

Pyruvic Acid 生産 微生物과 연결된 Pyruvic Acid의 Tryptophan으로의 酵素的 轉換

鄭南鉉·方元基*

고려대학교 농과대학 농화학과

Enzymatic Conversion of Pyruvic Acid to Tryptophan Linked to Pyruvic Acid-Producing Microorganism

Chung, Nam-Hyun and Won-Gi Bang*

Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, Korea University, Seoul 132, Korea

Enzymatic conversion of pyruvic acid produced by microorganism to tryptophan was investigated. A luminescent bacteria, *Beneckea* sp., was used for the production of pyruvic acid. As a source of tryptophanase which synthesizes tryptophan from pyruvic acid, indole and ammonia, whole cells of *Enterobacter aerogenes* ATCC 10031 were used directly in the reaction mixture. To increase the production of tryptophan, nonionic detergents and nonaqueous organic solvents were used as reservoirs of indole in the reaction mixture. In the case of nonionic detergents, TritonX-100 was very effective. When 1.5% of Triton X-100 was used, 7.7g/l of tryptophan was produced at 37°C for 48 hr. In the case of nonaqueous solvents, 8.7g/l of tryptophan was produced at 37°C for 48 hr, when 10% of benzene was used. This amount of tryptophan corresponds to conversion of 48% of indole and 36% of pyruvic acid, respectively.

Tryptophan은 무취이며, 약간의 쓴맛을 갖는 황백색의 물질로서 필수아미노산중의 하나이다. 일반적으로 tryptophan의 용도는 tryptophan의 함량이 적은 곡물로 부터 만들어지는 식품 및 동물 사료에 첨가하여 곡물 단백질의 질을 향상시킬 수 있으며, 또한 의약품으로서도 사용이 가능하다(1, 2).

미생물에 의한 tryptophan의 생산방법은 일반적으로 3가지 방법으로 분류할 수 있다(2).

① 탄수화물, kerosene과 methanol 등을 기질로 한 직접 발효법, ② 하나의 전구물질을 가하여 발효법으로 생산하는 방법, ③ 여러가지 전구물질을 사용하여 효소법으로 생산하는 방법이다.

상기 방법 중에서도 효소법에 의한 tryptophan의

생산방법은 다른 방법에 비해 여러가지 장점을 지니고 있기 때문에(2) tryptophan synthetase(2, 3) 및 tryptophanase(4, 5) 등의 효소가 이 방법에 많이 사용되었다. 그러나, 효소법으로 tryptophan을 생산하는데 있어서 가장 단점인 것은 전구물질로 사용되는 indole, pyruvic acid와 serine이 비교적 비싼 것이다.

본 실험실에서는 전보(6)에 이미 발광 세균에 의한 pyruvic acid 생산방법을 발표한 바 있으며, 본 논문에서는 상기와 같이 생산된 pyruvic acid를 tryptophanase를 사용하여 효소법에 의해 tryptophan으로 전환하는 방법을 검토하여 보고하는 바이다.

Key words: Enzymatic conversion, tryptophan, *Enterobacter aerogenes*

* Corresponding author

재료 및 방법

사용균주

Pyruvic acid의 생산에는 전보(6)에 사용한 *Beneckeia* sp.를 사용하였다.

Tryptophanase를 생성하는 균주로는 *Enterobacter aerogenes* ATCC 10031을 사용하였다.

배지조성 및 배양방법

Pyruvic acid의 생산을 위해 *Beneckeia* sp.를 사용한 경우, 배지조성 및 배양방법은 전보(6)에 따라 수행하였다.

Tryptophanase를 생성하기 위한 *Enterobacter aerogenes* ATCC 10031의 배양에는 1% tryptone, 1% yeast extract, 0.04 M sodium succinate, 0.3% KH_2PO_4 , 0.025% tryptophan을 지닌 배지를 사용하였으며, 배양은 상기 배지를 100 ml 지닌 500 ml용 삼각 플라스크를 사용하여 37°C에서 7시간 동안 왕복 진탕 배양(115~120 strokes/min)을 수행하였다. 배양이 끝난 후 상기 균체를 회수하여 그대로 tryptophanase 효소원으로 사용하였다.

Tryptophan의 생성을 위한 반응액의 조성 및 반응 조건

Tryptophan의 생산에 사용한 기본 반응 조성액은 다음과 같다.

Beneckeia sp.에 의한 pyruvic acid의 생산이 끝난 배양액을 10 ml취하고 원심분리(5000 rpm, 10 min)하여 균체를 제거한다. 상기 10 ml(pyruvic acid 1.05%)에 105 mg indole, 500 mg ammonium acetate, 10 mg Na_2SO_3 , 30 mg EDTA, 1 mg pyridoxal-5'-phosphate을 첨가한 후 6 N KOH를 사용하여 pH값을 9로 조정하였다.

Tryptophan의 생산 반응시에는 tryptophanase의 효소원으로 40 mg(전체량)의 *Enterobacter aerogenes* ATCC 10031을 상기 반응액에 가하여 100 ml용 삼각 플라스크를 사용하여 37°C에서 12시간 동안 왕복 진탕 배양(115~120 strokes/min)을 수행하였다.

Pyruvic acid의 측정

Pyruvic acid의 정량 분석은 Friedemann과 Haugen(7)의 방법에 따라 수행하였다.

Tryptophan의 측정

Tryptophan의 정량 분석은 Nakazawa 등(8)의 방법에 따라 수행하였다.

Tryptophanase의 활성 측정

Tryptophanase의 활성은 Nakazawa 등(8)의 방법에 따라 측정하였으며, 이때 활성을 매 반응 용액 ml당 생성된 tryptophan량으로 표시하였다(mg/ml).

결과 및 고찰

Tryptophanase 활성에 미치는 배지중의 서로 다른 tryptophan 농도의 영향

Tryptophanase는 원래 tryptophan을 indole, pyruvic acid 및 ammonia로 분해하는 효소로 알려졌다(9). 그러나 본 효소는 pyruvic acid와 ammonia의 농도가 높은 경우에는 가역반응이 가능하며 상기 분해물질로부터 tryptophan 생성이 가능한 것으로도 알려졌다(10). 일반적으로 tryptophanase의 생성시에는 효소 유도체로서 tryptophan을 배양액에 첨가시키고 있다(5, 11). 본 실험에서도 *E. aerogenes* ATCC 10031을 배양하여 tryptophanase의 생성시 배양액내의 서로 다른 tryptophan 농도가 tryptophanase의 활성에 미치는 영향을 조사하였다. Table 1은 tryptophan 농도를 변화시켜 tryptophanase의 활성을 조사한 것이다.

Table 1에서 볼 수 있는 바와 같이 tryptophan 무첨가구에 비해 tryptophan 첨가구에서 2배로 증가하였으며 0.025%의 tryptophan 농도가 tryptophanase의 생성에 충분한 것으로 나타났으며, 이미

Table 1. Effect of tryptophan concentrations on tryptophanase activity in *Enterobacter aerogenes* ATCC10031.

Tryptophan(%)	Tryptophanase(mg/ml)
None	3.20
0.025	6.40
0.050	6.35
0.100	6.40
0.200	6.40
0.300	6.00

다른 논문에서 tryptophanase의 생성시에 사용한 0.075% (11) 및 0.2% (5)의 tryptophan 농도보다 매우 낮은 값이었다.

Tryptophan 생산시에 미치는 초기 pH의 영향

Tryptophanase의 활성이 최적인 pH를 조사하기 위하여 tryptophan을 생산하기 위한 반응 조성액의 pH값을 변화시켜 각 pH값에서의 tryptophan 생성량을 조사하였다. Fig. 1에서 볼 수 있는 바와 같이 pH 9에서 가장 많은 tryptophan이 생성되었다.

어와같은 결과는 *P. rettgeri* (5) 및 *E. coli* (10)의 tryptophanase를 사용하여 indole, pyruvic acid 및 ammonia로부터 tryptophan을 생성할 때의 pH값과 일치하였다.

Tryptophan 생산시에 미치는 서로 다른 암모니아원의 영향

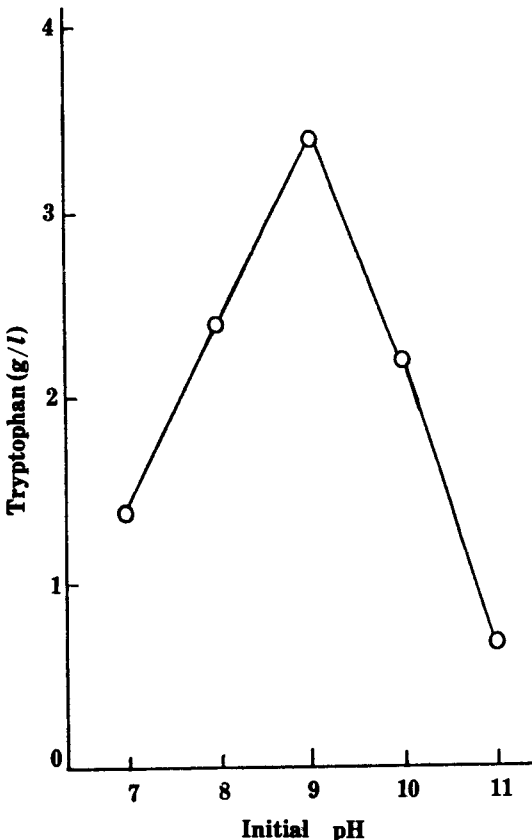


Fig. 1. Effect of initial pH on the production of tryptophan from indole, pyruvate and ammonia by tryptophanase in *Enterobacter aerogenes* ATCC10031.

Table 2. Effect of ammonia sources on the production of tryptophan.

Nitrogen source	Tryptophan (g/l)
NH_4NO_3	1.35
NH_4Cl	1.75
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3.30
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	3.20
$(\text{NH}_2)_2\text{CO}$	0.25
NH_4 -acetate	3.25
NH_4 -oxalate	2.70
NH_4 -tartarate	2.95
NH_4 -formate	2.60
NH_4 -citrate	2.20

Tryptophanase에 의한 tryptophan의 생성에 미치는 암모니아원의 영향을 조사하기 위하여 10개의 암모니아 화합물을 사용하였다. 이때 사용한 암모니아원은 질소로서 0.9%가 되게 하였다.

Table 2에서 볼 수 있는 바와 같이 암모니아원으로는 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 및 NH_4 -acetate가 tryptophan 생산시에 우수한 암모니아원으로 나타났으며 $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ 를 암모니아원으로 사용하였을 때 tryptophan 생산이 매우 적었다.

다른 논문에서는 암모니아원으로 NH_4 -acetate (5)나 NH_4Cl (10, 11)을 질소원으로 사용하였으나 본 논문에서는 상기의 실험결과에 따라 본 실험 이후의 실험에서 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 질소원으로 계속 사용하였다.

Tryptophan 생산시에 미치는 서로 다른 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 농도의 영향

암모니아원의 농도의 변화에 따른 tryptophan의 생산을 조사하기 위하여 기본 반응조성액의 ammonium acetate 대신에 서로 다른 농도의 ammonium sulfate를 사용하였다.

Table 3에서 볼 수 있는 바와 같이 ammonium sulfate가 2~3% 첨가되었을 때에 비하여 4% 이상 첨가되었을 때에 일정한 tryptophan 생산량을 나타내었다. 본 실험 결과에 따라, 이후의 실험에서는 5%의 ammonium acetate 대신 4%의 ammonium sulfate를 암모니아원으로 계속 사용하였다.

Table 3. Effect of concentrations of ammonium sulfate on the production of tryptophan.

Ammonium sulfate(%)	Tryptophan(g/l)
2.0	1.60
3.0	3.20
4.0	3.50
5.0	3.45
6.0	3.50

Indole 농도가 tryptophan 생성에 미치는 영향

일반적으로 고농도의 indole은 tryptophanase의 활성을 저해하는 것으로 알려져 있다(5, 10). 서로 다른 농도의 indole을 지닌 반응용액에서 tryptophan의 생산을 수행한 결과를 Fig. 2에 표시하였다. 이때 사용된 pyruvic acid의 농도는 모두 10 mg/ m/이었다.

Fig. 2에서 볼 수 있는 바와 같이 indole의 농도가 1 mg/ m/일때도 tryptophan으로의 전환율이 57%이었으며 indole의 농도가 증가함에 따라 전환율이 감소하고 있음을 나타내었다. 본 실험결과는 tryptophanase를 지닌 균체를 효소원으로 사용하는 경우 indole이 기질저해를 일으키는 것으로서 정제효소를 사용하였을 때의 기질저해(5, 10)와 일치하는 경향을 나타냈다.

Tryptophan 생산에 미치는 비이온성 계면활성제의 영향

비이온성 계면활성제는 세포막 단백질의 활성을

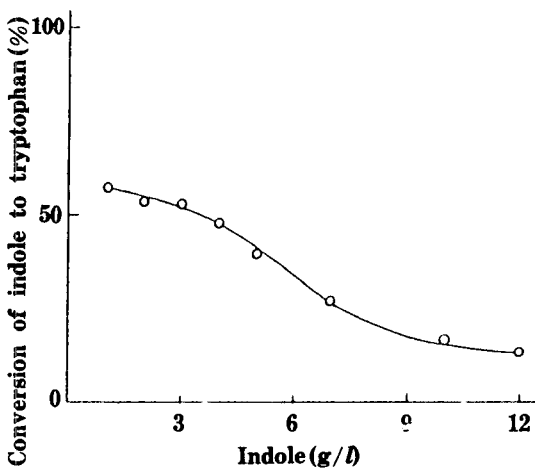


Fig. 2 Effect of indole concentrations of the production of tryptophan.

Table 4. Effect of nonionic detergents on the production of tryptophan

Nonionic detergent(1%)	Tryptophan (g/l)
None	3.50
Tween 40	4.45
Tween 60	4.75
Tween 80	4.00
Triton X-100	5.35

저해하지 않는 것으로 알려져 있다(12). 또한 비이온성 계면활성제는 indole의 저장소로 작용하여 서서히 반응계에 indole을 공급하는 것으로도 알려져 있다(2). Indole에 의한 기질저해를 감소시키면서 tryptophan을 효과적으로 생산하기 위해 본 실험에서는 몇가지 비이온성 계면활성제를 선택하여 반응용액 중에 1%씩 첨가하여 사용하였다. 본 실험의 결과를 Table 4에 나타내었다.

계면활성제를 사용하지 않은 표준구에 비해 계면활성제를 사용한 구에서 tryptophan의 생산이 향상되었으며, 특히 triton X-100을 사용한 경우 표준구에 비해 tryptophan 생산이 53% 더 생산되었다.

서로 다른 농도의 triton X-100이 tryptophan 생산에 미치는 영향을 검토한 결과는 Table 5에 표시되어 있다. Table 5에서 볼 수 있는 바와 같이, 1.5% 이상의 triton X-100을 사용하였을 때 가장 많은 tryptophan 생산량을 나타냈으며, 표준구에 비해 66% 더 향상된 값이었다.

Tryptophan 생산을 위한 반응 용액에 1.5%의 triton X-100을 첨가하여 시간에 따른 tryptophan 생산을 검토한 결과 Fig. 3을 얻었다. Fig. 3에서 볼 수

Table 5. Effect of triton X-100 concentrations on the production of tryptophan

Triton X-100(%)	Tryptophan (g/l)
None	3.50
0.5	4.80
1.0	5.30
1.5	5.80
2.0	5.80
3.0	5.85

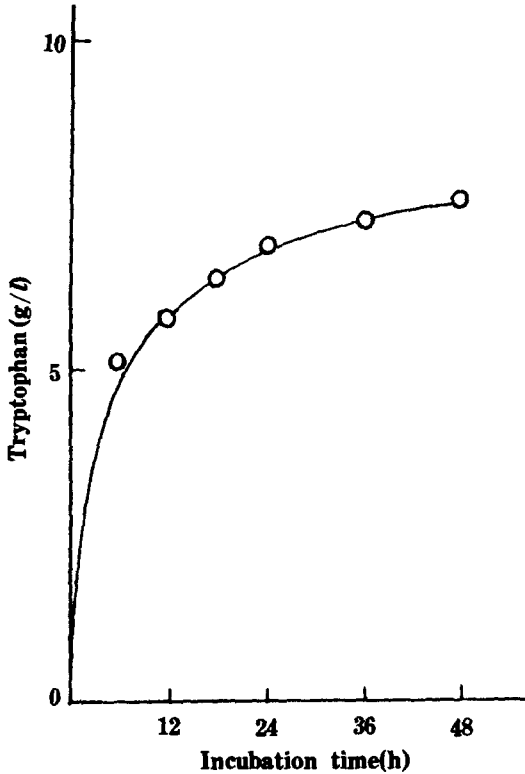


Fig. 3. Time course of the production of tryptophan in the presence of triton X-100.

있는 바와 같이 6시간 반응 동안 급격히 tryptophan이 생산되었으나 6시간 이후부터 48시간까지 완만한 곡선을 나타내며 tryptophan이 생산되었다. 48시간 후에 tryptophan 생산량은 7.7g/l이었으며, 이 수치는 indole의 전환율이 44%, pyruvic acid의 전환율이 33%인 것을 나타낸다.

Tryptophan 생산에 미치는 비수용성 유기용매의 영향

Indole은 물에 매우 적은량 녹으나, 다수의 유기용매에 매우 잘 녹는다(13). 또한 비수용성 유기용매는 indole의 저장소로서 작용하여 반응계에 indole을 점진적으로 공급하는 것으로 알려져 있다(2).

비이온성 계면활성제에서와 마찬가지로 tryptophan 생산시 indole에 의한 기질저해를 감소시키면서 tryptophan을 효과적으로 생산하기 위해 본 실험에서는 몇가지 비수용성 유기용매를 사용하였다.

Table 6에서 볼 수 있는 바와 같이 비수용성 유기용매를 사용한 경우 표준구에 비해 tryptophan의 생산이 향상되었다. 특히 toluene과 benzene을 사용한

Table 6. Effect of non-aqueous organic solvent on the production of tryptophan.

Non-aqueous organic solvent (20%)	Tryptophan (g/l)
None	3.0
Toulene	5.0
Benzene	5.0
Methoxybenzene	4.0
Methylisobutylketone	3.5

경우, 표준구에 비해 각각 57% 및 66% tryptophan이 더 생성되었음을 나타내었다.

상기 실험에서 benzene이 tryptophan 생산에 가장 우수한 비수용성 유기용매로 선택되었으며 서로 다른 용량의 benzene이 tryptophan 생산에 미치는 영향을 조사한 결과를 Table 7에 표시하였다.

Table 7에서 볼 수 있는 바와 같이 표준구에 비해 benzene의 사용시 더욱 많은량의 tryptophan이 생산

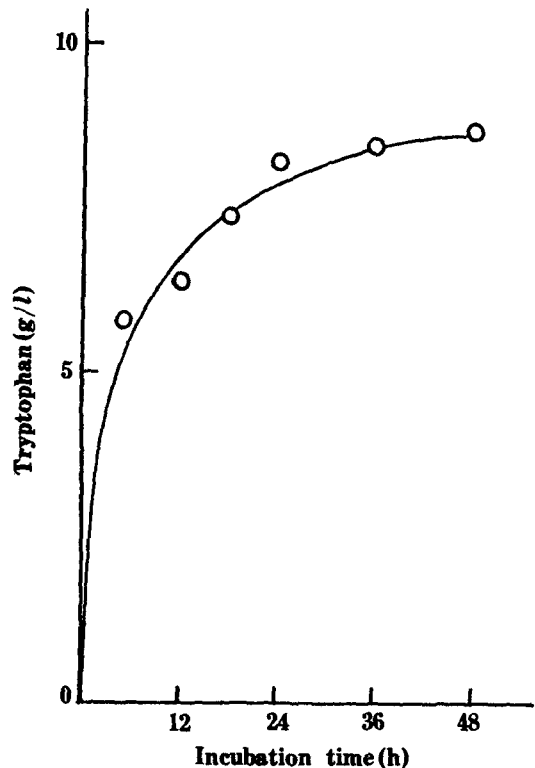


Fig. 4. Time course of the production of tryptophan in the presence of benzene.

Table 7. Effect of benzene volumes on the production of tryptophan.

Benzene (% v/v)	Tryptophan (g/l)
None	3.50
5	5.15
10	5.80
20	5.80
30	5.75

되었으며, 반응용액에 대해 10% 이상의 benzene을 사용할 경우에는 일정한 값을 유지하였다. 본 실험의 결과에 따라 비수용성 유기용매의 선택시에 사용한 반응용액의 20% benzene 대신에 10% benzene을 반응용액에 가하여 시간에 따른 tryptophan 생산 곡선을 조사한 결과가 Fig. 4이다.

비이온성 계면활성제를 사용하였을 때와 마찬가지로 반응초기 6시간까지는 급격히 tryptophan이 생산되었으나, 6시간 이후 부터 48시간까지는 완만한 tryptophan 생산을 나타내었다. 48시간 후에 tryptophan 생산량은 8.7 g/l이었으며, 이 값은 indole의 전환율이 48%, pyruvic acid의 전환율이 36%인 것을 나타낸다. 본 실험의 결과는 비이온성 계면활성제를 사용하는 경우보다 단위 용적당 tryptophan 생산량이 증가되었으며, 또한 비수용성 유기용매의 회수 및 재사용의 관점에서 보더라도 비이온성 계면활성제를 사용하는 경우보다 경제적으로 유리하게 생각되었다.

요 약

Pyruvic acid 생산 미생물로 부터 얻어진 pyruvic acid의 tryptophan으로의 효소적 전환을 조사하였다. 발광 미생물인 *Beneckea* sp.가 pyruvic acid의 생산에 사용되었다. pyruvic acid, indole과 ammonia로 부터 tryptophan을 합성하는 tryptophanase의 효소원으로 *Enterobacter aerogenes* ATCC 10031의 균체가 반응용액에 직접 사용되었다.

Tryptophan의 생산량을 증가시키기 위해, 비이온성 계면활성제와 비수용성 유기용매가 indole의 저장소로 사용되었다. 비이온성 계면활성제의 경우 triton X-100은 매우 효과적이었다. 1.5%의 triton X-100이 사용되었을 때, 37°C에서 48시간 동안에 7.7 g/l의 tryptophan이 생산되었다. 비수용성 유기용매의 경우 10%의 benzene이 사용되었을 때, 37°C에서 48시간 동안에 8.7 g/l의 tryptophan이 생산되었다. 이 tryptophan의 양은 indole과 pyruvic acid를 기준으로 각각 48%와 36%의 전환율에 해당한다.

참고문헌

1. Aida, K., I. Chibata, K. Nakayama, K. Takinami and H. Yamada; *Biotechnology of amino acid production*, *Prog. Ind. Microbiol.* Vol. 24, Kodansha LTD, Tokyo, 188 (1986).
2. Band, W.G., S. Lang, H. Sahn and F. Wagner; *Biotech. Bioeng.*, 25, 999 (1983).
3. Enei, H., Nakazawa, H. Matsui, S. Okumura and H. Yamada; *Japan Patent* 52 (1977).
4. Nakazawa, H., H. Enei, S. Okumura, S. Yoshida and H. Yamada; *Feds. Lett.*, 25, 43 (1972).
5. Yamada H., H. Yoshida, H. Nakazawa and H. Kumakai; *Acta. Vitamin. Enzymol.*, 29, 248 (1975).
6. 이왕식, 방원기, 김정희; *한국산업미생물학회지*, 12(4), 265(1984).
7. Friedemann, T.E. and G.E. Hagen; *J. Biol. Chem.*, 147, 415 (1943).
8. Nakazawa, H., S. Okumura, H. Enei and H. Yamada; *Agric. Biol. Chem.*, 36, 2523 (1972).
9. Morino, Y. and E.E. Snell; *Method in Enzymology*, 17A, 439 (1970).
10. Watanabe, T. and E.E. Snell; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69, 1086 (1972).
11. Yokota, A. and S. Takao; *Agric. Biol. Chem.*, 48, 2663 (1984).
12. Helenius, A. and K. Simons; *Biochem. Biophys. Acta.*, 415, 29,
13. Remers, W.A.: *Indole*, (Houlihan, W.J. ed.) Wiley, New York, 1-229 (1972).

(Received August 19, 1987)