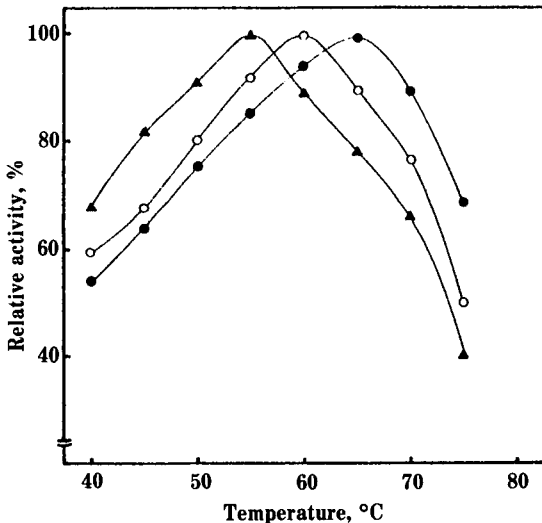


Fig. 4. Effect of temperature on enzyme activity. ●-●: hydrolase, ▲-▲: racemase, ○-○: cell-free extracts.

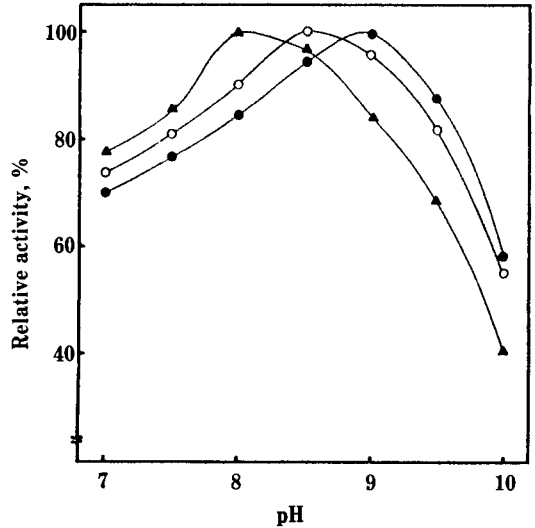


Fig. 5. Effect of pH on enzyme activity. ●-●: hydrolase, ▲-▲: racemase, ○-○: cell-free extracts.

표준 반응혼합액에 L-lysine을 농도별로 첨가한 것과 표준 반응혼합액의 DAC를 농도별로 첨가한 것에서 무세포 추출액에 의한 DAC로부터 L-lysine으로

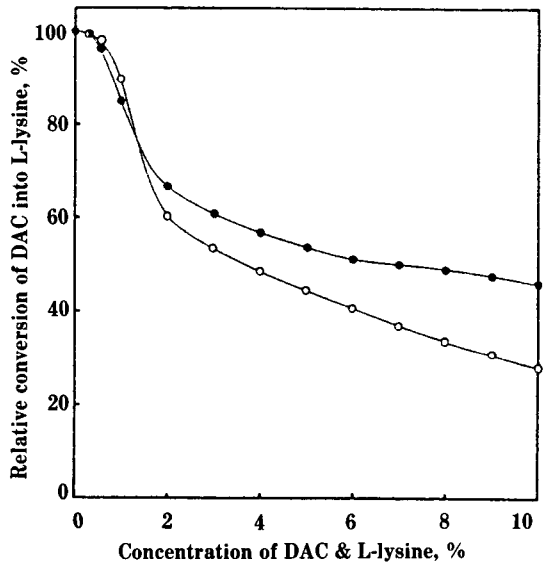


Fig. 6. Effect of the concentration of DAC and L-lysine on the conversion of DAC into L-lysine by cell-free extracts.

○-○: conversion of DAC into L-lysine added at various concentrations, ●-●: conversion of DAC into L-lysine in the presence of L-lysine added at various concentrations.

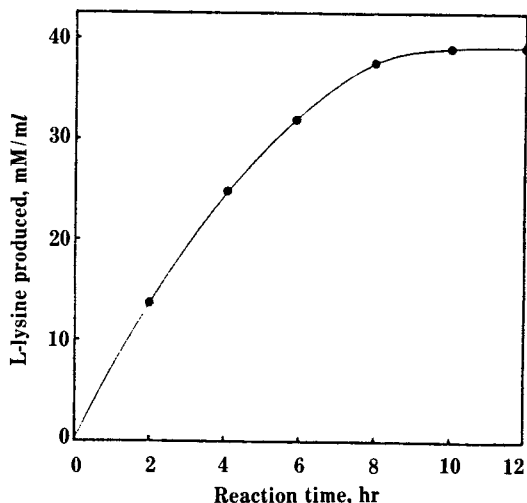


Fig. 7. Time course of conversion of DAC into L-lysine by cell-free extracts.

The reaction mixture containing 2.0% DAC 0.25ml, 50mM Tris-HCl buffer (pH8.5) 0.65ml and cell-free extracts (31mg of protein/ml) 0.1ml was incubated at 55°C.

의 전환율을 상대적 활성으로 나타낸 결과는 Fig. 7과 같다. 기질인 DAC와 반응산물인 L-lysine 모두 1% 첨가시에는 무세포 추출액에 의한 DAC로부터 L-lysine으로의 전환에 거의 영향을 미치지 않았으나 그 이상에서는 저해현상을 나타내었으며 저해 정도는 L-lysine보다 DAC가 더 높았다.

반응시간에 따른 DAC로부터 L-lysine으로의 전환

0.5%의 DAC와 단백질 3.1mg에 해당하는 무세포 추출액을 함유하는 반응액 1ml를 55°C에서 12시간 반응시키면서 경시적으로 L-lysine의 생성량을 조사하였다. DAC에서 L-lysine으로 전환된 양은 반응시간의 경과에 따라 증가하다가 10시간 후에 거의 일정한 값에 도달하였다. 본 실험 조건에서 10시간 반응으로 DAC에서 L-lysine으로의 전환율은 약 98%이었다(Fig. 7).

고 찰

Alcaligenes eutrophus A 52의 무세포 추출액을 유안염색 후 DEAE-cellulose 이온교환 크로마토그래피로서 racemase와 hydrolase 두 효소를 분획하였다. Racemase와 hydrolase 분획을 사용한 DAC와 LAC로부터의 반응 생성물을 박층 크로마토그래피

와 선광계로서 조사한 결과 DAC와 racemase의 반응 생성물은 LAC이었으며 LAC와 hydrolase의 반응 생성물은 L-lysine임을 확인하였다. Fukumura(3~6)는 *A. obae*의 racemase와 *C. laurentii*의 hydrolase를 사용하여 DAC가 racemase에 의해 LAC로 전환된 후 hydrolase에 의해 L-lysine으로 전환되는 경로를 제안한 바 있다. 본 실험에서 사용한 *A. eutrophus* A 52 역시 이와같은 경로로서 DAC로부터 L-lysine을 생성하는 것으로 생각된다. Racemase의 반응에 대한 최적 pH는 8.0, 최적온도는 55°C로서 최적 pH가 9.0(5, 11)이며, 최적온도가 38~41°C(6)인 *A. obae*와는 상이한 결과를 나타내었다. Hydrolase의 최적 pH는 9.0, 최적온도는 65°C로서 최적 pH가 9.0, 최적온도가 70°C인 *C. laurentii*(4)와 유사한 결과를 나타내었다. 본 균의 무세포 추출액을 사용한 DAC로부터 L-lysine으로의 최적 전환조건은 racemase와 hydrolase 두 효소의 최적 조건 중간치인 60°C와 pH 8.5이었다. 반응액 1ml내에 0.5%의 DAC와 3.1mg의 단백질에 상당하는 무세포 추출액을 혼합하여 55°C에서 10시간 반응으로 약 98%가 L-lysine으로 전환되었다. 이는 Fukumura(4)의 세균성 racemase와 효모성 hydrolase를 사용한 경우보다 다소 전환율이 낮았으나 본 실험은 단일 미생물에 의한 전환으로서 앞으로 더욱 많은 연구가 요구된다.

요 약

Alcaligenes eutrophus A 52의 무세포 추출액으로부터 유안염색 및 DEAE-cellulose 이온교환 크로마토그래피로서 D- α -amino- ϵ -caprolactam(DAC) racemase와 L- α -amino- ϵ -caprolactam(LAC) hydrolase를 분획하였다. *A. eutrophus* A 52에 의한 DAC로부터 L-lysine으로의 전환은 DAC가 racemase에 의해 LAC로 전환된 후 hydrolase에 의해 L-lysine으로 가수분해됨을 확인하였다. DEAE-cellulose 이온교환 크로마토그래피에 의해 분리된 racemase의 분획은 최적온도가 55°C, 최적 pH는 8.0이었으며 hydrolase의 분획은 최적온도가 65°C 최적 pH가 9.0이었다. 이 두 효소를 모두 함유하는 무세포 추출액에 의한 DAC로부터 L-lysine으로의 전환은 60°C와 pH 8.5에서 최대를 나타내었고 2% 이상의 DAC와 L-lysine에 의해 상당한 저해를 받았으나 0.5% DAC를 3.1mg의 단백질에 상당하는 무세

포 추출액으로서 전환시킨 결과 55°C에서 10시간 동안에 약 98%가 L-lysine으로 전환되었다.

참고문헌

1. Barrett, G.C.: *Chemistry and biochemistry of the amino acids*, Chapman and Hall, London, New York, (1985).
2. Ottenheim, H.H. and P.J. Jenneskens: *J. Agr. Food. Chem.*, **18**(6), 1010 (1970).
3. Fukumura, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **40**(9), 1687 (1976).
4. Fukumura, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **40**(9), 1695 (1976).
5. Fukumura, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **41**(8), 1321 (1977).
6. Fukumura, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **41**(8), 1327 (1977).
7. Seto, T.A.: US Patent 3056729 (1962).
8. Fukumura, T., G. Talbot, H. Misono, Y. Teramura, K. Kato and K. Soda: *FEBS Lett.*, **89**(2), 298 (1978).
9. Ahmed, S.A., N. Esaki and K. Soda: *FEBS Lett.*, **150**(2), 370 (1982).
10. Ahmed, S.A., N. Esaki, H. Tanaka and K. Soda: *Bull. Inst. Chem. Res., Kyoto Univ.*, **60**(5-6), 342 (1982).
11. Ahmed, S.A., N. Esaki, H. Tanaka and K. Soda: *Agric. Biol. Chem.*, **47**(5), 1149 (1983).
12. Ahmed, S.A., N. Esaki, H. Tanaka and K. Soda: *Agric. Biol. Chem.*, **47**(8), 1887 (1983).
13. Ahmed, S.A., N. Esaki, H. Tanaka and K. Soda: *Agric. Biol. Chem.*, **49**(10), 2991 (1985).
14. Ahmed, S.A., N. Esaki, H. Tanaka and K. Soda: *Biochemistry*, **25**, 385 (1986).
15. 최선택, 박희동, 이인구: 한국산업미생물학회지, **15**, 369 (1987).
16. Bradford, M.M.: *Anal. Biochem.*, **72**, 248 (1976).
17. Chinard, F.P.: *J. Biol. Chem.*, **199**, 91 (1952).

(Received September 21, 1987)