

Candida sp. BT001의 xylose reductase의 정제 및 성질

황인균 · 이상협 · 이왕식 · 방원기

고려대학교 자연자원대학 농화학과

초록 : D-xylose의 통성 발효성 효모, *Candida* sp. BT001로부터 D-xylose를 xylitol로의 전환을 촉매하는 효소, xylose reductase(alditol: NADP⁺ 1-oxidoreductase, EC 1.1.1.21)를 salt fractionation, ion exchange, gel filtration과 affinity chromatography를 거쳐 정제하여 그 성질을 조사하였다. 정제된 xylose reductase는 보조소 NADPH 및 NADH에 모두 특이성을 나타내었으며, 또한 각각의 보조소에 대해 활성을 지니는 효소는 따로 분리되지 않았다. Specific activity는 NADPH에 대해 11.78 U/mg, NADH에 대해 6.01 U/mg이었으며, NADH/NADPH의 활성비는 0.51이었다. 정제된 xylose reductase의 분자량은 SDS-PAGE상에서 31,000, gel filtration상에서 61,000으로 2개의 subunit로 구성된 효소로 추정하였다. 정제된 xylose reductase의 D-xylose와 NADPH 및 NADH에 대한 Km값은 각각 $94.2 \times 10^{-3}M$, $0.011 \times 10^{-3}M$ 및 $0.032 \times 10^{-3}M$ 이었다. Aldose들에 대한 xylose reductase의 활성은 L-arabinose, D-xylose 순으로 높았다. 최적 효소 반응의 pH 및 반응 온도는 각각 6.2와 45°C이었으며, 이 효소는 30°C에서 20분간 안정하였다(1993년 4월 7일 접수, 1993년 5월 14일 수리).

D-xylose(이하 xylose)는 광합성에 의해 고정되는 식물성 재생바이오매스의 주요 구성성분의 하나인 헤미셀룰로오스를 구성하는 오탄당류의 주성분으로,¹⁾ 1981년 Schneider 등²⁾에 의해 자낭효모인 *Pachysolen tannophilus*에 의해 호기적 조건하에서 xylose가 에탄올로 직접 전환된다고 보고된 이래, 에탄올발효의 기질로서 그 가치가 재평가되고 있으며, 에탄올 생산 및 관련 대사계에 대한 연구가 활발히 진행되어 왔다.³⁻⁵⁾

Xylose의 초기대사에 있어서 세균류는 xylose를 xylose isomerase(EC 5.3.1.5)에 의해 xylulose로 직접 이성화하지만, 효모류나 균사형성 균류는 2단계 산화 환원반응, 즉 xylose reductase(alditol: NADP⁺ 1-oxidoreductase, EC 1.1.1.21)에 의한 xylose로부터 xylitol로의 환원반응과 xylitol dehydrogenase(EC 1.1.1.9)에 의한 xylitol로부터 xylulose로의 산화반응에 의해 xylulose로 전환하는 것으로 알려져 있다.⁶⁾

*Candida utilis*를 포함한 대부분의 xylose 자화성 효모류에 있어서 xylose reductase는 NADPH에 특이적이며, xylitol dehydrogenase는 NAD⁺에 특이적이다.^{6,7)} 만일 xylose 환원이 전자공여체인 NADPH에 의존한다면, xylose의 혐기적 대사의 초기단계에서 세포내 NAD⁺/NADH 산화환원계의 불균형을 가져오며, NADPH의 소

비와 함께 과잉의 NADH가 축적된다.⁸⁾ 반면에 *C. shehatae*,⁸⁾ *Pachysolen tannophilus*,⁹⁾ *Pichia stipitis*^{10,11)} 등과 같이 혐기적 조건하에서도 에탄올을 발효할 수 있는 효모류의 xylose reductase는 NADPH는 물론 NADH에 대한 특이성을 나타내기 때문에, 산화환원 불균형을 피할 수 있으며, NADH/NADPH 활성비는 xylose의 혐기적 발효능과 상관관계가 있는 것으로 알려져 있다.

본 연구에서는 xylose를 효율적으로 에탄올로 발효하는 *Candida* sp. BT001로부터 xylose reductase를 정제하고, 그 성질을 검토하였다.

재료 및 방법

공시균주 및 배양

본 실험에서 xylose reductase 효소원으로 사용한 *Candida* sp. BT001은 경기도 북부 지방의 삼립토양에서 분리되었으며, 호기 및 혐기 조건하에서 xylose를 에탄올로 효율적으로 전환한다.¹²⁾ 상기 효모를 YM 배지(0.5% peptone, 0.3% yeast extract, 0.3% malt extract, 1.0% glucose)에 한 백금니 접종한 후, 30°C에서 24시간 진탕배양(2.5 cm-120 strokes/min)하였다. 배양액 1 ml를 100 ml의 본배양 배지(0.15% (NH₄)₂HPO₄, 0.1% (NH₄)₂

SO₄, 0.02% MgCl₂, 0.02% KCl, 0.5% yeast extract, 3.0% xylose, pH 6.0)을 함유한 500 ml용 Erlenmeyer flask에 1%(v/v)가 되도록 접종한 후, 균의 증식이 초기 정지기에 이를 때까지 30°C에서 진탕배양하였다. 상기의 배양액을 원심분리(5,000 g, 30 min)하여 균체를 생리 식염수로 세척한 다음, 원심분리에 의해 균체를 회수하여, -70°C로 보관하면서 필요시마다 사용하였다.

Xylose reductase 활성 측정

Xylose reductase 활성은 Chiang과 Knight¹³⁾의 방법을 약간 변형하여 사용하였다. 분광광도계(Beckman UD-64)를 사용하여 보효소 NADPH 및 NADH의 산화에 따른 흡광도의 감소를 340 nm에서 시간의 경과에 따른 흡광도의 변화를 측정하였으며, 0.02~0.15/min의 범위내에서 측정하였다. 반응 혼합액은 ml당 500 mM 인산염 완충 용액(pH 7.2) 0.1 ml, 100 mM 2-mercaptoethanol 0.1 ml, 1.3 mM NAD(P)H 0.1 ml, 500 mM D-xylose 0.1 ml 및 효소액 0.1 ml로 구성하였으며, 산화되는 NAD(P)H의 ϵ_{340} 은 6.22(cm²/ μ mole)이다. 효소의 1 unit는 1분 동안 1 μ mole의 NAD(P)H를 산화시키는 효소량으로 정의하였다.

단백질 정량

정제 과정 중에 단백질 농도는 분광광도계로 280 nm에서의 흡광도로 측정하였으며, 또한 단백질 농도는 Bradford의 방법¹⁴⁾으로 측정하였으며, bovine serum albumin(Sigma Co.)을 표준 단백질로 사용하였다.

Xylose reductase 정제

모든 정제 과정은 4°C에서 수행하였다.

1) 조효소액의 조제

균체를 50 mM 인산염 완충용액(pH 7.2)에 현탁시킨 다음, 현탁액과 glass beads(0.25~0.5 mm)를 부피비로 1:3의 비율로 혼합한 후, Bead-Beater(Biospec products Co.)을 이용하여 1분 간격으로 30초씩 15분간 처리하여 균체를 파괴시켰다. 파쇄액을 여과하여 beads와 분리시킨 다음, 원심분리(12,000 rpm, 30 min)하여 상등액을 조효소액으로 하였다.

2) Ammonium sulfate 분획

조효소액에 30~75% 포화농도가 되도록 (NH₄)₂SO₄를 처리한 후, 원심분리(12,000 rpm, 30 min)하여 침전물을 회수하였다. 침전물에 15 ml의 25 mM 인산염 완충용액(0.2 mM EDTA, 1 mM 2-mercaptoethanol, pH 7.2)을 가하여 녹인 다음, 동일한 완충용액에 대해 12시간 투석하였다.

3) DEAE-Sephacel chromatography

상기 효소액을 25 mM Tris-Cl 완충용액(0.2 mM EDTA, 1 mM 2-mercaptoethanol, pH 7.2)로 평형시킨 DEAE-Sephacel column(Pharmacia Co., 2.5×16.5 cm)에 통과시킨 다음, 약 150 ml의 동일 완충용액으로 15 ml/hr의 속도로 세척하였다. 본 효소는 이 column에 흡착되지 않는다. 통과액과 세척액을 모아 PEG상에서 농축시킨 다음, 동일 완충용액에 대해 투석하였다.

4) DEAE-Sephadex A-50 chromatography

상기 효소액을 25 mM Tris-Cl 완충용액(0.2 mM EDTA, 1 mM 2-mercaptoethanol, pH 7.2)으로 평형시킨 DEAE Sephadex A-50 column(1.6×15 cm)에 흡착시킨 후, 0~0.5 M KCl 농도순배로 용출하였으며, 본 효소는 0.1~0.2 M의 KCl 농도에서 용출하였다.

5) Sephacryl S-200 gel filtration

상기 효소액을 25 mM 인산염 완충용액(100 mM KCl, pH 7.2)로 평형시킨 Sephacryl S-200 column(3.4×70cm)에 loading한 다음, 동일 완충용액으로 15 ml/hr의 속도로 용출하였다. 용출액 중 xylose reductase 활성이 있는 분획들(7.2 ml/fraction)을 모아 농축시킨 다음, 동일 완충용액에 대하여 투석하였다.

6) Affi-Gel Blue affinity chromatography

상기 효소액을 50 mM Tris-Cl 완충용액(pH 8.2)으로 평형시킨 Affi-Gel Blue column(BioRad Co., 1.6×5 cm)에 흡착시킨 후, 50 μ M NADP⁺를 포함하는 동일 완충용액으로 세척한 다음, 50~500 μ M의 NADP⁺ 농도순배로 20 ml/hr의 속도로 용출하였다. 본 효소는 200~400

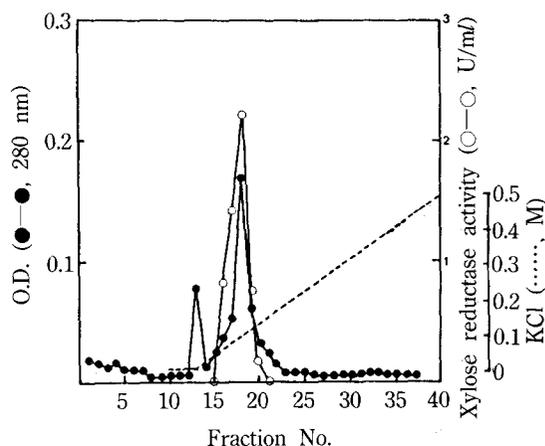


Fig. 1. DEAE-A50 ion exchange chromatography of xylose reductase. After loading the sample protein, the column was washed with 25 mM Tris-Cl buffer (pH 7.2) and eluted with a linear gradient of KCl dissolved in the same buffer composition.

μM의 NADP⁺에서 용출하였다. 용출된 분획을 모아 농축한 후 동일 완충용액에 대하여 투석하였다.

SDS-PAGE electrophoresis

효소의 단백질 순도를 측정하기 위하여 sodium dodecylsulfate를 함유하는 11%의 polyacrylamide gel상에서 Laemmli¹⁵⁾의 방법에 따라 전기영동하였다.

분자량 측정

효소의 분자량은 Sephadex G-100 column(1.6×56 cm)에 의한 gel filtration으로부터 측정하였으며, subunit의 분자량은 Laemmli¹⁵⁾의 방법에 따라 SDS-PAGE 전기영동에 의해 결정하였다.

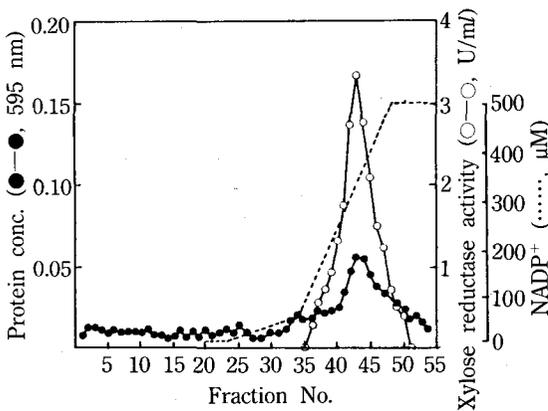


Fig. 2. Affi-Gel Blue affinity chromatography of xylose reductase. After loading the sample protein, the column was washed with 50 mM potassium phosphate buffer(pH 8.2) containing 50 μM NADP⁺ and eluted with a linear gradient of NADP⁺ dissolved in the same buffer composition.

결과 및 고찰

효소의 정제 및 분자량 측정

생균체 24 g에서 얻어진 조효소액을 상기와 같이 salt fractionation, DEAE-Sephacel 및 DEAE-Sephadex A-50 ion exchange chromatography, Sephacryl S200 gel filtration, 및 Affi-Gel Blue affinity chromatography를 통하여 정제하였으며, DEAE-Sephadex A-50 및 Affi-Gel Blue column 상에서의 용출 pattern은 Fig. 1과 2와 같다. 상기 6단계의 정제과정을 거쳐 Fig. 3과 같이 단일 band로 정제된 xylose reductase를 얻었으며 그 결과는 Table 3

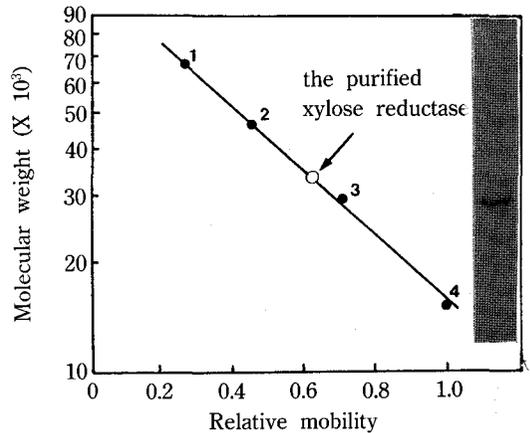


Fig. 3. Determination of molecular weight of yeast xylose reductase by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Gel electrophoresis was carried out in 11% (w/v) polyacrylamide gel containing SDS. 1, Albumin, bovine serum, 66,000; 2, Albumin, egg, 45,000; 3, Carbonic anhydratase, 29,000; 4, α-Lactalbumin, 14,200

Table 1. Purification of xylose reductase from *Candida* sp. BT001

Procedure	Volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity(U)		Specific activity(U/mg)		Yield(%)*	Purification factor*	NADH/NADPH linked activity ratio(%)
			NADPH	NADH	NADPH	NADH			
Cell-free extract	205	766.70	291.35	161.00	0.38	0.21	100	1	0.55
Ammonium sulfate (30~75%)	82	431.69	250.38	125.19	0.58	0.29	85.92	1.52	0.50
DEAE-Sephacel	54	91.39	216.59	115.15	2.37	1.26	74.34	6.24	0.53
DEAE-A50	17	32.75	203.71	108.08	6.22	3.30	69.92	16.37	0.53
Sephacryl S-200	15	19.58	148.58	72.84	7.59	3.72	50.99	19.97	0.49
Affi-Gel Blue	15	8.12	95.68	48.80	11.78	6.01	32.84	31.01	0.51

*Yield and purification factor against NADPH-linked activity

*Enzyme activity was measured in 50 mM phosphate buffer (pH 7.2) containing 0.13 mM NADPH, 10 mM mercaptoethanol, and 50 mM xylose

과 같다. NADPH를 보조소로 사용하였을 경우 수율은 32.8%였고, 약 31배의 정제 배수를 나타내었다. 정제 과정 중의 NADPH-의존성 xylose reductase와 NADH-의존성 xylose reductase의 활성은 분리되지 않았으며, 정제 효소는 보조소 NADPH와 NADH에 모두 특이성을 나타내었다. 이 결과는 *Pichia stipitis*에 있어서와 같이 NADPH- 및 NADH-specific xylose reductase 활성이 동일한 효소상에 있다는 결과와 잘 일치하였다.^{10,20)} 정제 효소의 NADPH에 대한 비활성은 11.78 U/mg이었고, NADH에 대한 비활성은 6.01 U/mg이었다. 따라서 xylose reductase의 NADPH에 대한 NADH의 활성비는 0.51이었다. 이와 같은 결과는 *Pichia stipitis*¹⁰⁾의 0.65보다는 낮지만 *Candida shehatae*⁸⁾의 0.4보다는 높은 비율이었다.

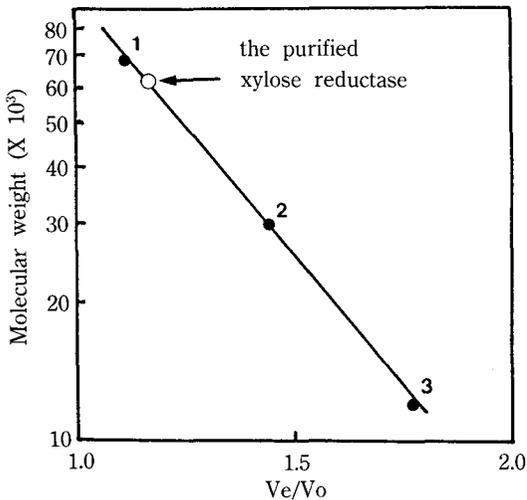


Fig. 4. Determination of molecular weight of yeast xylose reductase by Sephadex G-100 gel filtration. 1. Albumin, bovine serum : 66,000, 2. Carbonic anhydrase : 29,000, 3. Cytochrome C, horse heart : 12,400

본 효소의 분자량을 결정하기 위하여 11% gel을 사용하여 SDS-PAGE 전기영동을 수행한 결과, Fig. 3과 같이 xylose reductase의 subunit 분자량은 31,000으로 추정되었다. 또한 정제 효소를 Sephadex G-100 gel filtration chromatography를 수행한 결과, Fig. 4와 같이 xylose reductase의 분자량은 61,000으로 추정되었다. 따라서 본 효소의 분자량은 2개의 subunit로 구성되어 있는 것으로 판단되었다. 상기의 결과는 *Pichia stipitis*에서 분자량 32,000의 2개의 subunit로 구성된 분자량 63,000의 효소라는 보고¹⁰⁾와, *Pichia stipitis* 및 다른 효모들의 xylose reductase의 분자량¹¹⁾과 유사한 결과였으며, *Pachysolen tannophilus*에서 보고된 35,000~40,000의 단일 subunit의 효소와는 다른 결과였다.

Kinetics

NADPH와 xylose에 대한 xylose reductase의 동역학적 성질을 구하기 위하여 기질 농도의 변화에 따른 효소 활성을 조사하였다. 그 결과 NADH와 NADPH 및 xylose는 모두 전형적인 Michaelis-Menten kinetics를 보여주었으며 Lineweaver-Burk Plot에 의해 구한 Km값 및 Vmax값을 Table 2에 나타내었다.

기질의 특이성

Xylose reductase의 기질 친화성과 특이성을 조사하기 위하여, Table 3과 같이 오탄당과 육탄당을 사용하여 실험을 수행하였다. 오탄당의 경우에 D-xylose, L-arabi-

Table 2. Michaelis constants of xylose reductase for substrates

Substrate	Km ($\times 10^{-3}$ M)
NADH	0.032
NADPH	0.011
D-Xylose	94.20

Table 3. Kinetic parameters for reduction of various aldoses by xylose reductase

Substrates	Km ($\times 10^{-3}$ M)	Vmax(U/mg)		Vmax/Km		Vmax(NADH)/Vmax(NADPH)
		NADPH	NADH	NADPH	NADH	
L-Arabinose	60.3	37.86	19.61	0.63	0.32	0.51
D-Xylose	94.2	32.82	17.07	0.35	0.18	0.51
D-Ribose	97.8	1.80	0.75	0.018	0.008	0.44
D-Mannose	64.8	0.69	0.30	0.011	0.005	0.45
D-Glucose	183.4	4.88	2.70	0.027	0.015	0.55
D-Galactose	210.4	8.93	3.84	0.042	0.018	0.43

*All assays above were measured at the concentration of 0.13 mM NADPH or NADH

nose 및 D-ribose의 Km값은 각각 $94.2 \times 10^{-3} M$, $60.3 \times 10^{-3} M$ 및 $97.8 \times 10^{-3} M$ 이었으며, 육탄당의 경우 D-mannose, D-glucose 및 D-galactose의 Km값은 각각 $64.8 \times 10^{-3} M$, $183.4 \times 10^{-3} M$ 과 $210.4 \times 10^{-3} M$ 이었다. 그러나 기질 특이성(V_{max}/K_m)에 있어서는 L-arabinose, D-xylose순 이었다. 이러한 기질 특이성은 xylose reductase에서 보고된 바와 같다.^{11,16)} 또한 L-arabinose와 D-xylose의 NADPH에 대한 NADPH의 활성비는 0.51이었다.

효소의 일반적 성질

1) pH의 영향

반응 혼합액 중의 인산염 완충용액의 pH 변화가 xylose reductase의 효소 활성에 미치는 영향을 조사하였으며, 그 결과를 Fig. 5에 나타내었다. pH의 변화에 따른 효소는 NADPH 및 NADH에 대한 활성은 모두 pH 5.0에서부터 pH 6.2까지는 증가하였으나, pH 6.2 이후에서는 감소하였다. 따라서, pH 6.2 부근에서 활성이 최대임을 나타내었다. 또한 NADPH에 대한 NADH의 활성비도 pH 6~7의 범위에서는 0.5정도로 일정하게 유지되었다.

2) 열 안정성

기질을 제외한 반응 혼합액에 일정한 unit의 xylose reductase를 가한 후, 각기 다른 온도에서 일정한 시간 간격으로 전처리한 후, 실온에서 기질을 첨가하여 온도에 대한 상대적 효소 활성도를 조사하였다. 그 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 30°C 에서는 비교적 열 안정성을 보이,

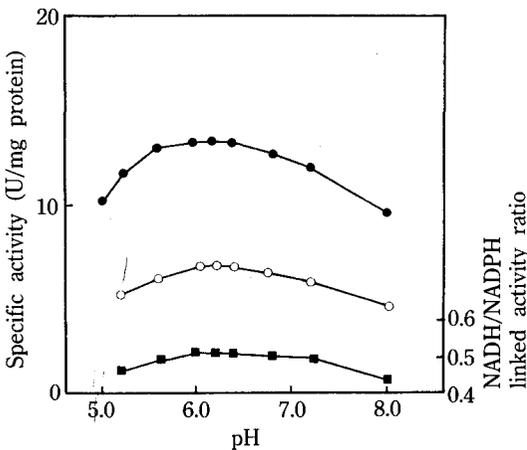


Fig. 5. Effect of pH on activity of xylose reductase. Enzyme activity was measured in 50 mM phosphate buffer at various pH values, containing 0.13 mM NADPH, 10 mM 2-mercaptoethanol, and 50 mM xylose. ●—●, NADPH-linked; ○—○, NADH-linked; ■—■, NADH-linked activity ratio

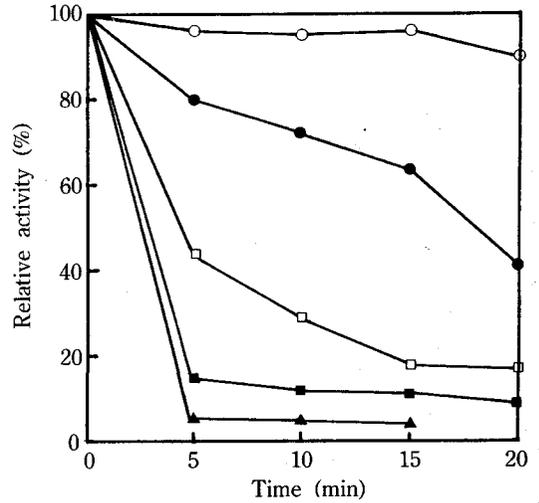


Fig. 6. Thermal stability of xylose reductase. The enzyme was preincubated at 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, and 50°C, respectively for various lengths of times and the residual activity was measured in 50 mM phosphate buffer (pH 7.2) containing 0.13 mM NADPH, 10 mM 2-mercaptoethanol, and 50 mM xylose. ○—○, 30°C; □—□, 40°C; ▲—▲, 50°C; ●—●, 35°C; ■—■, 45°C

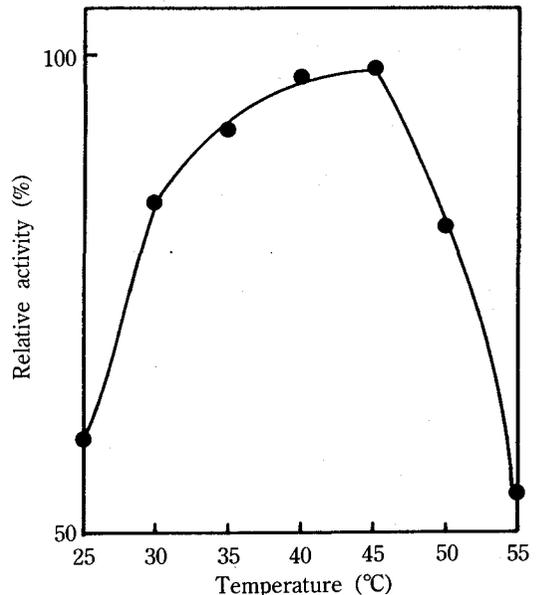


Fig. 7. Effect of temperature on activity of xylose reductase. Enzyme reaction was carried out at each temperature shown in the figure for 4 min in 50 mM phosphate buffer (pH 7.2) containing 0.13 mM NADPH, 10 mM 2-mercaptoethanol, and 50 mM xylose.

온도가 증가함에 따라 급격히 효소의 활성이 감소되었다.

3) 반응 온도의 영향

반응 혼합액내에서 20~50°C 사이의 일정 온도에서 효소의 활성이 일정하게 유지되는 4분 동안 효소와 반응시켰을 때의 효소의 상대적 활성도를 측정하였다. 실험 결과 Fig. 7에서와 같이, 45°C 부근에서 최대의 활성을 보였다.

참 고 문 헌

- Barnett, J.A. : *Adv. Carbohydr. Chem.* 32 : 125-234 (1976)
- Schneider, H., P.Y. Wang, Y.K. Chan, and R. Maleszka : *Biotechnol. Lett.* 3 : 89-92(1981)
- Jeffries, T.W. : *Biotechnol. Lett.* 3 : 213-218(1981)
- Suihko, M.L. and T.M. Enari : *Biotechnol. Lett.* 3 : 723-728(1981)
- Chiang, L.C., H.Y. Hsiao, M.C. Flickinger, L.F. Chen, and G.T. Tsao : *Enzyme Microb. Technol.* 4 : 93-95(1982)
- Jeffries, T.W. : *Adv. Biochem. Eng.* 27 : 1-31(1983)
- Gong, C.S. : Recent Advances in D-Xylose Conversion by Yeasts. in 'Annual Reports on Fermentation Processes. 7', 253-297, Academic Press.(1983)
- Bruinenberg, P.M., P.H.M. de Bot, J.P. van Dijken, and W.A. Scheffers : *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 19 : pp. 256-260(1984)
- Bolen, P. L., K.A. Roth, and S.N. Freer : *Appl. Environ. Microbiol.* 52 : 660-664(1986)
- Rizzi, M., P. Eriemann, Ngoc-Anh Bui-Thanh, and H. Dellweg : *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 29 : 148-154(1988)
- Verduyn, C.R. van Kleef, J. Frank, H. Schreuder, J.P. van Dijken, and W.A. Scheffers : *Biochem. J.* 226 : 669-677(1985)
- 이상협 : 고려대학교 박사학위 논문(1993)
- Chiang, C. and S.G. Knight : in 'Method in Enzymology', vol 9. pp. 188-193, Academic Press, New York, 188-193(1966)
- Bradford, M. : *Anal. Biochem.*, 72 : 248(1976)
- Laemmli, U.K. : *Nature*, 227 : 680-685(1970)
- Ditzelmuller G., C.P. Kubicek, W. Wohrer, and M. Rohr : *Can. J. Microbiol.*, 30 : 1330-1336(1986)

Purification of xylose reductase from *Candida* sp. BT001 and characterization of its properties

In-Gyun Hwang, Sang-Hyub Lee, Wang-Sik Lee, and Won-Gi Bang(Department of Agricultural Chemistry, Korea University, Seoul 136-701, Korea)

Abstract : Xylose reductase (alditol: NADP⁺ 1-oxidoreductase, EC 1.1.1.21) from the xylose-fermenting yeast, *Candida* sp. BT001, was purified via salt fractionation, ion-exchange, gel filtration and affinity chromatography, and its properties were characterized. The enzyme from the yeast was active with both NADPH and NADH as coenzyme. The xylose reductase activity with NADH was approximately 51% of that with NADPH and the specific activities of purified enzyme with NADPH and NADH were 11.78 U/mg and 6.01 U/mg, respectively. Molecular weight of the purified enzyme was 31,000 on SDS-PAGE and 61,000 on gel filtration. The Km for D-xylose, NADPH, and NADH was 94.2×10^{-3} M, 0.011×10^{-3} M, and 0.032×10^{-3} M, respectively. The purified xylose reductase had relatively higher substrate affinity for L-arabinose than other aldoses tested. The optimal pH was 6.2 and the optimal reaction temperature was 45°C. The thermal stability of the enzyme was for 20 minutes at 30°C.