

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 특허공보(B1)

(51) Int. Cl.⁴
C12N 9/04
C12P 7/60

(45) 공고일자 1988년 10월 04일
(11) 공고번호 특 1988-0001944

(21) 출원번호	특 1984-0007209	(65) 공개번호	특 1985-0003731
(22) 출원일자	1984년 11월 16일	(43) 공개일자	1985년 06월 26일
(30) 우선권주장	58-217176 1983년 11월 17일 일본(JP)		
(71) 출원인	시오노기 세이야쿠 가부시끼가이샤 요시또시 가즈오 일본국 오오사카후 오오사카시 히가시구 도쇼오마찌 3쵸메 12반찌		

(72) 발명자 소노야마 다카야스
일본국 오오사카후 사카이시 다게시로 다이 2쵸메 13방
가게야마 분지
일본국 오오사카후 아바라끼시 야마테다이 3쵸메 12방
고바야시 고우베
일본국 오오사카후 다카쓰끼시 히요시다이 6반쵸 31방
다니모또 마사히로
일본국 효오고켄 고오베시 히가시나다구 모또야마미나미 마찌 3쵸메
10-30-909
(74) 대리인 이준구, 백락신

심사관 : 김성완 (책자공보 제1457호)

(54) 2,5-디케토-D-글루콘산 리덕타제의 제조방법

요약

내용 없음.

명세서

[발명의 명칭]

2,5-디케토-D-글루콘산 리덕타제의 제조방법

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 2,5-디케토-D-글루콘산 리덕타제 (이후 25DKG-라제로 약칭한다)의 제조방법에 관한 것이다.

상기 효소는 환원된 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드 포스페이트(이후 NADPH로 약칭한다) 존재 하에 2,5-디케토-D-글루콘산 (이후 25DKG 약칭한다)을 비타민 C의 전구체인 2-케토-L-글루콘산 (이후 2KLG로 약칭한다) 으로 환원시키는데 촉매작용을 한다. 또한 5-케토-D-프럭토오스(이후 5KF로 약칭한다)를 L-소르보스로 환원시키는데 촉매작용을 한다.

코리네박테리움 속에 속하는 미생물로 부터 수득된 세포 추출물을 사용하여 12DKG로 부터 2KLG를 생산하는 것은 유럽특허공보 0088408 및 영국특허공보 2116549에 기재되어 있다. 그러나, 상기의 두 효소작용을 다 나타내고 두 반응을 수행하는데 보통 NADPH를 필요로 하는 정제된 효소에 대해서는 지금까지 아무 언급이 없었다.

그러므로 본 발명의 목적은 신규 25DKG-라제의 제조방법을 제공하는 것이다.

본 발명에 따라 하기의 물리 화학적 특성을 갖는 25DKG-라제가 공급된다.

(a) 효소작용 : 보조효소인 NADPH 존재하에 (i) 25DKG 또는 그의 염을 2KLG 또는 상응하는 그의 염으로 환원 및 (ii) 5KF를 L-소르보스로 환원하는데 촉매작용을 한다.

(b) 기질에 대한 특이성 : 25DKG 와 5KF에 대한 특이성을 나타낸다.

(c) 최적 PH : PH 6~7

(d) PH안정성 : PH 5~7

(e) 분자량 : 29,000±2,000

(f) 등전점 : PH 4.4±0.3

또한 본 발명에 따라, 코리네 박테리움 속에 속하는 미생물의 분쇄된 세포로부터 효소를 분리시키는

신규 효소의 제조방법이 제공된다.

다수의 2KLG-생성미생물에 의해 수행되는 25DKG를 환원하는 효소를 연구하는 과정에서, 본 발명자들은 코리네 박테리움 속에 속하는 2KLG-생성 균주로부터 수득된 25DKG 라제가 NADPH 존재하에 (i) 25DKG를 2DKG로 환원 및 (ii) 5KF를 L-소르보즈로 환원시키는 촉매작용을 갖는 것을 발견하였다. 그리고 그들은 공지되지 않은 작용(종래에는 발견되지 않는 상술한 두 작용)을 갖는 신규 효소를 분리 정제하는데 성공하여 본 발명을 완성하게 되었다.

본 발명의 효소는 25DKG 및 5KF에 효소작용을 나타내지만, 이들 두 기질에 공통된 5위치에 케토기가 존재하는 5-케토-D-글루콘산을 환원시키지는 않는다. 또한 말단 알콜성 히드록시기에 인접한 케토기를 갖는 D-프럭토오즈 및 L-소르보즈와 같은 케토오즈 또는 2KLG 또는 2-케토-D-글루콘산에 대해서는 환원작용을 나타내지 않는다.

이 효소는 코리네 박테리움 속에 속하는 2KLG 생성 균주의 세포로부터 추출된 세포내 효소이다. 본 발명의 방법에 유용한 미생물로서 코리네 박테리움 속에 속하는 2KLG 생성 균주 중의 하나인 코리네 박테리움 sp.NO.20A-77 (ATCC 31090, FERM-P 2770, KAIST 830526-08611) 및 이들 균주로부터 유도된 변이주 (예를들면 5-케토-D-글루콘산 결핍 변이주(FERM-BP 108, KAIST 830526-08811)가 예시될 수 있다. 또한 코리네 박테리움 sp.No.T-13 (ATCC 31089, KAIST 830526-08711), 코리네 박테리움 sp. No. K-106 (ATCC 31088, KAIST 830526-08511) 및 이들 균주의 변이주가 효소원으로 사용될 수 있다.

이들 미생물은 FERM-Ps 또는 FERM-BPs로 일본 야다베 발효연구소에 및/또는 ATCCs로 미국 메릴랜드 아메리칸타입 컬처 콜렉션에 기탁되어 있으며, 이들 샘플은 부타페스트 협약하에 이들 기탁기관으로부터 이용할 수 있다. 또한 이들 미생물은 한국 과학기술원(KAIST)에도 기탁되어 있다.

이들 균주 NO. 20A-77, T-13 및 K-106의 상세한 분류적 설명은 예를들면 미국특허공보 3,959,076에 기재되어 있으며, 20A-77 균주로부터 FERM-BP108 균주로 변이 유도시키는 방법은 예를들면 유럽특허공보 0088,408에 상세히 기재되어 있다.

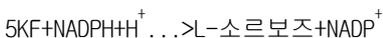
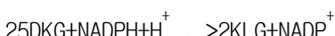
본 발명의 25DKG-라제를 생산하는 2KLG 생성균주를 성장시키기 위해 사용되는 영양 배지의 조성은 특별히 제한되지 않는다. 배지는 바람직하게는 탄소원, 질소원, 기타 무기염 및 균주에 의해 동화될 수 있는 소량의 기타 성분을 함유한다. 탄소원으로는 D-글루코즈 및 슈크로즈와 같은 당류, 글루콘산, 갈리세롤 등과 같은 유기산이 액체배지에 1~3%로 사용될 수 있다. 질소원으로는 폴리펩톤, 옥수수 침지액 등이 0.5~5% 사용될 수 있다. 또한 성장을 위해 필요한 인산염, 마그네슘 염, 비타민 및 소량의 기타 금속염이 사용될 수 있다. 배지를 미리 상술한 2KLG 생성 균주로 접종시키고, 균주의 성장을 위해 25~35°C에서 15~30시간동안 배양한다.

성장후 브로스로부터 세포내 효소를 추출하는 방법으로는 하기의 방법이 예시될 수 있다. 즉, 먼저 원심분리에 의해 브로스로부터 세포를 수거하고, 물, 생리 식염수 또는 적당한 pH의 완충 용액으로 세척한다. 세척된 세포를 적당한 pH의 완충액에 현탁시키고, 음파파쇄, 프렌치프레스 또는 효소(리소자임)처리에 의해 분쇄시킨다. 원심분리등에 의해 분쇄된 용액으로부터 미파괴세포 및 세포찌꺼기를 제거하여 상층액(조효소 용액)을 수득한다. 조효소 용액에 황산암모늄을 가하여 염석(30~70% 포화분획)시킨다.

염석 생성물을 효소가 불활성화될 수 없도록 적당한 제조된 완충액에 용해시키고, 용액을 투석하여 남아있는 황산암모늄을 제거한다. 그리고, 효소용액을 이온 교환 크로마토그래피 및 친화크로마토그래피와 같은 정제처리하여 단일 성분의 정제된 25DKG-라제를 수득한다.

정제된 25DKG-라제의 물리-화학적 특성은 하기와 같은 기준과 함께 설명될 수 있다.

(1) 작용



보는 바와 같이 NADPH는 상기 반응에서 수소공여체로 사용된다. 또한 환원된 니코틴아미드 아데닌 디뉴 클레오티드(NADH)가 상기 반응에서 수소공여체로 사용될 수 있으나, 이 경우 반응속도가 DADPH를 사용하는 반응보다 1/250 이하로 낮아진다.

(2) 기질에 대한 특이성

이 효소는 25DKG 및 5KF에 대해 특이성을 나타낸다. 그러나, 상기 두 기질과 유사한 5-케토-D-글루콘산을 환원시키지 않으며, D-프럭토오즈 및 L-소르보즈와 같이 말단 알콜성히드록시기에 인접한 케토기를 갖는 케토오즈 및 2KLG 및 2-케토-D-글루콘산 같이 2-위치에 케토기를 갖는 화합물에 대해 환원 작용을 나타내지 않는다.

NADP 또는 NAD 존재하에 2KLG 및 L-소르보즈로부터 25DKG 또는 5KF를 실질적으로 생산하지 않는다.

(3) 최적pH : pH 6~7

(4)pH 안정성 : pH 5~7

(pH 4~5의 0.1M 디메틸 글루타르산 완충액, pH 6~7의 0.1M 굼 완충액(PIPES) 및 pH 8~9의 0.1M 트리스-HCl 완충액에서 28°C에서 30분간 처리한 후의 잔류활성을 기준으로 결정한다). 70%이상의 잔류활성은 pH 5~7에서 확인되며, 30%이하의 잔류활성은 pH4 이하 및 pH 8이상에서 확인된다.

(5) 효소활성의 측정

0.1mM NADPH 및 3.3mM Ca-25DKG를 함유한 0.1M 트리스완충액(pH 7)중에 30°C에서 효소반응시켜

NADPH를 산화시킨데 해당하는 340nm에서의 흡광도 감소를 측정하여 효소활성을 결정한다. 1단위의 효소활성은 1분에 1 μ 몰의 NADPH를 산화시킨 것으로 정의한다.

(6) 반응온도의 범위 : 25~45 $^{\circ}$ C

(7) pH 및 온도의 불활성화 조건

pH 4이하 또는 pH 8이상 및 28 $^{\circ}$ C에서 2시간동안 방치하면 96%이상이 불활성화 된다.

(8) 저해, 활성 및 안정화 :

이 효소는 옥살레이트에 의해 활성저해 되며, 글리세로알데히드에 의해 거의 활성이 저해되지 않는다. Mg⁺⁺ 또는 Mn⁺⁺를 가했을때 현저한 활성의 증가가 관찰되지 않는다. 고농도(30~50%)의 글리세롤 또는 슈크로오즈(1M)에 의해 안정화 된다.

(9) 분자량 : 29,000 \pm 2,000

(SDS-폴리아크릴아미드 전기영동 및 겔여과에 의해 측정)

(10) 등전점 : pH 4.4 \pm 0.3

(등전점 전기영동에 의해 측정)

(11) Km 값 : 2.2 \pm 1.5mM(0.1M 트리스완충액(pH 7.0) 및 30 $^{\circ}$ C에서 25DKG 기질).

본 발명의 25DKG-라제는 상술한 효소작용이 필요한 곳에 사용될 수 있다. 즉, 2KLG 및 L-소르보즈는 조효소 NADPH 존재하에 25KLG 및 5-케토-프럭토오스로 부터 각각 제조될 수 있다. 2KLG 제조의 경우, 반응은 보통 25~45 $^{\circ}$ C 및 pH 6~7에서 진행된다. 반응에 참여하는 기질 즉, 25DKG의 물농도는 수소공여체인 NADPH의 농도와 같으며, 효소반응에 관련된 통상의 지식에 따라 결정된다. 그러나 20~200mM의 농도가 적당한다.

효소는 0.5~5.0 단위/ml 농도에서 기질과 바람직하게 반응한다. 이 반응에서, 효소를 적당한 담체에 고정시켜 사용할 수 있다. 일반적으로 효소분야에서 공지된 고정화 방법이 사용될 수 있다. 예를들어, 관능기를 갖는 수지의 막, 과립등에 직접 결합시키거나, 이 관능기를 갖는 화합물(예, 글루타르알데히드)을 수지에 브릿지시켜 결합시킬 수 있다.

상기 효소 반응의 시간은 특별히 제한되지 않으며, 30 $^{\circ}$ C에서 60~120분간 반응을 수행하면 90%이상의 25DKG(기질)RK 2KLG로 환원된다.

본 발명은 하기의 실시예에 의해 더욱 상세히 설명된다.

[실시예 1]

(1) 세포의 배양

(i) 종배지

하기 조성의 배지 (60ml)를 500ml의 플라스크에 넣고, 120 $^{\circ}$ C에서 15분간 살균한다.

D-글루코오즈	1.0%
이스트 추출물(Difco)	0.5%
박토-펄톤(Difco)	0.5%
NaNO ₃	0.1%
KH ₂ PO ₄	0.1%
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.02%

pH 7.0

(ii) 성장용 배지

500ppm의 거품방지제 (폴리프로필렌 글리콜 P-2000)를 함유한 하기 조성의 배지(20 l)를 30 l 병 발효기에 넣고 120 $^{\circ}$ C에서 20분간 살균한다.

D-글루코오즈	2.0%
옥수수 침지액	3.0%
이스트 추출물	0.1%
NaNO ₃	0.3%
KH ₂ PO ₄	0.06%

pH 7.2

(iii) 배양

코리네박테리움 sp.No.20A-77로부터 유도된 변이주(FEPM-BR 108, KAIST 830526-09811) 각 1루우프로 각 10개의 종배지를 접종시키고, 진탕기(진폭 71mm, 270rpm)에 28 $^{\circ}$ C에서 18시간동안 배양한다. 배양

된 배지(10)를 성장 배지에 옮기고, 통기량 0.5vvm 교반 400rpm, 28°C에서 22시간동안 배양한다. (OD=19)

(2) 효소의 추출

상기(1)의 수득된 배양 브로스를 원심분리 (샤프리스 원심 분리기 : 10,000G, 10분)하여 세포를 수거하고, 0.1M 트리스 완충액(이후 특별한 지시가 없는한 pH 7.0으로 조절된 TB로 약칭한다)으로 세척한다. 세척된 세포를 0.1M TB에 현탁시켜 현탁액의 OD를 150으로 만들고, 초음파(160와트/80ml, 7분)에 의해 파쇄된다. 초음파 용액을 원심분리(15,000G, 30분)하여 미파괴 세포 및 세포 잔사를 제거하고 약 1 l의 상층액(단백질=10.3mg/ml, 25DKG-라제=0.63 단위/ml)을 수득한다.

(3) 효소의 정제

(하기의 조작은 모두 4°C이하에서 수행한다.)

(i) 황산암모늄으로 분획화

상기(2)에서 수득된 상층액에 황산암모늄을 가하여 30%포화시키고, 원심분리(10,000G, 10분)에 의해 염색 생성물을 제거한다. 이 상층액에 황산 암모늄을 가하여 70%포화시킨다. 얼음으로 약 1시간동안 냉각시킨 후, 침전된 단백질을 원심분리 (10,000G, 10분)에 의해 수거한다. 단백질을 200ml 의 0.1M TB에 용해시키고, 용액을 0.02M TB에 밤새 투석시킨다.

(ii) 이온교환 크로마토그래피

상기 (i)에서 수득된 투석용액(250ml, 단백질 : 13.6mg/ml)을 DEAE-세팔로즈 CL-6B 칼럼(파마시아 파인 케미칼 사)에 넣고, 하기 조건하에 크로마토 그래피한다.

컬럼크기 : 1.6 × 30cm

평형액 : 0.02M TB

용리액 : 0.02M TB(200ml)...0.15M

NaCl/0.02M TB(300ml)...0.25M

NaCl/0.02M TB(200ml).

용출액을 5ml 분획으로 분리하고, 하술될 (5)-(ii)의 방법에 따라 기질 Ca-25DKG 및 5KF에 대한 각 분획의 효소 활성을 측정한다. 결과로서, 0.25 M NaCl/0.05M TB 로 용출된 80ml 용출액에서 두 기질의 효소활성이 관찰된다.

용출액이 70%포화되도록 황산암모늄을 가하여 단백질을 염색시키고, 염색 생성물을 30ml의 0.1M TB에 용해시키고, 0.02M TB에 4°C에서 밤새 투석시킨다.

(iii) 친화크로마토그래피

상기 (3)-(ii)에서 수득된 투석용액을 0.02M TB로 미리 평형된 아미콘 매트릭스 겔 레드 A칼럼(아미콘 파 이스트사)에 넣고 하기의 조건하에 크로마토 그래피한다.

컬럼크기 : 1.6 × 19cm

세척액 : 1.4M NaCl/0.02 M TB(400ml)

용리액 : 0.5M NaCl/0.02 M TB(450ml)

...0.7 M NaCl/0.02 M TB(150ml)...

1 M NaCl/0.02 M TB(300ml).

(3)-(ii)와 같은 방법으로 각분획(각 5ml)의 효소활성을 측정한 결과, 0.7M~1.0M NaCl/0.02M TB로 용출된 18분획의 용출액에서 두기질 25DKG와 5KF에 대한 효소활성이 관찰되었다. 225ml의 0.02 M TB을 수거된 활성분획(90ml)에 가하여 용액의 NaCl 농도를 낮추고 혼합물을 다시 아미콘 매트릭스 겔 레드 A칼럼(1.9×13cm)에 넣는다. 컬럼을 120ml의 0.2 M NaCl/0.02 M TB 로 세척하고, 0.5mM NADPH 및 0.2M NaCl을 함유한 150ml의 0.02M TB로 용출시킨다. 용출액을 효소활성이 상술한 바와 같이 측정된 5ml분획으로 분할한다. 결과로, 0.5mM NADPH 및 0.2 M NaCl을 함유한 0.02M TB로 용출된 분획(약 70ml)에서 고 효소활성을 갖는 분획(약 35ml)이 수득된다는 것이 발견된다.

(iv) 효소의 농축 및 NADPH의 제거.

상기 (iii)에서 수득된 용출액에 황산암모늄을 가하여 30% 포화시키고, 30% 포화황산암모늄을 함유한 0.02 M TB로 미리 평형된 페닐 세팔로스 CL-4B 컬럼(0.9×3cm, 파마시아파인 케미칼사제)에 넣는다. 컬럼을 30% 포화 황산암모늄을 함유한 0.02 M TB로 세척하여, NADPH를 완전 제거하고, 340nm에서 흡광도를 측정하여 완전히 제거되었나를 확인한 다음, 컬럼의 효소를 0.02 M TB로 용출시키고, 1ml 분획으로 나눈다.

이들 분획의 효소활성을 측정한 결과, 4분획에서 고효성이 관찰된다. 4분획을 수거하여 경제된 효소 용액으로 정의하고 계속되는 측정에 사용한다. 이 용액은 54 단위/ml 의 25DKG-라제 활성을 나타내며, 0.58mg/ml 단백질을 함유한다.

(4) 정제된 효소 용액의 순도

상기 (3)에서 수득된 정제된 효소 용액 2-5 μ l 를 SDS-폴리아크릴 아미드 겔 전기영동(분리겔 : 10% 아크릴아미드, 전기영동조건 : 실온, 40mA에서 1시간)에 의해 분석한다. 효소는 분자량 29,000±

2,000에 해당하는 위치에서 단일 밴드로 집중된다.

겔 여과(세파데스 G-100)에 의해 더 분석하면 분자량 29,000± 2,000에 해당하는 분획에서 효소활성이 관찰된다.

5 μl의 효소 용액을 등전점 전기영동(겔 : 폴리아크릴아미드 : 전기영동(a)의 조건 ; pH 간격 2.5-5, 양극 전해질=0.1 M H₂SO₄, 음극 전해질= 0.1M NaOH, 6W, 2,700VH : 전기영동(b)의 조건 ; pH 간격 4.0-6.5), 양극 전해질=0.04M NaOH, 25W, 2,600VH ; 온도 18-20°C)하여 효소가 pH4.4±0.2에 해당하는 위치의 단일밴드에 이동하는 결과를 얻는다. 전술한 사실로부터, 정제된 효소용액이 단지 25DKG-라제만을 함유한다는 것을 알 수 있다.

(5) 물리-화학적 특성의 측정.

(i) 효소반응

상기 (3)에서 수득된 정제된 효소 용액(10 μl)을 25 μ몰의 기질(Ca-25DKG 또는 5KF), 및 15 μ몰의 NADPH를 함유한 3.0ml의 0.01 M TB(pH 7)와 혼합하고, 혼합물을 30°C에서 60분간 반응시킨다. 반응 후, 반응 혼합물을 종이 크로마토그래피(전개용매 ; 페놀 : 포름산 : 물=75 : 4 : 23, 염색제 ; 0.93g의 아닐린 및 1.66g의 프탈산을 100ml의 수-포화 n-부탄올에 용해시키고, 105°C에서 2분간 가열함으로써 제조된 AHF 용액) 및 기체크로마토그래피(컬럼 ; SE-52, 담체기체 ; 헬륨, 시료 ; 트리 메틸 실릴화유도체)에 의해 분석한다. 그 결과, 2KLG는 25DKG로 부터만 제조되며, L-소르보즈는 단지 5KF로 부터만 제조된다는 것이 발견된다.

표 1에서는 기체크로마토그래피에 의한 생성물의 정량분석 결과를 나타낸다.

[표 1]

정제된 효소용액에 의한 25DKG 및 5KF의 환원

기 질	생 성 물	생성물의 농도
Ca-25DKG	Ca-2KLG	845 μ g/ml
5KF	L-소르보즈	795 μ g/ml

(ii) 기질 특이성

0.3 μ몰의 NADPH를 함유한 2.9ml의 0.1M TB(pH 7)를 길이가 1cm 차이 나는 석영 입방체에 넣고, 상기 (3)에서 수득된 1~5 μl의 효소용액을 가한다. 혼합물을 30°C로 유지시키면서 각 0.1ml의 각종 기질 용액(0.1M)을 가한다. 340nm에서 1분간의 흡광도 감소치를 기준으로한 흡광도의 감소를 연속적으로 측정하여 각 기질에 대한 효소의 반응성을 결정한다. 측정결과는 하기 표 2에서 나타낸다.

[표 2]

각종 기질에 대한 25DKG-라제의 특이성

기 질	정제된 효소용액(1ml)의 활성
Ca-25DKG	54단위
5KF	94단위
K-5-케토-글루코네이트	0단위
D-프럭토오즈	0단위
L-소르보즈	0단위
Ca-2-케토-D-글루코네이트	0단위
Na-2KLG	0단위

상기의 표로부터, 본 발명의 효소는 25DKG 또는 5KF에 대해서는 높은 활성을 나타내나, 5-케노-D-글루콘산, D-프럭토오즈, L-소르보즈, 2-케노-D-글루콘산 및 2KLG에 대해서는 환원작용을 나타내지 않는다는 것을 알 수 있다.

(iii) 조효소(수소공여체)

NADH를 (5)-(ii)의 반응계에서 NADPH로 치환시키고, 기질 Ca-25DKG 및 5KF에 대한 25DKG-라제의 효소활성을 측정한다. 측정결과는 하기표 3에 나타낸다.

[표 3]

25DKG-라제 활성에 대한 조효소의 효과

기 질	효소 활성 (단위/1ml의 정제된 효소용액)	
	조효소 : NADPH	NADH
Ca-25DKG	54	0.2>
5KF	94	0.2>

상기의 표로부터, 본 발명의 효소는 NADPH와 함께 사용할 때 Ca-25DKG에 대해 54단위/1ml의 정제된 효소용액의 효소활성을 나타내고, NADH와 함께 사용할 때는 0.2단위 이하의 활성만을 나타낸다는 것을 알 수 있다. 마찬가지로 NADPH와 함께 사용할 때 5KF에 대한 효소활성은 94단위이고, NADH와 함께 사용할 때는 0.2단위 이하이다.

(iv) 최적 pH

25DKG-라제의 반응속도와 pH사이의 관계를 명확히 하기 위해 (5)-(ii)의 반응계에 사용된 완충액 대신 하기의 완충액을 사용하여 효소활성을 측정한다.

pH 4.0~5.0 : 0.1M 3,3-디메틸글루타르산 완충액

pH 6.0~7.0 : 0.1M 굽 완충액(PIPES : 피페라진-N, N-비스-(2-에탄)술폰산)

pH 7.0~9.0 : 0.1M 트리스 완충액.

각 pH에서 기질 Ca-25DKG 및 25KF에 대한 효소활성의 측정결과는 하기표 4에 나타난다.

[표 4]

효소반응에서 pH에 의한 25DKG-라제활성

pH	완충액	효소활성(a) (단위/ml)	
		기질 : Ca-25DKG	5KF
4.0	3,3-디메틸 글루타르산	1	2
5.0	"	22	33
6.0	굽 (PIPES)	59	96
6.5	"	57	95
7.0	"	53	92
"	트리스	54	93
7.5	"	44	68
8.0	"	32	48
8.5	"	11	27
9.0	"	7	13

(a) 1ml의 정제된 효소 용액당의 효소활성 단위

상기 표로부터 효소는 pH 6~7에서 높은 효소활성을 나타낸다는 것을 알 수 있다.

(v) 작용온도

기질 Ca-25DKG를 사용한 (5)-(ii) 반응계의 반응속도를 15~50℃에서 온도를 변화시키면서 측정한다. 결과는 하기표 5에 나타난다.

[표5]

온도에 의한 25DKG-라제활성

온도℃	효소활성(단위/ml)
15	14
25	29
27.5	44
30	54
32.5	59
35	64
40	67
45	44
50	10

효소활성 : 기질 Ca-25DKG, pH 7에서 1ml의 정제된 효소용액당의 활성

상기표로 부터, 본 발명의 효소는 40℃이하의 온도에서 온도가 증가할수록 효소 활성이 증가하나, 45℃이상의 온도에서는 온도가 증가할수록 효소활성이 감소한다는 것을 알 수 있다.

(vi) Km 값의 측정

상기(5)-(ii)에서 기술된 과정에서 Ca-25DKG의 농도를 0.01M~0.25M로 변화시키면서 환원반응속도를 각각 측정하여 25DKG에 대한 Km 값을 결정한다. 그 결과, Km 값은 1.8±1.0mM이다.

[실시예 2]

(1)의 세포의 배양

(i) 성장용 배지

하기 조성의 배지(15 l)를 20 l 병 발효기에 넣고 120℃에서 20분간 살균한다.

D-글루코오즈	1.0%
옥수수 침지액	1.0%
이스트 추출물 (Difco)	0.2%
폴리 펩톤 (Difco)	0.5%
KH ₂ PO ₄	0.1%
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.02%

pH 7

(ii) 배양

실시예 1-(1)과 같은 배지 및 방법으로 코리넵박테리움 sp.No.K-106 (ATCC 31,088, KAIST 830526-08511, K-106으로 약칭) 및 코리넵박테리움 sp.No.T-13 (ATCC 31,089, KAIST 830526-08711, T-13으로 약칭)의 두 종배양액을 각각 제조한다.

이들 각종배양액을 (i)에서 제조된 각 배지에 접종하고, 0.5vvm의 통기 및 400rpm의 교반하에 28℃에서 18시간동안 배양한다. 배양후 OD로 표시되는 세포의 양은 하기와 같다 : 균주 No.K-106의 OD=11.8, 균주 No. T-13의 OD=12.2

(2)효소의 추출

배양 브로스의 세포를 실시예 1-(2)의 방법에 따라 세척하여 균주 No K-106 및 T-13을 0.02M TB에 녹인 OD=150의 세포 현탁액을 제조한다. 현탁액중의 세포를 프렌치 프레스(700kg/cm²)로 파쇄한다. 파쇄된 용액을 실시예 1-(2)와 같은 방법으로 원심분리 (15,000G, 30분)하여 미파쇄 세포 및 세포 찌꺼기를 제거한다. 결과로, 하기의 효소활성을 갖는 세포 추출물을 수득한다.

균 주	추출물의 양	단 백 질	25DKG-라제활성
K-106	400ml	10mg/ml	2.1 단위/ml
T-13	400ml	12mg/ml	2.0 단위/ml

(3) 효소의 정제

(i) 황산암모늄으로 염석

30~70% 포화 황산암모늄으로 염석된 분획에 해당하는 단백질을 실시예 1-(3)과 같은 방법으로 수거하고, 0.02 M TB에 용해시킨 후, 그 용액을 0.02M TB에 4℃에서 밤새 투석시킨다. 결과로, 하기의

효소 활성을 갖는 투석 용액이 수득한다.

균주	효소용액의 양	단백질	25DKG-라제활성
K-106	74ml	(시정안했음)	7.0 단위/ml
T-13	88ml	11.1mg/ml	4.8 단위/ml

(ii) 이온-교환 크로마토그래피

실시에 1-(3)-(ii)에 기재된 방법으로 효소용액을 처리한다. 결과로, 하기의 효소활성을 갖는 용출액이 수득된다.

균주	효소용액의 양	단백질	25DKG-라제활성
K-106	49ml	0.60mg/ml	2.4 단위/ml
T-13	52ml	0.94mg/ml	4.1 단위/ml

(iii) 친화 크로마토그래피

상기 (ii)에서 수득된 각 용출액에 황산암모늄을 가하여 30% 포화시키고, 실시에 1-(3)-(iv)의 방법에 따라 페닐 세팔로스 겔 컬럼 크로마토그래피에 의해 효소를 농축 및 탈염시킨다. 농축된 효소용액을 실시에 1-(3)-(iii)과 같은 방법으로 아미콘 매트릭스겔 레드 A 컬럼에 친화 크로마토그래피하여 2번 정제한다. 결과로, 두 균주로 부터 유도된 25DKG-라제는 첫번째 크로마토그래피에서는 0.7~1M NaCl로 용출된 분획에, 두번째 크로마토그래피에서는 0.5mM NADPH로 용출된 분획에 나타난다.

실시에 1-(3)-(iv)의 방법에 따라 NADPH를 제거한 후 용출액을 탈염 및 농축한다. 결과로, 하기의 활성을 갖는 정제된 효소용액이 수득된다.

균주	효소용액의 양	단백질	25DKG-라제활성
K-106	Ca 1ml	0.25mg/ml	23.8 단위/ml
T-13	Ca 2ml	0.17mg/ml	15.1 단위/ml

상기 효소용액(2~10 μg)을 실시에 1-(4)에 기재된 바와 같이 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동 및 등전전기영동에 의해 분석한다. 여기서, 효소들 중 하나는 단일밴드를 나타낸다. 정제된 효소용액은 하기의 특성을 나타낸다.

(4) 효소의 물리-화학적 특성

물리-화학적 특성의 측정은 실시에 1-(4)(5)에 기재된 방법으로 수행한다.

(i) 분자량

SDS-폴리아크릴아미드겔 전기영동에 따라 분석한 결과, 균주 K-106 및 T-13으로 부터 유도된 25DKG-라제의 분자량은 29,000±2,000이다.

(ii) 등전점

균주 K-106 및 T-13으로 부터 유도된 효소를 등전점 전기영동한 결과는 각각 pH 4.4±0.2 및 pH 4.5±0.2이다.

(iii) 기질 특이성

효소는 Ca-25DKG로 부터는 Ca-2KLG 및 5KF로 부터는 L-소르보즈만을 제조한다. 5-케토-D-글루콘산, D-프럭토오즈, L-소르보즈, 2KLG 및 2-케토-D-글루콘산으로 부터는 아무것도 제조하지 못한다.

(iv) 효소활성

균주 K-106으로 부터 유도된 효소는 Ca-25DKG에 대해 23.8 단위/ml (95단위/mg 단백질)의 활성을 나타내고, 5KF에 대해 38.3 단위/ml (152단위/mg 단백질)의 활성을 나타낸다. 반면, 균주 T-13으로 부터 유도된 효소는 Ca-25DKG에 대해 15.1단위/ml (89단위/mg 단백질)의 활성을 나타내고, 5KF에 대해 39 단위/ml (229단위/mg 단백질)의 활성을 나타낸다.

(v) 조효소(수소 공여체)

조효소로서 NADH를 사용하여 Ca-25DKG에 대해 두 효소의 효소활성을 측정한 결과 두 경우 모두 0.1 단위/ml이하의 활성을 갖는다.

(vi) 최적 pH

K-103 및 T-13으로 부터 수득된 25DKG-라제의 효소활성을 pH 4~9로 변화시키면서 측정한다. (기질 : Ca-25DKG, 반응온도 : 30℃). 그의 결과는 하기표 6에 나타낸다.

[표 6]

각 1개의 효소 반응에 있어 ; K-106 및 T-13으로 부터 수득된 250KG 라제의 효소활성

pH	효소 활성 (상대적 활성)*	
	K-106	T-13
4.0	1	1
5.0	48	65
6.0	103	104
7.0	100	100
8.0	70	64
9.0	6	19

* pH 7, 30℃에서의 활성 100을 기준으로 한 각 pH에서의 활성.

상기 표의 결과로 부터, 양 균주로 부터 수득된 250KG-라제의 최적 pH는 pH 6~7이라는 것이 확인된다.

(vii) 작용온도

K-106 및 T-13으로 부터 수득된 250KG-라제의 효소활성을 온도를 변화시키면서 측정한다(pH 7.0, 기질 ; Ca-250KG). 그의 결과는 하기표 7에 나타낸다.

[표 7]

각 반응온도에서 K-106 및 T-13으로 부터 수득된 250KG-라제의 효소활성

온도 (℃)	효소 활성 (상대적 활성)*	
	K-106	T-13
22	46	64
25	69	79
28	86	92
30	100	100
35	115	115
40	119	103
45	93	128
50	44	92

* 상기 표 6에 정의한 바와 같다.

상기 표의 결과로 부터, 양 균주로 부터 수득된 250KG-라제의 활성은 40℃이하의 온도에서는 온도가 증가할수록 증가하나 45℃이상의 온도에서는 온도가 증가할수록 감소한다.

(viii) Km 값

K-106 및 T-13의 정제된 효소용액을 사용하여 250KG에 대한 양 효소의 Km 값을 측정한 결과 각각 1.7±1.0mM 및 2.6±1.0mM이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

코리네박테리움(Corynebacterium) 속에 속하는 미생물을 탄소 및 질소원 및 무기염을 함유한 영양 배지에서 배양하고, 그 미생물의 파쇄된 세포로부터 2,5-디케토-D-글루콘산 리덕타제를 단리함을 특징으로 하는, 하기의 물리-화학적 특성을 갖는 2,5-디케토-D-글루콘산 리덕타제의 제조방법.

(a) 효소작용 : 조효소인 NADPH 존재하에 (i) 2,5-디케토-D-글루콘산 또는 그의 염을 2-케토-L-글루콘산 또는 상응하는 그의 염으로 환원시키는 반응 및 (ii) 5-케토-D-프럭토오스를 L-소르보스로 환원시키는 반응을 촉매한다.

(b) 기질에 대한 특이성 : 2,5-디케토-D-글루콘산 및 5-케토-D-프럭토오즈.

(c) 최적 pH : pH 6~7

(d) pH 안정성 : pH 5~7

(e) 분자량 : 29,000±2,000

(f) 등전점 : pH 4.4 ± 0.3