

## *Penicillium* sp. KJ810이 생산하는 Erythritol 4-Phosphate Dehydrogenase의 특성

윤나래 · 박상희 · 임재윤\*

충북대학교 자연과학대학 미생물학과

Erythritol 생합성에 중요한 효소인 erythritol 4-phosphate dehydrogenase를 *Penicillium* sp. KJ81로부터 분리·정제하여 효소의 특성을 조사한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다. Erythritol 4-phosphate dehydrogenase의 최적 생산 조건은 30% sucrose, 0.5% yeast extract, 0.5% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 그리고 0.05% MgCl<sub>2</sub> (pH 7.0) 배지에서 1 vvm aeration, 교반속도 200 rpm, 37°C로 *Penicillium* sp. KJ81을 배양한 결과 8일 배양 시 최대의 생산량을 보였다. *Penicillium* sp. KJ81주의 균체 추출액으로부터 ultrafiltration, 조제용 disc gel electrophoresis를 이용하여 erythritol 4-phosphate dehydrogenase를 분리·정제하였다. 최종 수율은 33%이었으며 정제배수는 39.5였다. 정제된 효소의 pI 값은 4.6으로, erythrose 4-phosphate에 특이적으로 반응하였으며, Km값은 1.07 mM이었다. Native-PAGE에서 single band를 보인 효소의 분자량은 약 1,500 kDa이었다. 효소활성의 최적 pH와 온도는 pH 7.0, 30°C였으며, 효소는 pH 4.0~9.0, 그리고 30°C까지 안정하였다. 다양한 금속이온 중 Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>에 의하여 효소의 활성이 저해되었다. 다양한 아미노산 반응 잔기 변형시약 중 iodine과 NBS에 의해 효소의 활성이 저해되는 것을 확인하였다.

**Key words** □ erythritol, erythritol 4-phosphate dehydrogenase

Erythritol은 설탕의 70~80% 감미도를 갖는 4탄당의 당알코올로서 C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>의 화학구조를 갖고 있다(2). 체내로 섭취된 erythritol은 흡수되어 그대로 노중으로 배설되어 에너지 값은 설탕의 1/10 이하로 거의 에너지화 되지 않는 천연감미료이며 충치균에 의하여 이용되지 않는다(8). 설탕과 같이 결정화 할 수 있으며, 설탕에 비해 낮은 흡습성, sorbitol 보다도 높은 흡열작용으로 인하여 청량감이 있는 감미료이다(12). 그리고 체내에서 소화 흡수 되어도 혈당치를 증가시키지 않으므로 당뇨병 환자용 감미료로서 사용이 가능하다. 또한 다른 당 알콜보다 열, 산, 알칼리 등에도 비교적 안정하여 가공 식품 등에 사용하기가 유리하며 설사 등을 일으키는 경우가 적다는 면에서 감미료로서 유망시 되고 있다(12). Erythritol은 자연계에 소량이지만 널리 존재하며 버섯류(2~4%), 이끼류(0.3~5%), 발효식품 등에도 함유되어 있다(6). 포도주, 청주, 간장 등 발효식품에는 erythritol 외에 glycerol, arabitol, mannitol 등의 당알콜도 함유되어 맛에 영향을 준다. 이들 당알콜은 발효과정에서 yeast에 의하여 생성된다. 또한 식물뿐만 아니라 포유동물에서 특히 혈청, 뇨, 정액 등에 소량 함유되어 있다(14). Erythritol을 생성하는 미생물에 대한 보고는 1960년대부터 이루어졌으며, Hajny 등(5)은 glucose를 이용하여 약 41%의 erythritol을 생산하는 *Tolura* 12A를 분리하고 후에 *Moniliella tomentosa* var. *pollinis*로서 동정하였다. 그 후 Corn

Products Company가 실용화를 검토하였으나 erythritol외에 glycerol, ribitol을 부생하는 것 등으로 공업화에 이르지 못하였다. Aoki 등(3)은 별집에서 분리한 osmophilic yeast의 2종, *Trichosporonoides* sp. 150-5와 331-1이 glucose나 sucrose를 기질로 사용하여 주 생산물로 erythritol을 생산함을 보고하였으며, 제일제당 연구소에서도 erythritol 생산 균주로 *Trichosporonoides* sp. CFW001을 개발하였다(1). 이 균주는 40% glucose 생산배지를 사용할 경우 erythritol을 주로 축적하며 약간의 glycerol과 arabitol을 부생한다고 보고되었다.

Erythritol 생합성에 관여하는 효소에 관한 보고에는, Ishizuka 등(7)이 *Aureobasidium* sp.가 glucose로부터 어떤 대사경로로 erythritol을 생성하는지를 연구하여, erythritol이 pentose-phosphate cycle의 중간 대사물인 erythrose 4-phosphate로부터 생성됨을 밝히고 이 마지막 단계를 촉매하는 erythrose reductase를 순수분리하여 그 활성을 조사하였다. 그 결과 pentose phosphate pathway와 phosphoketolase pathway에 의하여 생성된 erythrose 4-phosphate가 erythrose로 변환되고 NADPH를 보효소로 하여 erythrose reductase에 의하여 환원되어 erythritol이 생성되는 것으로 추정하였다. 이처럼 erythritol을 생산하는 균주에 대한 연구는 많이 진행되어 왔지만 erythritol의 생합성에 관여하는 효소에 대한 연구는 아직 미흡한 실정이다. 따라서, 본 연구에서는 erythritol 생산성이 우수한 *Penicillium* sp. KJ81로부터 erythritol 생합성에 중요한 효소의 하나인 erythritol 4-phosphate dehydrogenase를 분리, 정제하여 그 특성을 조사하였다.

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 82-43-261-2303, Fax: 82-43-264-9600  
E-mail: jyylim@chungbuk.ac.kr

## 재료 및 방법

### 균주의 배양 및 시약

본 실험실에서 자연계로부터 erythritol 생산균주로 선발하여 동정된 *Penicillium* sp. KJ81 (9) 균주를 최적 배지로 검토된 배지[30% sucrose, 0.5% yeast extract, 0.5% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05% MgCl<sub>2</sub>, 초기 pH 7.0, 3 L]에서 5 L jar fermenter (한국 발효기)를 이용하여 1 vvm으로 aeration, 200 rpm으로 교반하며 대량 배양하였다. 37°C에서 배양하여 균주의 성장에 따른 erythritol 4-phosphate dehydrogenase의 활성을 조사하였다. 실험에 사용된 시약과 기질, 조효소는 Sigma 사(USA)로부터 구입하여 사용하였으며 HPLC 분석용 시약은 Merck 사(Germany)로부터 구입하였다.

### Erythritol 분석

Sucrose를 기질로 하여 생성된 erythritol의 정량을 위하여 HPLC (Gilson model 712 system) 분석을 하였다. RAININ NH<sub>2</sub> column (4.6×250 mm)을 사용하였고 mobile phase는 acetonitrile:water (75:25)를 이용하였으며 1.0 ml/min의 flow rate로 실험하였다. Detector는 RI Detector를 이용하였다. 표준당은 1% 용액 10 µl를 주입하였다. HPLC 분석을 통하여 erythritol, glycerol, glucose, fructose 그리고 sucrose의 양을 정량하였다.

### 효소반응액의 조제 및 활성 측정

Erythritol 4-phosphate dehydrogenase의 활성을 측정하기 위하여 기질 0.1 mM erythrose 4-phosphate, 조효소 0.1 mM NADPH, 완충용액 25 mM HEPES (pH 7.1)에 3 mM MgCl<sub>2</sub>를 첨가하여 반응시켰다. 효소의 활성은 효소 반응액에 효소를 넣어 30°C에서 10분 반응 후 340 nm에서 optical density를 UV-Vis spectrophotometer (Beckman, USA)로 측정하였다. 효소의 1 unit는 1분당 1 µmol의 NADP<sup>+</sup>를 생산하는 효소의 양으로 정하였다.

### 단백질의 정량

Lowry 등(10)의 방법으로 측정하였고, 표준 단백질로는 bovine serum albumin (BSA, Sigma kit No. P5656)을 사용하였다.

### 효소의 정제 방법

#### 1) 세포 분쇄

균체는 10 mM phosphate buffer (pH 7.0)로 3회 세척하여 균체 100 g을 동일 buffer로 현탁하였다. 현탁액을 초음파 파쇄기 (Fisher M-300, USA)로 30초 분쇄 후 60초 방치하기를 20회 반복하면서 분쇄하였다. 분쇄 후 4°C, 12,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 상등액을 조효소원으로 사용하였다.

#### 2) Preparative gel electrophoresis

Model 491 Prep Cell (Bio-Rad, USA)을 사용하여 Prep Cell 사용설명서에 따라 discontinuous buffer system을 이용한 preparative

native-PAGE를 실시하였다. Gel은 Prep Cell의 28 mm ID gel tube에 높이 8 cm, 8% acrylamide separating gel (pH 8.8)과 1.5 cm 높이의 4% acrylamide stacking gel (pH 6.8)을 만들어 이용하였다. Running buffer로는 Tris-glycine (25 mM~192 mM) buffer (pH 8.3)를 사용하였고, elution buffer로는 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)을 사용하였다. 전기영동은 12 W에서 10~13시간 실시하였으며, cooling water bath를 이용하여 15°C 이하로 유지시켰다. 분획은 tracking dye (0.01% bromophenol blue)가 elution 된 후부터 Bio-Rad Econo System에 연결하여 1 ml/min의 유속으로 2 ml씩 분획하였다. 단백질의 농도는 280 nm에서 흡광도로 측정하였다. 효소활성을 나타내는 분획을 centriprep (10,000 M.W. cut off)으로 농축하였다.

### Ultrafiltration

효소 용액은 Amicon PM 10 Membrane을 사용하여 Ultrafiltrator (TCF 10/TCF 10A)로 농축되었다.

### 전기영동

정제된 효소의 순도확인 및 정제를 위하여 polyacrylamide gel 전기영동을 실시하였다. 전기영동은 Davis (4)의 방법을 기초로 하여 실시하였으며 gel의 조성은 8% separating gel, 5% stacking gel 농도로 사용하였다. 전기영동은 running buffer로 Tris-glycine buffer (100 mM, pH 8.3)를 사용하여 4°C에서 gel cm당 4 mA의 전류를 2시간 동안 통하게 하여 실시하였다. 전기영동이 끝난 후 gel은 Coomassie brilliant blue G-250으로 염색하고 methanol-acetic acid-H<sub>2</sub>O (3:1:6, v/v)의 용액으로 탈색하였다.

### pH 및 온도가 효소활성에 미치는 영향

pH 2.0~3.0과 7.5~10.5의 구간은 Clark and Lubs 완충용액 (0.01 M), pH 3.0~7.5는 citrate phosphate 완충용액(0.01 M), pH 10.5~11.5의 구간은 sodium phosphate 완충용액(0.01 M)을 사용하여 효소 반응액을 각각의 pH로 맞추어 준 후 pH에 의한 영향을 조사하였다. pH에 대한 효소의 안정성 실험은 각각의 pH에서 48시간 동안 4°C에 방치한 후 잔존 효소활성을 조사하였다. 온도에 대한 영향은 10°C~70°C 구간에서 효소반응을 수행하여 최적 반응 온도를 조사하였고, 열에 대한 안정성의 검사는 4°C~70°C에서 2시간 열처리한 후 30°C에서 잔존 효소 활성을 측정하였다.

### 분자량 측정

순수 분리된 효소의 분자량은 Native-PAGE와 SDS-PAGE를 실시하여 측정하였다. Native-PAGE는 8% separating gel (두께 0.75 mm)과 5% stacking gel을 사용하였으며, 4°C에서 60 mA를 일정하게 하여 약 50분 정도 전기영동하였다(Mini-protean II, Bio-Rad). 전기영동 후 Coomassie brilliant blue R-250으로 염색한 후 destaining solution (50% methanol, 10% acetic acid)으로 탈색하여 단백질의 band를 확인하였다. 단백질의 분자량은 표준 단백질로 α-lactalbumin (MW 14,200), bovine serum albumin

(MW 66,000 & 132,000), urease (MW 272,000 & 545,000) (MW-ND-500 kit, Sigma)을 이용하여 측정하였다.

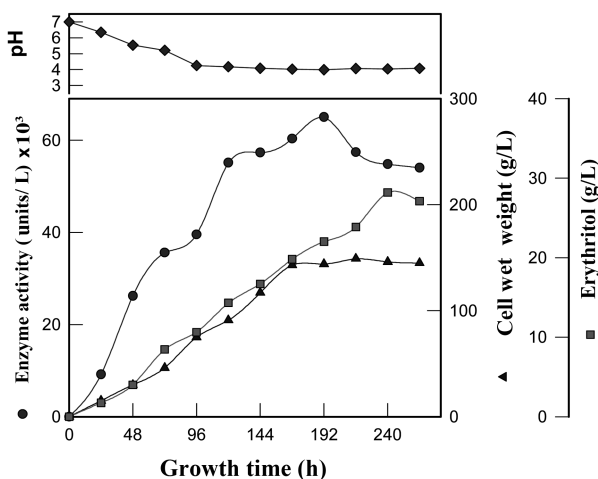
SDS-PAGE는 12% separating gel (두께 0.75 mm)과 5% stacking gel을 사용하였으며, native-PAGE와 같은 조건으로 전기영동 시켰다. 염색은 Coomassie brilliant blue R-250으로 염색하였으며, 표준단백질로는 lysozyme (MW 14,400), soybean trypsin inhibitor (MW 21,500), carbonic anhydrase (MW 31,000), aldolase (MW 40,000), ovalbumin (MW 42,700), glutamate dehydrogenase (MW 55,000), bovine serum albumin (MW 66,200), phosphorylase B (MW 97,000) (Mid-range protein MW markers, Promega, USA)을 사용하였다.

### 등전점 측정

효소의 등전점은 2% (w/v) carrier ampholyte (pH 3.0~10.0, Bio-Rad)를 이용하여 측정하였다. 8% polyacrylamide gel에 정제된 효소를 100 V로 15분간 전기영동 한 후 다시 200 V로 15분 전기영동하고, 최종 450 V로 60분간 전기영동 한 후 3.5% perchloric acid를 포함한 0.03% Coomassie Brilliant Blue G-250으로 염색하였다.

### 효소에 대한 금속이온의 영향

효소활성에 영향을 줄 수 있는 금속이온( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ , 그리고  $\text{Fe}^{3+}$ )을 효소 반응액에 최종농도 0.1 mM과 1 mM로 첨가하여 효소활성을 조사하였다.



**Fig. 1.** Time course of *Penicillium* sp. KJ-81 cell growth, erythritol 4-phosphate dehydrogenase activity and erythritol production at 37°C. *Penicillium* sp. KJ-81 was cultured in medium containing 30% sucrose, 0.5% yeast extract, 0.5%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.05%  $\text{MgCl}_2$ , 0.1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Cultivation was carried out at 37°C and initial at pH 7.0 in a 5 L jar fermenter. It was aerated at 1 v/v per min and agitated at 200 rpm. One unit of activity was defined as the amount of enzyme which produced 1 mmol of  $\text{NADP}^+$  per minute.

### 화학변형시약의 영향

효소 활성부위에 관여하는 아미노산 잔기를 알아보기 위하여 amino acid 수식시약인 iodine, glyoxal, *N*-bromosuccinimide (NBS), *p*-diazobenzene sulfonic acid,  $\beta$ -naphthoquinone-4-sulfonic acid (NQS), 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS), monoiodoacetic acid, *N*-ethylmaleimide, *p*-chloromercuri-benzoic acid 그리고 5,5'-dithiobis-nitrobenzoic acid로 효소를 변형시켜 효소 활성을 측정하였다. 화학 변형시약의 처리는 효소에 각각의 반응시약을 1.0 mM과 5.0 mM로 처리하여 4°C에서 30분 동안 incubation한 후 남아 있는 효소의 활성을 standard method에 의해 측정하였다.

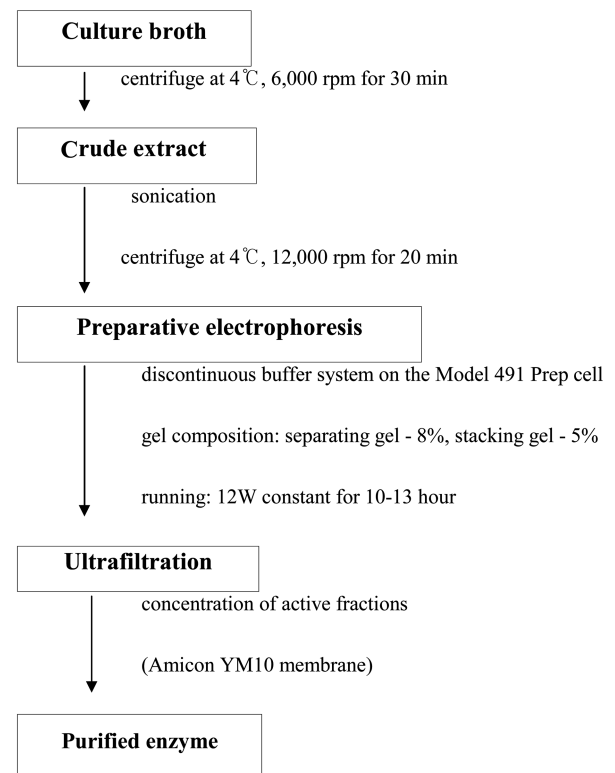
### 기질 특이성 조사

여러 기질에 대한 효소활성을 조사하였다. 기질로는 D-erythrose 4-phosphate, D-erythrose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, trehalose, D-xylose, D-xylulose, D-glyceraldehyde, D-galactose를 효소반응액에 0.1 mM이 되도록 사용하여 효소활성을 측정하였다.

## 결 과

### 효소의 생산

5 L jar fermentor에서 배지 3 L에 *Penicillium* sp. KJ81 균주를



**Fig. 2.** Purification procedures of erythritol 4-phosphate dehydrogenase from *Penicillium* sp. KJ81.

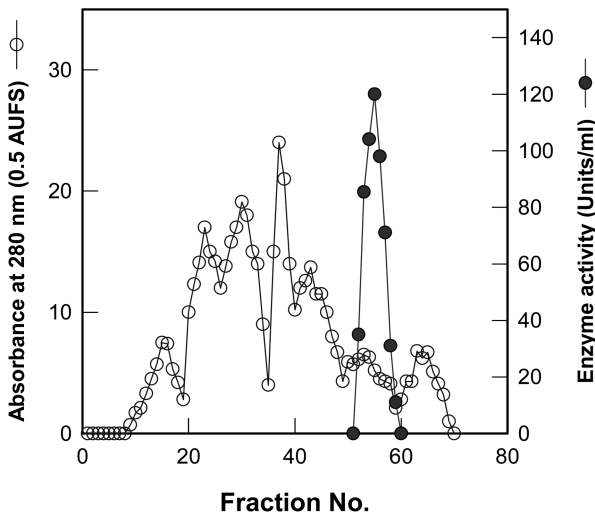
집중하고 37°C에서 배양하면서 erythritol의 생성량과 erythritol생합성 효소의 하나인 erythritol 4-phosphate dehydrogenase의 활성을 시간 별로 측정하였다. Fig. 1은 37°C에서 배양한 결과를 보여준다. 배양액의 초기 pH는 7.0이었으나 배양이 진행됨에 따라 산성이 되었으며, erythritol 4-phosphate dehydrogenase의 생산량은 계속 증가하다가 8일째에서 최대 생산량을 보였다. 8일째 효소의 최고 효소활성은  $63 \times 10^3$  units/L이었다.

**효소의 정제**

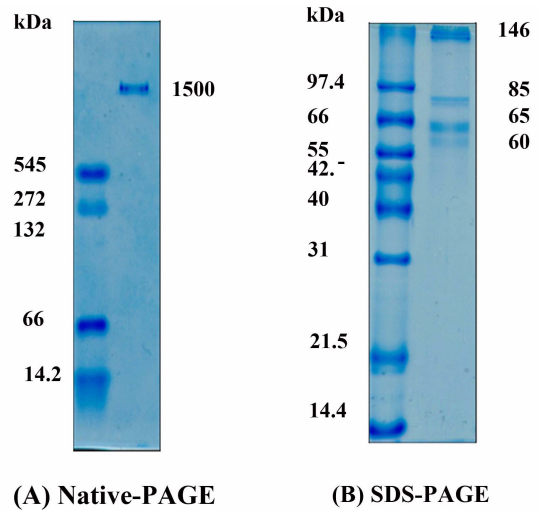
Fig. 2와 같은 과정을 통하여 균체로부터 효소를 정제하였다. Model 491 prep cell (Bio-Rad)을 이용하여 preparative disc gel electrophoresis를 실행하였다(Fig. 3). 효소의 활성이 있는 분획을 모아 ultrafiltration (Amicon YM10)으로 농축한 후에 Native-PAGE를 실행하여 단일 band를 확인하였다. 최종 수율은 33%이었으며, 정제배수는 39.5이었다(Table 1).

**분자량**

Erythritol 4-phosphate dehydrogenase는 native PAGE를 통하여 약 1,500 kDa의 단일 band를 확인할 수 있었으며(Fig. 4A),

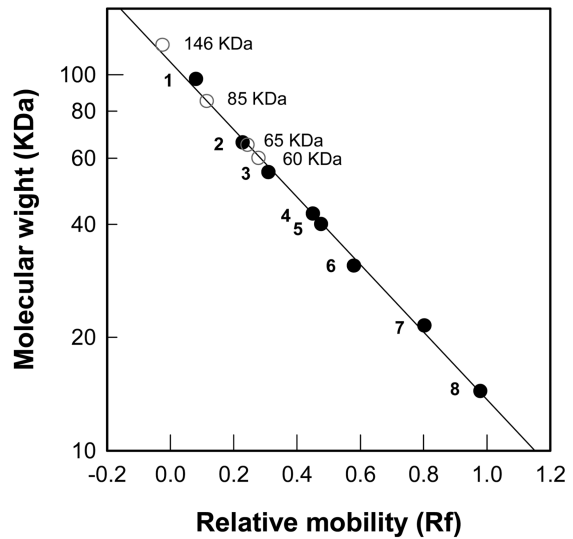


**Fig. 3.** Elution profile of the erythritol 4-phosphate dehydrogenase by preparative electrophoresis. Native PAGE used discontinuous buffer system; 8% acrylamide separating gel (pH 8.8), 5% acrylamide stacking gel (pH 6.8). Tris-glycine (25 mM~192 mM) buffer (pH 8.3) was used as running buffer and 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) was used as elution buffer. The flow rate was 1 ml/min and fraction size was 2 ml/tube. Concentration of protein in each fraction was monitored at 280 nm with UV detector on Econo-system.



**(A) Native-PAGE** (8% Separating 5% Stacking) **(B) SDS-PAGE** (12% Separating 5% Stacking)

**Fig. 4.** Native PAGE (A) and SDS-PAGE (B) of the erythritol 4-phosphate dehydrogenase in *Penicillium* sp. KJ81. Molecular weights of protein markers in each lane 1 are indicated to the left.



**Fig. 5.** Molecular weight determination of erythritol 4-phosphate dehydrogenase by SDS-PAGE. Molecular weight markers; 1, phosphorylase (MW 97,400); 2, bovine serum albumin (MW 66,000); 3, glutamate dehydrogenase (MW 55,000); 4, ovalbumin (MW 42,700); 5, aldolase (MW 40,000); 6, carbonic anhydrase (MW 31,000); 7, soybean trypsin inhibitor (MW 21,500); 8, lysozyme (MW 14,400).

**Table 1.** Purification of erythritol 4-phosphate dehydrogenase from *Penicillium* sp. KJ81

Purification step	Total activity (unit)	Total protein (mg)	Specific activity (unit/mg)	Recovery yield (%)	Purification fold
Crude extract	5470.0	81.5	67.1	100.0	1.0
Preparative electrophoresis	3086.4	1.2	2572.0	56.4	38.3
Ultrafiltration	1800.8	0.7	2648.3	33.0	39.5

SDS-PAGE를 실시한 결과 약 146 kDa, 85 kDa, 65 kDa, 60 kDa으로 분리되는 band를 확인할 수 있었다(Fig. 4B and 5). 이로부터 본 효소는 tetramer로 이루어진 단백질로 추측된다.

**효소학적 특성**

**1) Km값의 결정**

Lineweaver-Burk plot에 의하여 erythrose 4-phosphate에 대한 Km값을 계산해 본 결과 1.07 mM로 나타났다(Fig. 6).

**2) 등전점**

Ampholyte를 이용하여 효소의 pI를 측정된 결과 Fig. 7, 8에서와 같이 4.6으로 나타났다.

**3) 최적 pH 및 pH에 대한 안정성**

효소 활성의 최적 pH를 조사한 결과 pH 7.0에서 가장 높은

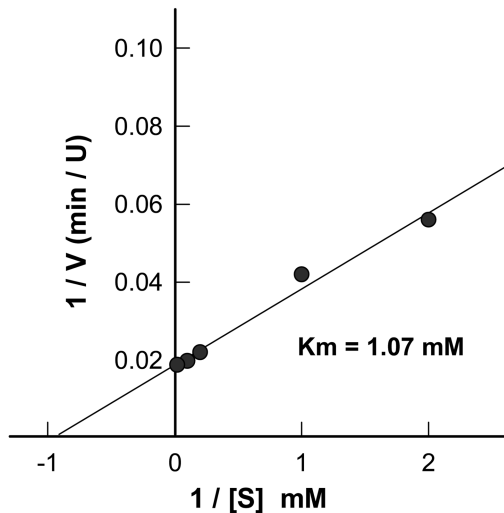


Fig. 6. Lineweaver-Burk plot of erythritol 4-phosphate dehydrogenase.

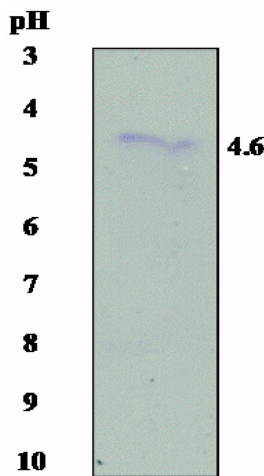


Fig. 7. Isoelectric focusing.

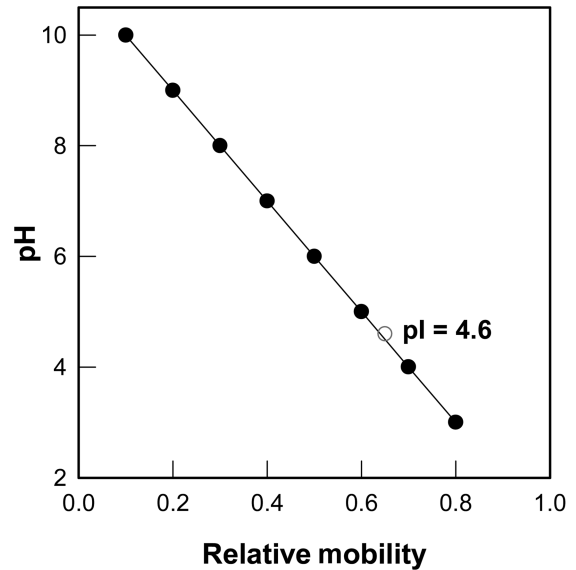


Fig. 8. Determination of pI value of erythritol 4-phosphate dehydrogenase by isoelectric focusing.

활성을 나타냈다. 효소의 pH에 대한 안정성을 살펴본 결과 비교적 넓은 pH 범위(pH 4.0~9.0)에서 안정하였다.

**4) 최적 온도 및 온도에 대한 영향**

효소의 활성은 10°C부터 30°C에 이르기까지 증가하였으나, 40°C 이상에서는 급격히 감소하는 것을 알 수 있었다. 효소 활성의 최적 온도는 30°C였다. 효소를 4°C부터 70°C까지 2시간 동안 처리한 후 효소의 활성을 측정해 본 결과 40°C 이상에서는 효소의 활성이 감소하여 70°C에서는 활성을 완전히 상실하였다.

온도에 대한 안정성을 조사하기 위하여 -20°C, -10°C, 4°C, 그리고 실온에 효소를 각각 방치하며 24시간마다 효소의 활성을 측정된 결과 -20°C와 -10°C에서는 효소활성의 변화가 없었고 4°C에서는 48시간까지는 영향이 없었으나 약 96시간 방치 시 효소의 활성이 감소하여 약 20%의 활성만을 갖는 것을 관찰할 수 있었으며, 상온에서는 약 48시간 방치 시 25% 정도로 효소의 활성이 감소되었다.

**5) 금속이온의 영향**

Table 2에서 보는 바와 같이 효소반응액에 금속이온 0.1 mM과 1.0 mM로 처리하여 효소활성을 조사한 결과 Cu<sup>2+</sup>와 Zn<sup>2+</sup>에 의해 활성이 억제되었다.

**6) 화학변형시약의 영향**

여러 가지의 화학변형시약을 1.0 mM과 5.0 mM로 처리하여 효소활성을 조사하였다. Table 3에서와 같이 erythritol 4-phosphate dehydrogenase는 tyrosine 변형시약인 iodine과 tryptophan 변형시약인 N-bromosuccinimide에 의해 완전히 불활성화 되었다. 그러나 arginine 변형시약인 glyoxal과 histidine 변형시약인 p-diazobenzene sulfonic acid, lysine 변형시약인 β-naphthoquinone-4-sulfonic acid

**Table 2.** Effect of metal ions on the erythritol 4-phosphate dehydrogenase activity

Metal ions <sup>a</sup>	Relative activity (%)	
	0.1 mM	1.0 mM
None	100	100
Na <sup>+</sup>	93	91
Ag <sup>+</sup>	94	89
Li <sup>+</sup>	96	91
Co <sup>2+</sup>	94	71
Cu <sup>2+</sup>	39	0
Mn <sup>2+</sup>	84	78
Mg <sup>2+</sup>	117	102
Zn <sup>2+</sup>	17	0
Ca <sup>2+</sup>	94	88
Ni <sup>2+</sup>	89	82
Fe <sup>2+</sup>	94	91
Fe <sup>3+</sup>	97	92

<sup>a</sup> The effect of various reagents on enzyme activity was determined by the standard assay method.

**Table 3.** Effect of group-specific reagents on the erythritol 4-phosphate dehydrogenase activity

Reagents <sup>a</sup>	Relative activity (%)	
	1.0 mM	5.0 mM
None	100	100
Iodine	10	0
Glyoxal	105	100
<i>N</i> -Bromosuccinimide	14	0
<i>p</i> -Diazobenzene sulfonic acid	95	90
$\beta$ -Naphthoquinone-4-sulfonic acid	113	102
2,4,6-Trinitrobenzene sulfonic acid	93	87
Monoiodoacetic acid	91	89
<i>N</i> -Ethylmaleimide	95	82
<i>p</i> -Chloromercuri-benzoic acid	94	87
5,5'-Dithiobis-nitrobenzoic acid	96	98

<sup>a</sup> Modified reactions were carried out at 4°C in 25 mM HEPES buffer, pH 7.1. Modified reactions were initiated by adding reagents to the enzyme solution. Aliquots of reaction mixture were taken after 30 min incubation and subjected to activity assay.

(NQS), 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS), 그리고 sulfhydryl 변형시약(monoiodoacetic acid, *N*-ethylmaleimide, *p*-chloromercuri-benzoic acid, 그리고 5,5'-dithiobis-nitrobenzoic acid)에 의해서는 별 영향을 보이지 않았다. 따라서 tyrosine, tryptophan 잔기가 효소활성에 관여할 것으로 추정된다.

**Table 4.** Substrate specificity of the purified erythritol 4-phosphate dehydrogenase

Substrate <sup>a</sup>	Relative activity (%)
D-Erythrose 4-phosphate	100
D-Erythrose	0.0
D-Glucose	0.0
D-Fructose	0.0
D-Mannose	0.0
Trehalose	0.0
D-Xylose	9.2
D-Xylulose	0.0
D-Glyceraldehyde	15.0
D-Galactose	0.0

<sup>a</sup> The substrate specificity of erythritol 4-phosphate dehydrogenase was determined by adding various substrate to the standard assay mixture. The concentration of all substrates were 0.1 mM.

### 7) 기질 특이성

여러 다른 기질에 대한 효소활성을 알아본 결과 Table 4에서와 같이 erythritol 4-phosphate dehydrogenase는 D-erythrose 4-phosphate에만 특이적으로 반응하였으며, D-xylose와 D-glyceraldehyde에는 각각 9.2%와 15%로 약간의 반응을 보였다.

## 고찰

본 실험실에서 erythritol 생산성이 우수한 균주로 분리·동정한 *Penicillium* sp. KJ81 (9)은 sucrose를 기질로 하여 약 11.7 g/L의 수율로 erythritol을 생산한다. 본 실험에서는 *Penicillium* sp. KJ81이 생산하는 erythritol 4-phosphate dehydrogenase를 분리·정제하여 효소적 특성을 살펴보았다.

균주의 성장과 erythritol 4-phosphate dehydrogenase의 생산 최적 조건을 검토하기 위하여 5 L jar fermentor에서 *Penicillium* sp. KJ81 배양액 3 L를 30°C와 37°C에서 배양하여 배양시간에 따른 효소 생산 및 균의 성장 특징들을 조사하였다. Erythritol 4-phosphate dehydrogenase는 37°C 배양 시에, 8일째에서 최대 생산량을 보였다. Erythritol 생산량도 원래 분리·동정한 문헌 값보다 훨씬 향상된(약 25.5 g/L) 생산성을 보였으며, flask 배양보다 Jar fermentor를 이용하여 배양조건을 향상시킨 결과이다.

효소정제의 초기단계로 ammonium sulfate, ethanol, acetone으로 침전실험을 실시하여 보았지만 60% 이상의 농도에서 침전되었기 때문에, 부피가 너무 증가하여 실험하기에 비효율적이었으며, 또한 효소활성이 거의 실활되어 염이나 유기용매에 의한 침전방법은 부적당한 것으로 생각되었다. 이처럼 효소의 침전이 어려운 것은 이 효소가 비교적 높은 수용성을 갖고 있기 때문이라고 생각된다. 또한 ion exchange chromatography 방법에 의해 정제를 시도하였을 때 각 pH별로 DEAE와 CM을 전처리하여 실험 시 흡착은 관찰되었으나 분리가 용이하지 않았다. 이는 이 효소가 4°C에서도 불안정하여 분리하는 동안 대부분 실활되는 것

으로 생각된다. 따라서 효소를 신속히 분리하기 위하여 Model 491 prep cell을 이용하여 preparative disc gel electrophoresis를 실행한 후, 효소의 활성이 있는 분획을 모아 ultrafiltration (Amicon YM10)으로 농축하였다. 이를 Native-PAGE를 실행하여 분석한 결과 거의 단일 band인 것을 확인할 수 있었다. 부분 정제된 효소는 erythrose 4-phosphate에 기질특이성을 보였으며, erythrose 4-phosphate에 대한 Km값은 1.07 mM이었다. 또한 이 효소를 pH 3.0~10.0의 Ampholyte를 이용하여 isoelectric focusing해 본 결과 이 효소의 isoelectric point는 약 4.6이었다.

이 효소는 pH 7.0에서 가장 높은 활성을 나타냈으며 비교적 넓은 pH 범위(pH 4.0~9.0)에서 안정하였다. 효소의 온도에 대한 영향은 10°C부터 30°C에 이르기까지 증가하였으나, 40°C 이상에서는 급격히 감소하는 것을 관찰할 수 있었고, 이 효소의 활성 최적 온도는 30°C였다. 그러나 이 효소는 4°C부터 70°C까지 2시간 동안 처리한 후 효소의 활성을 검토하였을 때, 효소 반응이 가장 빠르게 일어나는 30°C에서는 영향이 없으나 40°C 이상에서는 효소의 활성이 급격히 감소하여 70°C에서는 활성을 완전히 상실하는 것을 관찰할 수 있었다. 온도에 대한 안정성이 낮은 것으로 보여져 이 효소를 다시 -20°C, -10°C, 4°C, 그리고 실온에 효소를 각각 방치하며 24시간마다 효소의 활성을 측정하였다. -20°C와 -10°C에서는 효소활성의 변화가 없었으며, 4°C에서는 48시간까지는 영향이 없었으나 약 96시간 방치 시 효소의 활성이 급격히 감소하여 약 20%의 활성만을 갖는 것을 관찰할 수 있었으며, 상온에서는 약 48시간 방치 시 25%정도로 효소의 활성이 감소되는 것을 볼 수 있었다. 이것은 Ishizuka 등(7)에 의해 보고된 erythrose reductase가 45°C, pH 6.5에서 최적 활성을 보이며 pH 6.0~8.0 그리고 40°C 아래에서 안정하다는 것과 비교할 때, 이 효소가 pH에는 비교적 안정하나 온도에 대해서는 상당히 민감함을 알 수 있었다. Fig. 1의 배양경과에서 37°C에서 장기간 배양해도 활성이 높게 유지되는 것으로 미루어 이 효소는 세포 내에서는 비교적 40°C 온도에서도 안정하지만 정제된 상태에서는 온도에 불안정한 것으로 생각된다.

효소활성에 금속 이온이 관여하는지 알아보기 위하여 효소반응액에 금속이온을 처리하여 효소활성을 조사한 결과 0.1 mM의  $Cu^{2+}$ 와  $Zn^{2+}$ 에 의해 활성이 저해 되는 것을 확인할 수 있었으며, 1.0 mM로 처리시엔  $Cu^{2+}$ 와  $Zn^{2+}$ 에 의해 활성이 완전히 억제되는 것을 관찰하였다. 또한  $Mg^{2+}$ 을 첨가 시엔 효소의 활성이 증가됨을 보였는데 이는 효소가 기질인 erythrose 4-phosphate와 반응할 때  $Mg^{2+}$ 을 필요로 하기 때문인 것으로 생각된다.

Erythritol 4-phosphate dehydrogenase에 여러 가지 화학변형시약을 처리한 결과 glyoxal, *p*-diazobenzene sulfonic acid,  $\beta$ -naphthoquinone-4-sulfonic acid (NQS), 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS), monoiodoacetic acid, N-ethylmaleimide, *p*-chloromercuri-benzoic acid (PCMB), 그리고 5,5'-dithiobisnitrobenzoic acid (DTNB)는 효소활성에 영향을 보이지 않았다. 따라서 NQS와 TNBS가 영향을 미치는 lysine잔기, glyoxal의 arginine 잔기, N-ethylmaleimide와 PCMB가 영향을 주는 cysteine잔기, DTNB에 의한 histidine잔기, 그리고 sulfhydryl기 등은 효소의 활

성증상에 관여하지 않음을 알 수 있다. Iodine은 단백질의 tyrosine, cysteine, histidine, tryptophan잔기와 결합하여 효소활성을 저해하는데 특히 tyrosine를 특이적으로 변형시키는 reagent로 알려져 있다. 본 효소는 iodine에 의해 효소활성이 실행되는 것으로 보아 활성부위에 tyrosine이 관여하고 있다고 추정된다. 또한 tryptophan에 특이적 변형시약인 *N*-bromosuccinimide에 의해서도 완전히 불활성화되는 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 효소의 활성부위에 tryptophan과 tyrosine이 관여되어 있으리라 추정된다.

## 감사의 말

이 논문은 2007학년도 충북대학교 학술연구 지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

## 참고문헌

1. 전영중, 서승현. 1995. 미생물발효에 의한 에리스리톨 생산 공정의 개발. *생물화공* 9, 24-29.
2. Anon. 1990. New horizons in low calorie bulk sweeteners. *Food Trade Review* 64, 75.
3. Aoki, M.A.Y., G.M. Pastore, and Y.K. Park. 1993. Microbial transformation of sucrose and glucose to erythritol. *Biotechnol. Lett.* 15, 383-388.
4. Davis, B.J. 1964. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121, 404-427.
5. Hajny, G.J., J.H. Smith, and J.C. Garver. 1964. Erythritol production by a yeastlike fungus. *Appl. Microbiol.* 12, 240-246.
6. Huneck, S. and G. Trotet. 1967. Lichen constituents, XXXVII, Component of some species of *Rocella*, *Z. Naturforsch* 22B, 671-673.
7. Ishizuka, H., K. Tokuoaka, T. Sasaki, and H. Taniguchi. 1992. Purification and some properties of an erythrose reductase from an *Aureobasidium* sp. mutant. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56, 941-945.
8. Kawanabe, J., M. Hirasawa, T. Takeuchi, T. Oda, and T. Ikeda. 1992. Noncariogenicity of erythritol as a substrate. *Caries Res.* 26, 358-362.
9. Lee, K.J., Y.R. Ju, K.U. Lee, K.S. Oh, Y.J. Lee, S.H. Park, and J.Y. Lim. 1997. Isolation of erythritol producing microorganism from nature. *Kor. J. Microbiol.* 33, 38-42.
10. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
11. Rapaille, A.L.J. and J.A.M. Peremans. 1992. Sweetening composition. *European Patent Application*. Application No. 92303474.8.
12. Roper, H. and J. Goossens. 1993. Erythritol, a new raw material for food and non-food applications. *Starch/Starke.* 45, 400-405.
13. Sasaki, T. 1989. Production and properties of erythritol obtained by *Aureobasidium* fermentation. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* 63, 1130-1132.
14. Størset, P., O. Stokke, and E. Jellum. 1978. Monosaccharides and monosaccharide derivatives in human seminal plasma. *J. Chromatogr.* 145, 351-357.

(Received May 29, 2009/Accepted June 16, 2009)

---

**ABSTRACT : Characterization of Erythritol 4-Phosphate Dehydrogenase from *Penicillium* sp. KJ81**  
**Na-Rae Yun, Sang-Hee Park, and Jai-Yun Lim\*** (Department of Microbiology, Chungbuk  
National University, Cheongju 361-763, Republic of Korea)

In this study, the characterization of purified erythritol 4-phosphate dehydrogenase, key enzyme of erythritol biosynthesis, produced by *Penicillium* sp. KJ81 was investigated. Optimum production conditions of erythritol 4-phosphate dehydrogenase was 1 vvm aeration, 200 rpm agitation, at 37°C for 8 days in the medium containing 30% sucrose, 0.5% yeast extract, 0.5% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 0.05% MgCl<sub>2</sub>. Erythritol 4-phosphate dehydrogenase was purified through ultrafiltration and preparative gel electrophoresis from cell extract of *Penicillium* sp. KJ81. This enzyme was especially active on erythrose 4-phosphate with 1.07 mM of Km value. It gave a single band on native polyacrylamide gel electrophoresis and an isoelectric point of 4.6. The enzyme had an optimal activity at pH 7.0 and 30°C. It was stable between pH 4.0 and 9.0, and also below 30°C. The enzyme activity was completely inhibited by 1mM Cu<sup>2+</sup> and 1 mM Zn<sup>2+</sup>, but was not significantly affected by other cations tested. This enzyme was inactivated by treatment of tyrosine specific reagent, iodine and tryptophan specific reagent, *N*-bromosuccinimide. The substrate of the enzyme, erythrose 4-phosphate showed protective effect on the inactivation of the enzyme by both reagents. These results suggest that tryptophan and tyrosine residues are probably located at or near active site of the enzyme.