

Candida sp. L-16이 생산하는 D-Xylulokinase의 정제 및 특성

이종수* · 주길재

*대구산업정보대학 식품가공과, 경북대 농업과학기술연구소

Purification and Characterization of the D-xylulokinase from *Candida* sp. L-16

Jong-Soo Lee* and Gil-Jae Joo

*Department of Food Science and Technology, Daegu Polytechnic College, Daegu 706-711, Korea
Institute of Agricultural Science and Technology, Kyungpook Nat'l Univ., Daegu 702-701, Korea

Abstract

The D-xylulokinase from *Candida* sp. L-16 was purified through a sequence of ammonium sulfate fractionation, DEAE-cellulose chromatography, Sephadex G-100 and Sephadex G-200 gel filtration. The specific activity of the purified D-xylulokinase was increased to 23.2 fold and the yield was 11.2%. The enzyme was showed to be a single protein band by SDS-PAGE. The molecular weight of the enzyme was 150,000 dalton, this enzyme was identified to be a dimer with two subunits. The optimum conditions of the enzyme were pH 8.0 and 40°C, respectively. The enzyme was relatively stable between pH 7.0 to pH 9.0, but it was unstable over 30°C. The enzyme showed substrate specificity on D-xylulose, D-arabinose and D-ribose, Km value and Vmax for D-xylulose were 0.042 mM and 117 units/ml, respectively. The activation energy of the enzyme was 4.75 Kcal/mol. The enzyme was inhibited by metabolic intermediates such as 6-phosphogluconic acid, 2-keto-gluconic acid. The enzyme was activated by EDTA and thiol compounds such as cysteine-HCl, DTT and glutathione.

Key words : Purification, D-xylulokinase, *Candida* sp.

서 론

D-Xylose는 식물 세포벽을 구성하며(1), 바이오매스의 10-40%를 구성하고 있는 비셀룰로오스계 다당류인 헤미셀룰로오스의 주요 구성성분으로서 목재나 농업 부산물로부터 얻어지는 바이오매스로 glucose 다음으로 풍부하게 존재하는 당질이다(2). 원핵생물과 진핵생물의 D-xylose 대사경로는 초기단계에서 서로 다른 대사경로를 거쳐 D-xylulose가 된 다음 D-xylulose-5-phosphate로 전환되는 것으로 알려져 있다(3). 원핵생물인 세균에서는 주로 D-xylose isomerase (EC.5.3.1.5)에 의한 이성화반응을 통하여 D-xylose를 D-xylulose로 직접 전환시키나 진핵생물인 효모나 곰팡이에서는 D-xylose가 주로 산화-환원반응에 의하여 두 단계의 효소학적인 D-xylulose로 전환한다(4). D-Xylose는 D-xylose reductase (EC.1.1.1.21)에 의해 D-xylitol로 환원되며(5), D-xylitol은 D-xylitol dehydrogenase (EC.1.1.1.9)에 의해 다음 단계인 D-xylulose로 산화된다(6).

D-Xylulose는 D-xylulokinase (EC.2.7.1.17)와 ATP에 의해 주요 대사중간 생성물질인 D-xylulose-5-phosphate로 인산화 된 다음(7), 오탄당 인산경로와 EMP 경로를 거쳐 에탄올 생산이 이루어진다(8).

본 연구팀은 바이오매스에 D-glucose 다음으로 풍부한 D-xylose를 자화 발효하여 직접 에탄올을 생산할 목적으로 오래된 사찰주위의 썩은 밤나무 그루터기로부터 에탄올 생산력이 우수한 효모균주를 분리 선별하여 동정하였고, 에탄올 생산의 최적조건에 대한 본 균주의 발효학적 제성질에 대한 연구 등을 수행하였다. 또한 D-xylose로부터 에탄올을 직접 생산할 때에 xylose 발효대사에 주요한 효소들인 D-xylose를 D-xylitol로 전환시키는 D-xylose reductase와 D-xylitol을 산화시켜 D-xylose로 전환시키는 D-xylitol dehydrogenase의 존재를 확인하여 D-xylose 발효대사 경로를 규명함과 동시에 이들 효소를 분리 정제하여 효소학적 제성질을 이미 조사하여 보고한바 있다(9).

본 연구에서는 D-xylulose를 인산화 반응에 의해 D-xylose-5-phosphate로 전환시키는 D-xylulokinase를 정제하여 그 효소학적 특성을 조사하였기에 보고 하고자 한다.

Corresponding author : Jong-Soo Lee, Department of Food Science and Technology, Daegu Polytechnic College, Daegu 706-711, Korea
E-mail : jslee@mail.tpic.ac.kr

재료 및 방법

공시균주 및 배양 방법

본 실험에 사용한 공시균주는 *Candida* sp. L-16(9)이며, 플라스크 배양은 2% D-xylose, 0.3% yeast extract, 0.3% malt extract 및 0.5% bacto peptone(pH 4.5) 배지에서 30°C, 24시간 진탕 배양하였고, Jar fermenter ((주)한국발효기상사, 용량 5ℓ, 원지름 20cm, 높이 25cm, baffle 10 x 2 cm 4개 부착, impeller 1 x 5 cm r형) 배양은 상기 플라스크 배양에서와 동일한 배지를 살균하여 사용하였고, 3ℓ 배지에 종균은 삼각플라스크 배양액 (50 ml, 1.4×10^8 cfu/ml)을 사용하였다. 공기 주입량은 각각 1vvm, 교반 속도는 각각 100rpm으로 설정하여 72시간 동안 배양하여 효소 정제용으로 사용하였다.

D-Xylulokinase의 활성

D-Xylulokinase의 활성은 0.5M Tris-0.5M KCl-0.01M EDTA 완충액 (pH 8.0) 0.1ml 와 0.01M phosphoenolpyruvate, 0.05M MgCl₂, 0.01M ATP (1:1:0.5 부피비)를 조제해서 만든 혼합액 0.25ml, 0.03M NADH 0.03ml, 0.01M D-xylose 0.1ml, L-lactic dehydrogenase 0.03ml (60μg/ml) 및 증류수 0.39ml를 혼합한 후 40°C에서 3분간 예열시킨 후 0.01M Tris-1mM EDTA-1mM dithiothreitol, 완충액 (pH 8.0)에 희석된 효소액 0.1ml를 가하여 Simpson의 방법(10)으로 340nm에서 1분간 흡광도의 감소(ΔE)로 효소활성을 측정하였다. 효소의 활성단위(1unit)는 1분간에 D-xylose 1mmol을 인산화시키는데 필요한 효소의 양을 1 unit로 하였다.

조효소액의 조제

조효소액은 균체배양액을 원심집균 (4,000rpm, 20min)하고 균체 6g을 0.01M tris-HCl-1M EDTA 완충액 (pH 8.0) 60ml에 현탁하여 초음파 파쇄기(Ultrasonic Co., 90μA, USA)로 9분간 파쇄하고 15,000rpm에서 20분간 원심분리하여 상정액을 조효소액으로 사용하였다.

D-Xylulokinase의 정제

D-Xylulokinase의 정제를 위하여 조효소액을 황산암모늄으로 분획 (30~80%)한 후 DEAE-cellulose chromatography, Sephadex G-100 및 Sephadex G-200 gel filtration 과정으로 정제하였으며 모든 조작은 4°C이하에서 행하였다. 단백질 정량은 소의 혈청 알부민을 표준 단백질로 하여 280nm의 흡광도로 표시하였다.

SDS-polyacrylamide 겔 전기영동

SDS-PAGE는 Laemmli 방법(11)에 따라 10% acrylamide에

서 전기영동하였으며, 용매는 SDS-tris-glycin 완충액(0.025M tris, 0.192M glycine, 0.1% SDS, pH 8.3)을 사용하였고, bromophenol blue tracking dye로 하여 15mA의 전류에 4시간 전기영동한 후 탈색하였다.

분자량 측정

정제 효소의 분자량 측정은 SDS-PAGE와 Sephadex G-200 겔 여과에 의한 Andrews의 방법(12)에 준하여 측정하였다. 이때 사용된 표준단백질은 glucose oxidase (MW 154,000 dalton), β-galactosidase (MW 116,000 dalton), phosphorylase (MW 97,400 dalton), bovine serum albumin (MW 66,000 dalton), egg albumin (MW 45,000 dalton) 및 carbonic anhydrase (MW 29,000 dalton)이었다.

결과 및 고찰

D-Xylulokinase의 정제

조효소액 60ml를 황산암모늄 30% 포화되게 서서히 첨가하여 1시간 방치 후 15,000rpm에서 20분간 원심분리하여 상정액을 취하여 다시 황산암모늄을 80% 되게 포화하도록 서서히 첨가한 후 6시간 방치하여 효소단백질을 침전시켰다. 침전된 단백질은 다시 15,000rpm에서 20분간 원심분리하여 상정액을 제거한 후 침전물을 0.01M tris-HCl-1mM EDTA 완충액(pH 8.0)으로 용해시켰다. 동일완충액으로 8시간 투석하여 얻은 효소액 15ml를 DEAE-cellulose column chromatography 과정에 이용하였다.

황산암모늄 분획에서 얻어진 효소액 15ml를 상기 완충액으로 평형화 시킨 DEAE-cellulose column(1.4 × 13.5cm)에 넣고 동일완충액으로 비흡착 단백질 부분을 완전히 씻어낸 다음 흡착 단백질 부분을 NaCl (0~0.3M)로 직선농도 기울기로 40ml/h 유속으로 분획당 4ml씩 순차적으로 용출하였다. 0.17M NaCl 농도에서 D-xylulokinase가 용출되었으며, 효소활성을 비교적 높은 76번에서 90번 분획까지의 효소에서 약 40ml를 모아 좀더 정제하기 위해 Sephadex G-100으로 겔 여과를 행하였다.

DEAE-cellulose column chromatography에서 얻은 효소액 40ml를 Amicon사의 한외 여과 농축기로 동일 완충액으로 평형화 시킨 Sephadex G-100 column(1.4 × 80cm)에 넣고 15ml/h의 유속으로 분획당 3ml 씩 순차적으로 용출하였다. 본 D-xylulokinase는 분획번호 16번에서 23번 사이의 분획에서 용출되었으며, 비교적 활성이 높은 분획 중에서 효소액 약 12ml를 모아 Amicon사의 한외 여과 농축기로 2.5ml/회 농축하였다.

농축한 효소액을 상기 완충액으로 평형화 시킨 Sephadex G-200 column (1.6 × 105cm)에 넣고 10ml/h의 유속으로 분획

당 2.7ml 씩 겔 여과한 결과, 본 D-xylulokinase는 분획번호 10번에서 15번상이의 분획에서 용출되었으며, 최종적으로 이 효소액 약 10ml를 수집하였고 이상의 정제과정을 정리하면 Table 1과 같이 회수율은 11.2%, 23.2배의 정제도를 나타내었다. 또한 SDS-PAGE 결과, 본 효소들은 단일 밴드로 나타나서 전기영동상으로 순수하게 정제 되었음이 확인 되었다(Fig. 1).

Table 1. Summary of purification procedure of D-xylulokinase from Candida sp. L-16

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Purification fold	Yield (%)
Crude enzyme	228.0	5200	22.8	1.0	100.0
(NH ₄) ₂ SO ₄ (30~80%)	73.5	3360	45.7	2.0	64.6
DEAE-cellulose	24.3	2390	97.5	4.3	45.6
Sephadex G-100	3.1	1108	357.4	15.6	21.3
Sephadex G-200	1.1	582	529.1	23.2	11.2

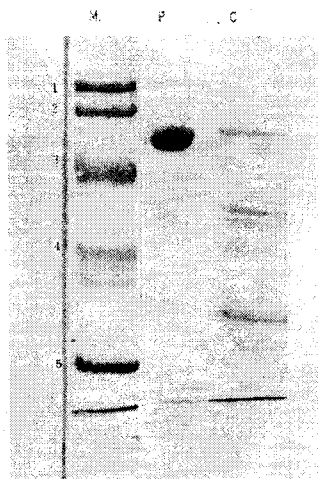


Fig. 1. SDS-PAGE analysis of the purified D-xylulokinase from Candida sp. L-16.

Lane C, crude enzyme. Lane P, purified D-xylulokinase. Lane M, maker proteins of known molecular weight : 1, β -galactosidase(116,000 Da) : 2, phosphorylase (97,400 Da) : 3, bovin serum albumin (66,000 Da) : 4, egg albumin (45,000 Da) : 5, carbonic anhydrase (29,000 Da).

정제효소의 분자량 측정

정제효소의 Sephadex G-200 겔 여과에 의해 추정된 분자량은 약 150,000 dalton이었으며, SDS-PAGE에 의해 본 효소의 상대적 이동도에 의한 분자량은 약 75,000 dalton이었으므로 동일 subunit로 구성된 dimer로 추정된다.

D-Xylulokinase는 Mortlock 등(13)이 *Aerobacter aerogenes*에서 분리한 D-xylulokinase는 107,000 \pm 12,000 dalton으로 보고하였고, Wilson과 Mortlock(14)는 104,000 dalton, Neuberg

등(15) *Klebsiella aerogenes*에서 D-xylulokinase는 108,000 dalton으로 2개의 subunit로 되어 있다고 보고하였다.

정제 효소의 온도 및 pH 영향

효소활성에 미치는 온도의 영향을 조사하기 위하여 각 온도에서 3분간 반응시켜 효소의 활성을 조사한 결과, 온도가 증가할 수록 효소의 활성이 증가하여 30 $^{\circ}$ C에서 50 $^{\circ}$ C 부근에서 활성이 높게 나타났고 40 $^{\circ}$ C에서 최대 활성을 나타내었다. 또한 각 온도에서 20분간 열처리한 후 잔존 효소활성을 측정된 결과, 30 $^{\circ}$ C 부근까지는 비교적 안정하였으나, 그 이상의 온도에서는 효소활성이 급격히 감소하는 것으로 나타났다.

효소활성에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위하여 반응액의 pH를 pH 6.0에서 pH 9.0까지 0.5간격으로 변화시키면서 최적 반응온도 40 $^{\circ}$ C에서 3분간 반응시킨 후, 효소활성을 측정된 결과, 정제 효소의 최적 pH는 pH 8.0부근이었다. 또한 pH가 효소의 안정성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 반응액을 pH 8.0으로 조정하여 40 $^{\circ}$ C에서 3분간 예열 시킨 후, 4 $^{\circ}$ C에서 각 pH에 6시간 방치시킨 효소액을 첨가하여 잔존 효소활성을 측정했다. pH 6.0에서 pH 9.0 까지 비교적 안정하였으며, 이 범위 밖의 pH 에서는 효소활성이 대단히 불안정하였다. 이러한 결과는 *Aerobacter aerogenes* PRL-R3 D-xylulokinase의 최적 pH가 7.8 이었다는 Simpson의 보고(10)와는 어느 정도 일치하였다.

정제효소의 기질 특이성 및 농도의 영향

정제 D-xylulokinase의 기질 특이성을 조사하기 위하여 1mM 농도의 몇 가지 기질에 대하여 효소활성을 측정했다. Table 2에서와 같이 D-xylulose, D-arabinose 및 D-ribose 등은 거의 같은 정도의 활성으로 정제효소의 기질로서 작용하였고, D-xylose, D-glucose 및 L-arabinose 등은 약한 효소활성을 보여 기질로서 미약하게 작용하였으며, D-xylitol, D-galactose, D-mannose 및 D-fructose 등은 기질로서 작용하지 못하였다.

기질 농도가 D-xylulokinase의 반응속도에 미치는 영향을 조사하기 위해 에 D-xylulose를 기질로 하여 반응시킨 후 효소활성을 측정하였다. Lineweaver-Burk 방법 따라 작도한 결과, Fig. 2에서보는 바와 같이 D-xylulose에 대한 Km 값은 0.042mM이었으며, Vmax는 117 units/ml이었다.

Table 2. Substrate specificity of the purified D-xylulokinase from Candida sp. L-16

Substrate (1mM)	Relative activity (%)	Substrate (1mM)	Relative activity (%)
D-Xylulose	100.0	L-Arabinose	10.0
D-Xylose	10.0	D-Glucose	12.5
D-Xylitol	0.0	D-Galactose	0.0
D-Ribose	98.2	D-Mannose	0.0
D-Arabinose	115.8	D-Fructose	0.0

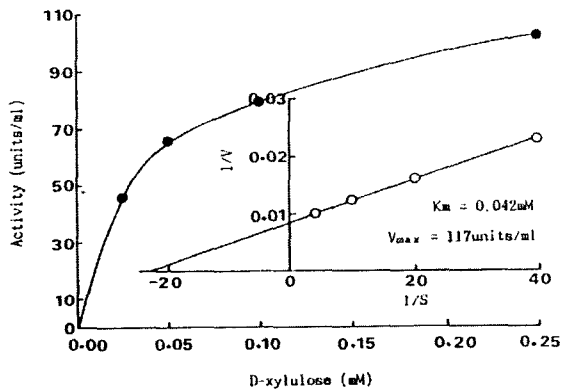


Fig. 2. Lineweaver-Burk plot of the relation between D-xylose concentration and the initial velocity by *Candida sp. L-16* D-xylokinase.

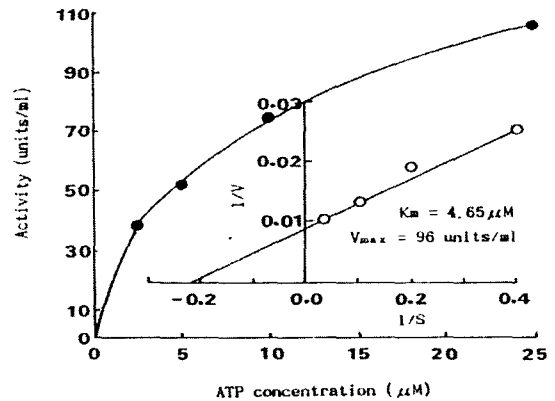


Fig.3. Lineweaver-Burk plot of the relation between ATP concentration and the initial velocity by *Candida sp. L-16* D-xylokinase.

정제효소의 활성에 미치는 영향

본 효소의 반응 속도에 미치는 ATP 농도의 영향을 조사하기 위하여 반응액 내의 ATP의 농도를 달리하여 반응시킨 후 효소활성을 측정하여 Lineweaver-Burk 방법에 따라 작도한 결과, Fig. 3에서 보는 바와 같이 ATP에 대한 Km 값은 4.65 μM, Vmax는 96units/ml로 나타났다. 또한 정제 D-xylokinase의 활성화 에너지값 (Ea)을 측정하기 위하여 25℃에서 40℃까지 온도 변화에 따른 효소활성을 Arrhenius 식에 의해 작도한 결과, 본 효소의 활성화 에너지 값 (Ea)은 약 4.75 Kcal/mol 이었다. 효소활성을 증강시키는 활성화제의 영향을 조사하기 위하여 효소반응액에 EDTA와 DDT (1,4-dithiothreitol)를 첨가하지 않는 것을 대조구로 하여 각 활성제를 1mM 농도가 되게 첨가하여 효소활성을 측정한 결과, Table 3에서 나타난 바와 같이 효소의 활성화제로는 EDTA, cysteine-HCl, DTT (1,4-Dithiothreitol), glutathione, DTNBA (5,5'-Dithionitro benzoic acid) 등이 존재하며, 억제제로는 6-phosphogluconic acid, 2-koeto-gluconic acid, oxaloacetic acid, citrate, glucose-6-phosphate 등으로 나타났다.

Table 3. Effect of activators and inhibitors on D-xylokinase from *Candida sp. L-16*

Activator and inhibitors (1mM)	Relative activity(%)
None	100.0
EDTA	189.1
Cysteine-HCl	163.2
DTT (1,4-Dithiothreitol)	217.4
Glutathione	178.3
DTNBA (5,5'-Dithionitro benzoic acid)	157.3
6-Phosphogluconic acid	60.9
2-Keto-gluconic acid	26.1
Oxaloacetic acid	47.8
Citrate	98.3
Glucose-6-phosphate	21.7

요 약

Candida sp. L-16 균주가 생산하는 D-xylokinase는 배양균체를 초음파 파쇄한 조효소액으로 하여 황산암모늄 염석, DEAE-cellulose, chromatography, Sephadex G-100과 Sephadex G-200 gel filtration 과정으로 정제하여 최종 수율 11.2%로 약 23.2배 정제하였다. 정제 효소의 분자량은 SDS-PAGE로 분석한 결과 분자량은 75,000 dalton으로, Sephadex G-200겔 여과에 의해 150,000 dalton으로 나타나 dimer로 확인되었다. 효소 활성에 미치는 최적 반응 온도는 40℃로 나타났고, 온도안정성은 비교적 불안정하여 30℃ 이상에서는 빠르게 실활되었다. 정제 효소의 최적 반응 pH는 pH 8.0이었고, pH 7.0에서 pH 9.0 사이에서 비교적 효소활성이 높았다. 본 효소는 D-xylose, D-arabinose, D-ribose등에서는 높은 기질특이성을 가지고 있었으나 D-xylose, D-glucose, L-arabinose 등은 기질로서 작용하지 못하였다. 정제 효소의 활성화 에너지값 (Ea)은 25℃ 내지 40℃의 온도 범위에서 4.75Kcal/mol이었다. 효소의 활성화제로는 EDTA, cysteine-HCl, DTT, glutathione 등이 존재하며 억제제로는 6-phosphogluconic acid, 2-koeto-gluconic acid 등으로 나타났다.

참고문헌

1. Wardrop, A.B. (1964) Formation of wood in forest tree. Academic press, New York, pp 87-134
2. Cowling, E.B. and Kirk, T.K. (1976) Properties of cellulose and lignocellulosic materials as substrates for enzymatic conversion process. Biotechnol. Bioeng. Symp., 6, 95-123
3. Chang, C. and Knight, S.G. (1960) Metabolism of D-Xylose by molds. Nature. 188, 79-81

4. Mitsuhashi, S. and Lampen, J.O. (1953) Conversion of D-xylose to D-xylulose in extracts of *Lactobacillus pentosus*. J Biol. Chem., 204, 1011-1018
5. Alexander, N.J. (1985) Temperature sensitivity of the induction of xylose reductase in *Pachysolen tannophilus*. Biotechnol. Bioeng., 27, 1739-1744
6. Smiley, K.L. and Bolen, P.L. (1982) Demonstration of D-xylose reductase and D-Xylitol dehydrogenase in *Pachysolen tannophilus*. Biotechnol. Lett., 4, 607-610
7. Ditzelmuller, G., Kubicek, C.P., Woher, W. and Rohr, M. (1984) Xylose metabolism in *Pachysolen tannophilus* purification and properties of xylose reductase. Can. J. Microbiol., 30, 1330-1336
8. Slininger, P.J., Bolen, P.L., and Kurtzman, C.P. (1987) *Pachysolen tannophilus*: properties and process consideration for ethanol production from D-xylose. Enzyme Microb. Technol., 9, 5-15
9. Lee, J.S. (1993) Ethanol fermentation from D-xylose by *Candida* sp. L-16. A thesis of doctor, Kyungpook National University.
10. Simpson, J. F. (1966) Methods in enzymology, 9, 454-458
11. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680-685
12. Andrews, P. (1964) Estimation of the molecular weights of proteins by Sephadex gel filtration. Biochem. J., 91, 222-233
13. Mortlock, R.P., Fossitt, D.D., Petering, D.H. and Wood, W.A. (1965) Metabolism of pentose and pentitols by *Aerobacter aerogenes*. J. Bacteriol., 89, 120-135
14. Wilson, B.L. and Mortlock, R.P. (1973) Regulation of D-xylose and arabitol catabolism by *Aerobacter aerogenes*. J. Bacteriol., 113, 1403-1411
15. Neuberger, M.S., Hartley, B.S. and Walker, J.E. (1981) Purification and properties of D-ribulokinase and D-xylulokinase from *Klebsiella aerogenes*. Biochem. J., 193, 513-524

(접수 2002년 10월 26일)