

고정화 *Brevibacterium ammoniagenes*와 Acetate Kinase의 ATP 생성계에 의한 NADP 생산

조 정 일

고려대학교 농화학과

Production of NADP by Immobilized *Brevibacterium ammoniagenes* and ATP-regenerating System of Acetate Kinase

Jung-II Cho

Department of Agricultural Chemistry, Korea University, Seoul 136-170, Korea

Abstract

For the conversion of NAD to NADP, immobilized *Brevibacterium ammoniagenes* cells with NAD kinase was coupled with ATP generating system by acetate kinase. The membrane permeability of *B. ammoniagenes* was improved by toluene treatment of cells. The toluene treated *B. ammoniagenes* cells were immobilized for stable enzyme activity. Partially purified acetate kinase was used in the reaction system. The optimum conditions for the efficient conversion of NAD to NADP by energy-coupled system were investigated. *B. ammoniagenes* cells treated with toluene for the improvement of membrane permeability showed 4.5 fold improved permeability in the conversion of NAD to NADP compared with intact cells. 3% *k*-carrageenan as the immobilization matrix of *B. ammoniagenes* showed the best efficiency for the conversion of NAD to NADP. The optimum conditions for the NAD to NADP conversion reaction coupled with ATP-generating system were 10mM acetylphosphate, 5mM ADP, 200mM inorganic phosphate, 10mM MgCl₂, 250mg /mℓ immobilized cells, 49.3mUnit /mℓ acetate kinase, pH 7.5 and 37°C. Under the optimum conditions, 72% of 5mM(340mg /mℓ) NAD was converted to NADP in 12 hours.

Key words : immobilization, *Brevibacterium ammoniagenes*, NADP production, ATP-generating system

서 론

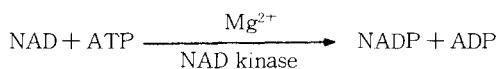
1935년 Warburg와 Christian에 의해 수소 전달 보호소의 구성 성분인 nicotineamide라는 사실이 밝혀지고 그 뒤 NAD와 NADP의 화학구조가 밝혀진 후 pyridine nucleotide coenzyme인 NAD와 NADP에 대한 품질은 연구가 진행되었다. 이러한 pyridine nucleotide의 하나인 NADP는 1950년 Kornberg¹⁾에 의해 ATP와 NAD로부터 NADP 생산이 보고된 후 blood나 urine의 보호소의 분석을 포함한 여러 가지 생화학적 분석에의 NADP 사용이 증대되어 관심을 끌게 되었다. 현재의 NADP 생산은 보호소로부터의 추출에 의해 생산되고 있으나, 이 방법은 과정이 복잡하고 많

은 노력이 필요하며 비생물 세포내의 낮은 NADP 양 때문에 비효율적이다. 이러한 결점을 해결하기 위해 NAD kinase를 이용한 NAD의 효소적 인산화에 의한 NADP 생산이 시도되고 있다. 그러나 NAD kinase에 의한 NADP 생산은 보호소의 안정성의 결여로 산업적 생산에 커다란 문제점으로 대두되어 안정한 NAD kinase 활성 유지에 의한 NADP 생산이 관심을 끌게 되었다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 Uchida²⁾은 *Achromobacter aceris* cells을 polyacrylamide gel matrix에 직접 고정화하여 NAD와 ATP로부터 NADP의 연속 생산을 시도하였고 Tanaka³⁾은 NAD kinase 활성을 가진 *Brevibacterium ammoniagenes* cells을 이용한 NADP 생산을 보고하였다. 또한 Matsushita⁴⁾은 *Corynebacterium flaccum-faciens*의 permeabilized cells을 이용하여 NADP 생산을 보고하였다.

Corresponding author : Jung-II Cho

또한 Matsushita 등⁴⁾은 *Corynebacterium flaccum-faciens*의 permeabilized cells을 이용하여 NADP 생산을 보고하였다. 그러나 이러한 방법도 NADP 전환 반응의 에너지원인 ATP의 분해 활성의 문제와 고가의 시약인 ATP의 사용으로 인해 비경제적인 방법으로 판단되었다.

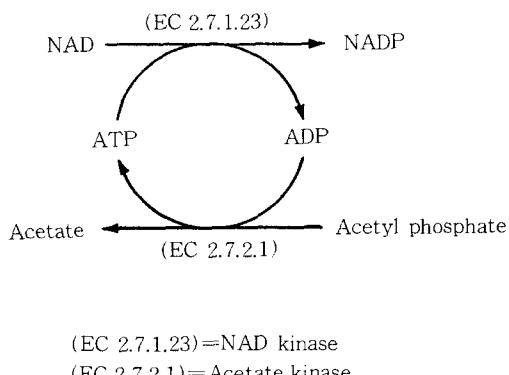
한편 NAD kinase [EC 2.7.1.23]의 촉매 반응은 endergonic reaction으로서 1 mole의 NAD를 NADP로 완전히 전환하는데 1 mole의 고에너지 인산화합물, 즉 ATP(adenosine 5'-triphosphate)를 요구한다. 따라서 ATP를 에너지원으로 하는 효소 반응으로부터 유용한 물질을 생산하기 위해서는 효율적인 ATP 공급이 필수적이다.



지금까지 알려진 ATP 생산 및 재생 방법을 보면 화학합성법⁵⁾, yeast에 의한 AMP의 인산화⁶⁾, subcellular organelle에 의한 생산⁷⁾, 동물이나 미생물로부터의 추출⁸⁾, cell-free enzyme에 의한 ADP의 인산화 등^{9,10)}이 있는데 화학합성법은 비싼 반응물질 사용과 부반응 및 비수용성 media를 요구하는 단점이 있고, 효모에 의한 인산화는 보다 큰 선택성을 가지나 에너지원으로 glucose를 요구하며 많은 부산물(CO₂, ethanol, fructose 1,6-diphosphate)이 생기고 오랜 반응시 불안정성의 단점이 있다. 또한 subcellular organelle은 반응 작용 기간이 너무 짧아서 실제적인 process에 사용할 수 없는 단점이 있다. 이에 반해 cell-free enzyme에 의한 ATP 재생계는 가장 간단하고 실용적인 방법으로 Langer 등¹¹⁾은 여러 cell-free enzyme에 의한 ATP 재생계 중에서 acetate kinase에 의한 ATP 재생계의 경우 acetate kinase에 의해 촉매되는 반응이 높은 ATP 합성의 평형상수를 가지며 phosphate donor인 acetyl phosphate가 높은 반응 안정성을 가지므로 가장 유망한 ATP 재생계로 선정하였다. 그밖에 *B. ammoniagenes*의 salvage 합성계를 이용하여 adenine으로부터 ATP를 생산하는 방법¹²⁾과 phosphofructokinase와 triose phosphate isomerase의 gene을 포함한 hybrid plasmid를 가진

*Escherichia coli*에 의한 AMP 인산화¹³⁾, polyphosphate kinase를 이용한 ATP 재생법 등이 보고되어 있다.

본 연구에서는 NAD kinase 활성이 높은 *B. ammoniagenes* 균체를 NADP 전환 반응계에 이용하기 위해 toluene 처리 후 동결 건조하여 세포막 투과성을 향상시키고 안정한 효소 활성 유지와 재 사용을 위해 *k*-carrageenan에 포괄 고정화하여 NAD를 NADP로 전환하고자 하였으며, 이때 요구되는 ATP는 acetate kinase에 의한 NAD 생성계로부터 생성된 ATP를 NADP 전환 반응에 도입하고자 하였다 (Fig. 1).



(EC 2.7.1.23)=NAD kinase
(EC 2.7.2.1)=Acetate kinase

Fig. 1. Schematic representation of coupled reaction system.

재료 및 방법

1. 효소원으로 사용한 미생물

NAD kinase의 효소원으로 이용한 미생물은 *B. ammoniagenes* ATCC 6872, *B. ammoniagenes* ATCC 6871, *B. ammoniagenes* ATCC 21170, *C. glutamicum* ATCC 21171 이었다. ATP 생성계의 효소원으로는 *E. coli*의 acetate kinase를 이용하였다.

2. 배지 및 배양 방법

B. ammoniagenes ATCC 6872의 NAD kinase 생산을 위한 배지는 2% glucose, 2.5% yeast extract, 0.1% KH₂PO₄, 0.1% K₂HPO₄, 0.7% urea, 0.01%

CaCl_2 , pH 7.0으로 조성되었으며 *E. coli*의 acetate kinase 생산을 위한 최소배지는 0.5% KH_2PO_4 , 0.7% KH_2PO_4 , 0.05% $\text{Na}_3\text{-citrate}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0.01% $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.8% glucose, pH 7.2로 조성되었다.

NAD kinase 효소원으로 이용할 *B. ammoniagenes*를 집균하기 위해 한 백금니의 균체를 취하여 30 mℓ의 NAD kinase 생산 배지를 함유하는 500 mℓ 용 삼각 플라스크에 접종하여 생육의 대수증식기 말기 까지 30°C에서 전배양하였다. 본 배양은 동일 배지 2.5 ℓ를 포함하는 5 ℓ jar fermenter(Marubishi Co.)에 10% 접종하여 14시간 배양하였다. 집균한 균체는 0.1M phosphate buffer(pH 7.5)로 두번 세척한 후 -70°C에서 보관하였다.

Acetate kinase의 효소원으로 이용할 *E. coli*를 집균하기 위해 500 mℓ 용 삼각 flask에 접종하여 rotary shaker에서 생육의 대수 증식기 말기까지 37°C에서 진탕 배양하였다. 얻어진 균체는 7.5mM potassium phosphate buffer(pH 7.4)로 두 번 세척하여 보관하면서 사용하였다.

3. NADP 전환 반응계의 전환 균체 제조

*B. ammoniagenes*의 균체에 의한 NAD의 NADP로의 전환을 위해 다음과 같은 세포막 투과성 항상을 위한 과정을 수행하였다. Acetone 처리 후 동결건조균체 제조는 Shimosaka 등¹⁴⁾의 방법을 변형하여 제조하였고, toluene 처리 후 동결건조균체 제조는 Murata 등¹⁵⁾의 방법을 변형한 것으로, 즉 10g(wet wt) *B. ammoniagenes* 균체를 0.1 mM dithiothreitol을 포함하는 5.0 mM phosphate buffer(pH 7.5) 50 mℓ에 혼탁한 후 toluene 5 mℓ을 처리하여 25°C에서 혼들어 주면서 30분간 방치하였다. 이를 원심분리한 뒤 동결건조기(Labconco freeze dryer 8)로 2일간 동결건조하여 사용하였다.

4. 전환 균체의 고정화

균체의 유기용매 처리 후 동결 건조한 균체의 안정한 효소 활성 유지와 재사용성을 위해 전환 균체를 다음의 납제들에 고정화 시킨 후 NAD의 NADP로의 전

환을 시도하여 가장 효과적인 NAD 전환 담체를 선정하였다. Polyacrylamide에 의한 균체 고정화는 Murata¹⁴⁾의 방법을 수정하여 진행하였고, calcium alginate에 의한 균체 고정화는 Yongsmith¹⁵⁾의 방법을 약간 수정하여 진행하였다. *k*-carrageenan에 의한 고정화는 Nishida와 Tosa¹⁶⁾의 방법을 변형하여 다음과 같이 실시하였다. 즉, 동결건조균체 3.75g을 0.85% (w/v) 생리식염수 25 mℓ에 혼탁하여 45°C로 유지시키고 1.5 g *k*-carrageenan을 0.85%(w/v) 생리식염수 25 mℓ에 넣고 80°C에서 잘 녹인 후 45°C로 냉각하였다. 상기 균체 혼탁액과 *k*-carrageenan 용액을 45°C에서 잘 혼합하여 10°C에서 30분간 냉각시켜 gel을 만든 후 2×3×3(mm) 크기로 절단한 후 0~4°C를 유지하며 0.3 M KCl 용액에 2시간 동안 침지하여 gel의 강도를 높여 주었다.

5. NAD kinase의 활성 측정

NAD kinase의 활성 측정은 Hayashi¹⁷⁾ 및 Matsshita 등¹⁸⁾의 방법에 따라 수행하였다. NAD kinase의 효소 활성은 NADP에 특이적인 glucose-6-phosphate dehydrogenase(G-6-P DHase)에 의한 NAD의 NADPH의 환원에 의해 측정하였다.

기질 혼합액의 조성은 5mM ATP, 5mM NAD, 0.1 mM NaF, 10mM MgCl₂, 1mM ZnCl₂, 0.1 mℓ 5U/mℓ G-6-P DHase 대신에 0.2 mℓ 증류수를 가한 것으로 사용하였다. 효소 반응은 cap tube에 상기 기질 용액 1.6 mℓ를 섞고, toluene 처리 후 동결건조한 균체 1g을 0.1M phosphate buffer(pH 7.5) 10 mℓ에 혼탁한 용액 0.4 mℓ를 가하여 최종 부피가 2 mℓ가 되게한 다음 30°C에서 60분간 배양한 후 끓는 물에 약 2분간 두어 반응을 중지시킨다. 반응 중지한 혼합액을 냉각한 후 원심 분리(12,000rpm, 20min)하여 상정액 0.5 mℓ에 0.1 mℓ 20mM G-6-P와 0.1 mℓ 5U/mℓ G-6-P DHase, 2.3 mℓ 0.1 M triethanolamine buffer(pH 7.5)를 가하고 30°C에서 30분간 배양한 후 환원된 NADP의 흡광도를 340 nm에서 측정하였다. 고정화 균체의 효소 활성 측정은 전환 균체 0.4 mℓ에 해당하는 고정화 균체 500 mg을 2 mℓ 반응 용액에 가하여 37°C에서 배양하여 진행하였

다.

6. Acetate kinase의 추출 정제

Acetate kinase의 조정제는 Griffith 등¹⁷⁾의 방법을 수정하여 수행하였다. 전 과정은 4°C에서 수행하였으며, 원심분리는 12,000rpm에서 30분간 수행하였다. *E. coli* 균체 10g을 glycerol 10% (w/v), 2mℓ MgCl₂, 0.2M KCl이 포함된 5mM potassium phosphate buffer(pH 6.73) 35mℓ에 완전히 녹인 후 그 혼탁액을 9KCz에서 25초씩 7회 sonication 한 후 원심분리하여 상정액을 취하였다. 여기에 0.17g의 protamine sulfate를 천천히 가하면서 15분간 저어준 후 원심분리하고 상정액을 취하여 같은 buffer 600mℓ에서 16시간 투석하였다. 여기에 10% streptomycin sulfate를 1/10용량 첨가하여 약 1시간 동안 저어준 후 원심분리하여 같은 buffer에서 16시간 투석하였다. 위에서 얻은 추출액에 ammonium sulfate(pH 7.4) 포화 용액을 46%가 되도록 저어주면서 첨가한 후 원심분리하여 그 상정액에 ammonium sulfate 포화 용액을 63% 되도록 가한 다음 원심분리하여 침전물을 취하였다. 여기에 5mM postassium phosphate buffer(pH 6.73) 8mℓ을 가하여 혼탁한 후 같은 buffer에서 16시간 투석을 수행한 후 이를 -70°C에서 보관하였다.

7. Acetate kinase의 활성 측정

Acetate kinase의 활성 측정은 Griffith 등¹⁷⁾의 방법에 따라 측정하였다. Assay 원리는 hydroxyamine의 존재하에서 acetyl phosphate가 빠르게 hydroxylamine과 반응하여 acetylhydroxamic acid를 형성하고 이것은 ferric-trichloroacetic acid 용액에 의해 ferric-acetylhydroxamic acid를 형성하는데 이 물질의 양을 분광광도계를 이용하여 535nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 ATP와 acetate 대신 증류수를 가한 것으로 하였다. Acetate kinase의 1unit은 1μmole의 acetylhydroxamic acid 형성을 촉매하는 효소량으로 정의하였으며 비활성은 단백질 1mg이 나타내는 unit의 수로 표시하였다.

8. ATP 생성계와 NADP 전환 반응계 공액 반응의 표준 반응 혼합액 및 반응 조건

표준 반응 혼합액의 조성은 5mM NAD, 5mM ATP, 5mM acetyl phosphate, 10mM MgCl₂, 100mM NaF, 1mM ZnCl₂, 1mM NaN₃, 100mM phosphate buffer(pH 7.5)로서 각 조성물이 2mℓ 용액에 포함되도록 제조하여 cap tube(70×120mm)에 넣고 37°C에서 가온한 다음 NAD kinase 효소원인 고정화 균체 500mg과 acetate kinase 99mU를 가하여 반응을 개시한다. 반응 시간당 생성된 NADP는 NADPH로 환원하여 340nm에서 그 흡광도를 측정하여 정량 분석하였다.

결과 및 고찰

1. NAD kinase의 효소원 선정

NAD kinase의 활성이 우수한 균주를 선정하기 위해 핵산관련물질 생산균주 4종과 *E. coli* K-12를 NAD kinase 생산균주 선정배지에서 배양하여 효소 활성을 측정한 결과 *B. ammoniagenes* ATCC 6872의 효소 활성이 가장 우수했으므로 실워 균주로 선정하였다 (Table 1).

2. *B. ammoniagenes* 균체의 세포막 투과성 향상

균체에 의한 NADP 전환 반응시 세포막 투과성이 문제점으로 대두되었다. 따라서 막투과성을 향상시키기 위한 여러 처리를 비교한 결과 toluene 처리 후 동결 건조한 균체가 가장 우수한 막투과성을 나타내어 이를 전환 균체원으로 사용하였다 (Table 2).

3. 전환 균체의 고정화 조건 선정

Toluene 처리 후 동결건조한 전환균체의 안정한 효소 활성 유지와 재사용을 위해 Fig. 2와 같은 고정화 담체에 고정화하여 전환반응을 수행하였다. 그 결과 3% *k*-carrageenan이 가장 적합한 담체로 판단되어 이를 고정화 담체로 선정하였다.

4. 고정화 균체의 저장 안정성

4°C, 0.1M phosphate buffer(pH 7.5)에 보관중

Table 1. NAD kinase levels in bacteria strains

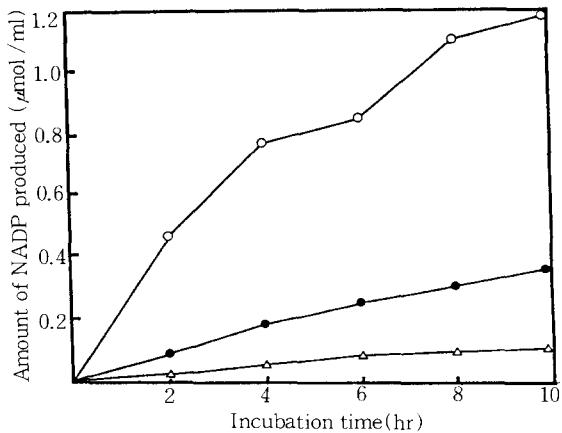
Bacterial strains	Relative activity of NAD kinase*
<i>B. ammoniagenes</i> ATCC 6872	1.00
<i>B. ammoniagenes</i> ATCC 6871	0.53
<i>B. ammoniagenes</i> ATCC 21170	0.65
<i>C. glutamicum</i> ATCC 21171	0.70
<i>E. coli</i> K-12	0.65

* Relative to activity of strain *B. ammoniagenes* ATCC 6872.

Table 2. Preparation of permeabilized cells of *B. ammoniagenes*

Cell preparation	NAD kinase activity of the preparation*	Relative activity(%)
Intact cells	1.7	100
Acetone treated cells	6.0	353
Toluene treated cells	6.3	371
Freeze dried cells	5.1	300
Acetone treated & freeze dried cells	6.8	400
Toluene treated & freeze dried cells	7.6	447

* NAD kinase activity : (μ mole /min) / ml.

**Fig. 2. Conversion of NAD to NADP by NAD kinase immobilized on matrixes.**

○-○ : 3.00% *k*-carrageenan, ●-● : 0.68% calcium alginate, △-△ : 20.00% polyacrylamide.

인 고정화 균체의 NAD kinase 활성을 측정하였다. 그 결과 고정화 균체의 효소 활성은 약 3개월 동안 비교적 안정하게 유지됨을 알 수 있었다(Fig.3).

5. NAD kinase의 효소원인 생균체와 고정화 균체의 온도 및 pH의 영향

1) 온도의 영향

반응 온도의 영향을 알아보기 위해 pH 7.5에서 반응 온도를 20~60°C까지 변화하면서 1시간 동안 효소 반응을 진행하여 검토한 결과 생균체와 고정화 균체 모두 40°C에서 최적 온도를 나타내었으며, 그 이상의 온도에서는 NADP 전환率이 급격히 감소되었다(Fig.4).

2) 온도에 대한 안정성

각 온도에서 2시간 동안 전배양시킨 후 기질 용액과 효소 반응을 1시간 동안 진행시켜 온도에 대한 안정성을 조사하였다. 그 결과 생균체와 고정화 균체 모두

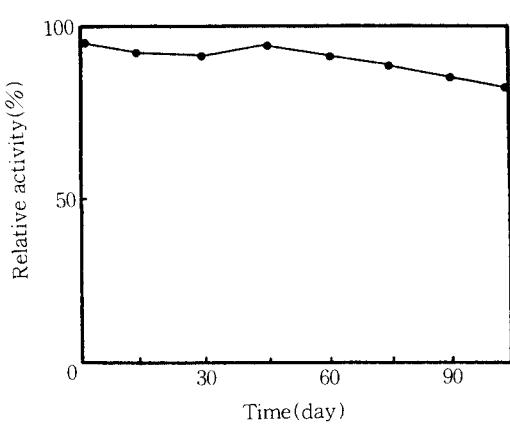


Fig. 3. Storage stability of immobilized *B. ammoniagenes*.

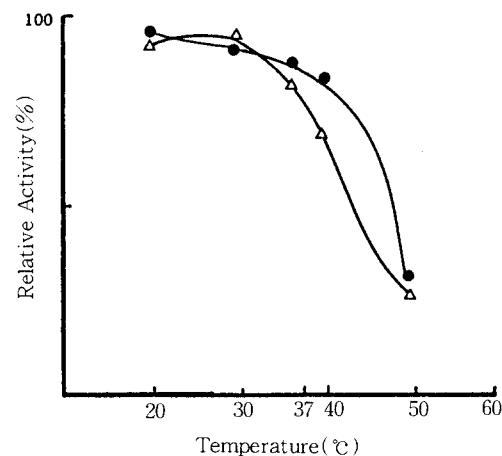


Fig. 5. Temperature stability of NAD kinase.
●—● : Free cells, △—△ : Immobilized cells.

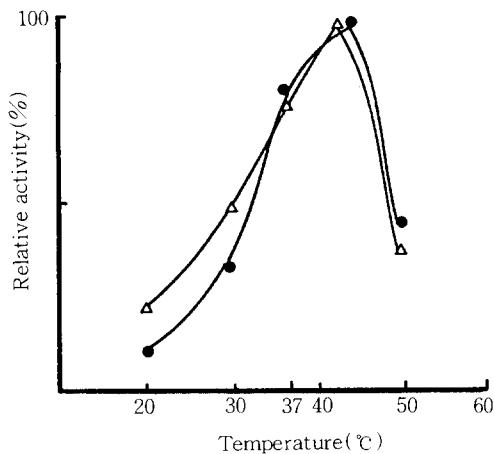


Fig. 4. Temperature activity of NAD kinase.

●—● : Free cells, △—△ : Immobilized cells.

37°C에서 높은 안정성을 나타내었고, 40°C 이상에서는 안정성이 급격히 감소하였다(Fig.5).

3) pH의 영향

반응 pH의 영향을 알아보기 위해 반응 온도 37°C에서 pH를 5~9까지 변화하면서 2시간 동안 효소 반응을 진행한 결과 생균체와 고정화 균체 모두 pH 7.5에서 최적의 pH를 나타내었다(Fig. 6).

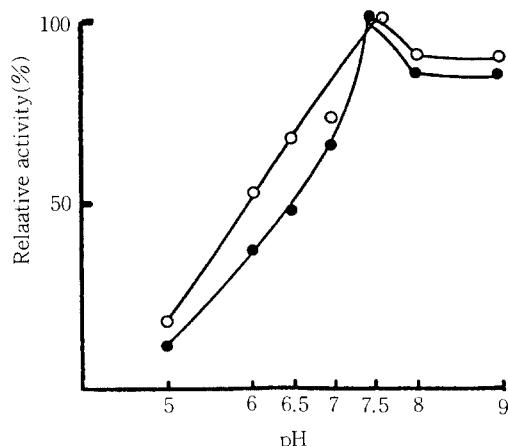


Fig. 6. pH activity of NAD kinase.

●—● : Free cells, ○—○ : Immobilized cells.

6. Acetate kinase의 추출 및 정제

생육의 대수증식기 말에서 집균한 균체로부터 조효소액을 얻기 위해 streptomycin sulfate 침전과 ammonium sulfate 분획 과정을 수행하여 약 2.1배 정제된 조효소액을 얻을 수 있었으며 정제 과정과 효소의 비활성을 Table 3에 나타내었다.

7. 고정화한 전환 균체와 Acetate kinase의 ATP 생성계 공액 반응에 의한 NAD의 NADP로의 전환

1) 공액 전환 반응에 있어서 acetyl phosphate 농도의 영향

공액 전환 반응시 인산기 공여체로 사용되는 acetyl phosphate의 농도의 영향을 조사하기 위해 0mM에서 12mM까지 변화시키면서 전환 반응을 수행한 결과 Fig.7과 같이 10mM에서 가장 높은 전환율을 나타내었으며 12mM에서는 급격히 전환율이 감소함을 나타내었다.

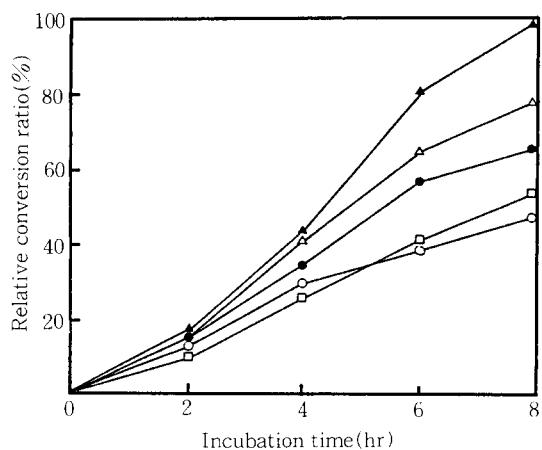


Fig. 7. Effect of acetyl phosphate concentration on the conversion of NAD to NADP.

○—○ : 0 mM, ●—● : 2 mM, △—△ : 7 mM, ▲—▲ : 10 mM, □—□ : 12 mM

2) 공액 전환 반응에 있어서 ADP 농도의 영향

ADP 농도를 0mM에서 12mM까지 변화시키면서 전환 반응을 수행한 결과 5mM에서 가장 높은 전환율을 나타내었고, 그 이상의 농도에서는 전환율이 감소함을 나타내었다(Fig.8).

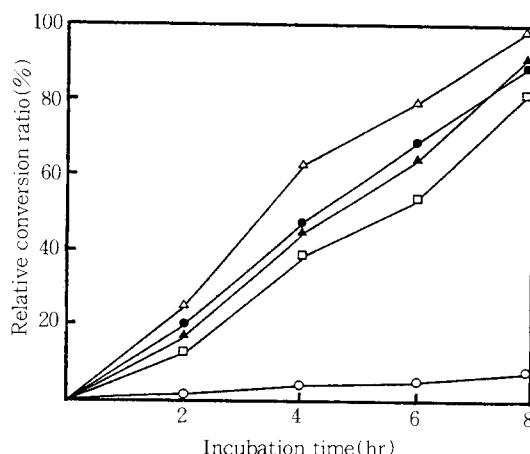


Fig. 8. Effect of ADP concentration on the conversion of NAD to NADP.

○—○ : 0 mM, ●—● : 2 mM, △—△ : 5 mM, ▲—▲ : 10 mM, □—□ : 12 mM
■—■ : 15 mM

3) 공액 전환 반응에 있어서 Mg²⁺ 농도의 영향

공액 전환 반응계의 효소인 NAD kinase와 acetate kinase의 cofactor로 작용하는 Mg²⁺의 농도를 8 mM에서 18 mM까지 변화시키면서 전환 반응을 수행한 결과 10 mM에서 상대적으로 높은 전환율을 나타

Table 3. Purification of acetate kinase from *Escherichia coli*

Purification step	Volume (mℓ)	Total protein (mg)	Specific activity*	Total activity
Cell-free extract	16.5	120.2	0.20	24.5
Streptomycin sulfate precipitation	18.0	70.0	0.30	21.0
Ammonium sulfate precipitation	6.5	37.0	0.42	15.4

* Specific activity : μmole /min /mg protein.

내었으며 그 이상의 농도에서는 전환율이 8 mM에 비해 낮게 나타났다(Fig.9).

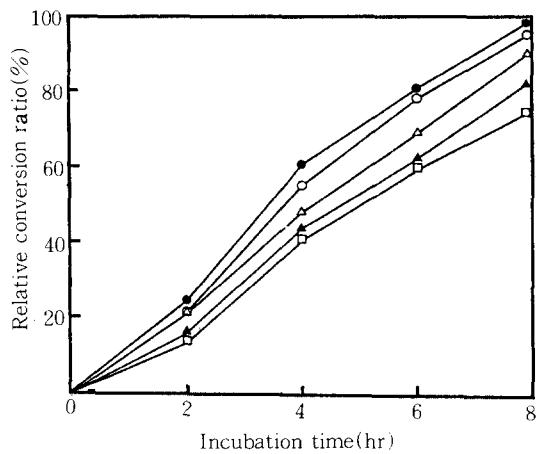


Fig. 9. Effect of Mg^{2+} concentration on the conversion of NAD to NADP.
 ○—○ : 8 mM, ●—● : 10 mM, △—△ : 12 mM,
 ▲—▲ : 14 mM, □—□ : 16 mM
 ▨—▨ : 18 mM

4) 공액 전환 반응에 있어서 phosphate buffer 농도의 영향

공액 전환 반응계에 사용된 phosphate buffer를 0M부터 1M까지 변화시키면서 전환 반응을 수행한 결과 0.2M에서 가장 높은 전환율을 나타내었으며 그 이상의 농도에서는 전환율이 급격히 감소함을 알 수 있었다(Fig.10).

5) 공액 전환 반응에 있어서 pH의 영향

공액 전환 반응계의 반응 pH를 5에서 9까지 변화시키면서 반응을 수행하였다. 그 결과 pH 7에서 9까지 상대적으로 높은 전환율을 나타내었으며 pH 7.5에서 가장 높은 전환율을 나타내었다(Fig.11).

6) 공액 전환 반응계에 있어서 온도의 영향

공액 전환 반응계의 반응 온도를 20°C에서 50°C까지 변화시키면서 2시간 동안 반응을 수행한 결과 40°C에서 가장 높은 전환율을 나타내었으나 각 온도에서 4

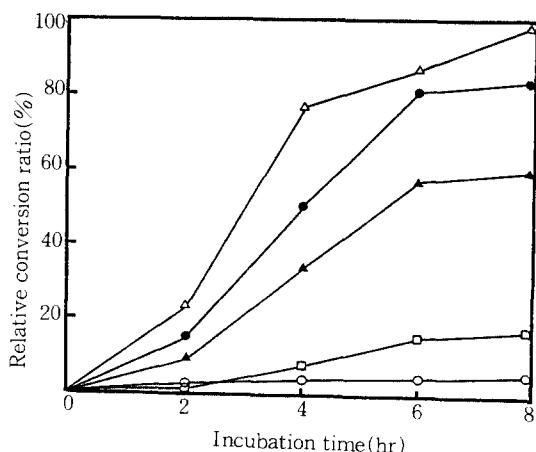


Fig. 10. Effect of sodium phosphate buffer concentration on the conversion of NAD to NADP
 ○—○ : 0M, ●—● : 0.1M, △—△ : 0.2M, ▲—▲ : 0.5M,
 ▨—▨ : 1.0M

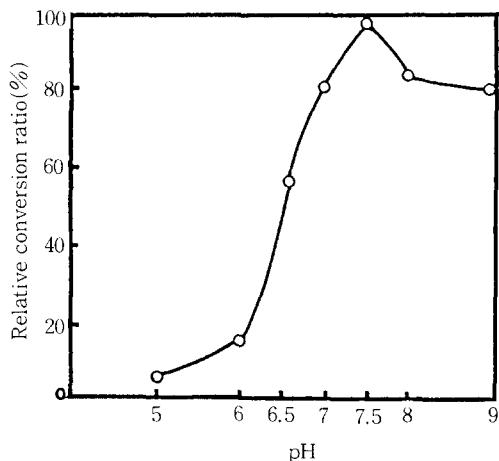


Fig. 11. Effect of pH on the conversion of NAD to NADP.

시간 preincubation 시킨 후 1시간 전환 반응을 수행한 뒤 40°C에 대한 공액 반응계의 안정성이 크게 떨어져 보다 안정한 37°C를 공액 전환 반응의 최적 조건으로 선정하였다(Fig.12).

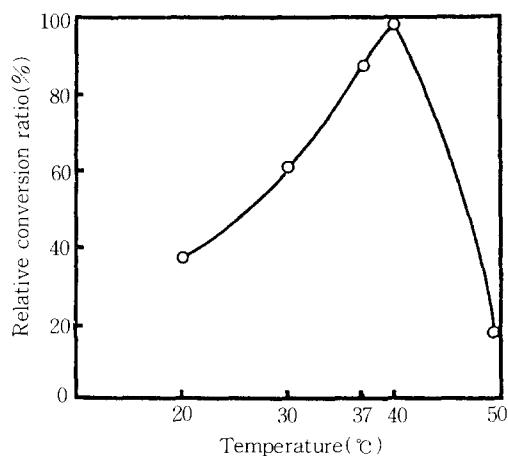


Fig. 12. Effect of temperature on the conversion of NAD to NADP.

8. 공액 전환 반응에 있어서 최적 NAD kinase와 acetate kinase의 농도

1) NAD kinase 효소원인 고정화 균체 농도의 영향

고정화 균체의 농도에 따른 공액 전환 반응의 영향을 조사하기 위해 반응 혼합액내의 고정화 균체의 농도를 250 mg /mℓ, 375 mg /mℓ, 500 mg /mℓ, 625 mg /mℓ로서 변화시켜 반응을 수행하였으며 결과는 Fig.13의 A)와 같이 고정화 균체의 농도가 250 mg /mℓ에서 가장 높은 전환율을 나타내었다.

2) Acetate kinase 농도의 영향

공액 전환 반응에 사용된 고정화 균체와 acetate kinase의 농도의 비율을 정하기 위해 반응 수용액내의 acetate kinase의 농도를 33mUnit에서 99m Unit까지 변화시키면서 반응을 수행하였다. 그 결과 99mUnit에서 다른 농도에 비해 보다 높은 전환율을 나타내었다(Fig.13의 b). 이와 같은 결과로부터 고정화 균체를 250 mg /mℓ 사용할 때에 acetate kinase 농도는 49.3mUnit /mℓ이 적당하였다.

9. 반응 최적 조건에서 NAD의 NADP로의 전환

이상의 실험으로부터 최적화한 반응 혼합액에 NAD

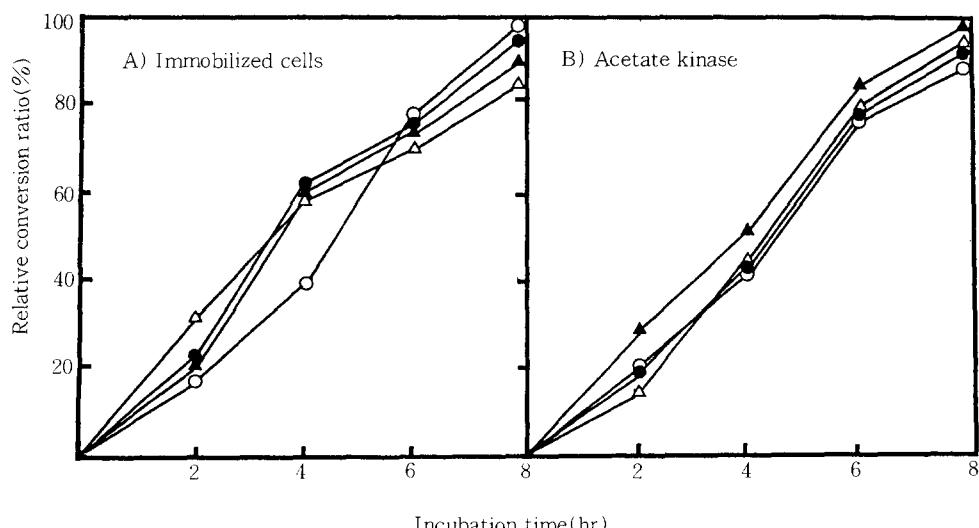


Fig. 13. Effect of concentrations of immobilized cells and acetate kinase on the conversion of NAD to NADP.

A) ○—○ : 0.250 g / ml, ●—● : 0.375 g / ml, ▲—▲ : 0.500 g / ml, △—△ : 0.625 g / ml.

B) ○—○ : 16.5 mU / ml, ●—● : 24.8 mU / ml, △—△ : 33.0 mU / ml, ▲—▲ : 49.5 mU / ml.

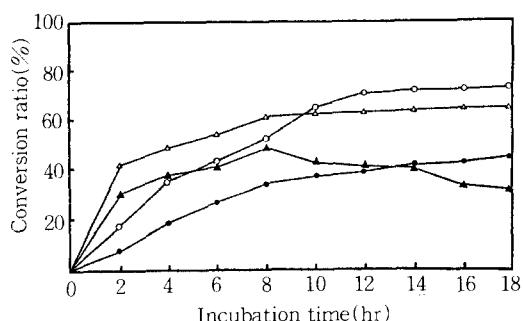


Fig. 14. Conversion of NAD to NADP under optimum conditions.

- : Immobilized cells + Acetate kinase
- △—△ : Free cells + Acetate kinase
- : Immobilized cells + ATP
- ▲—▲ : Free cells + ATP

kinase 250 mg / mℓ 와 acetate kinase 49.5 mg / mℓ 를 가하여 전환 반응을 수행한 결과 Fig.14에서 알 수 있듯이 12시간 반응시 NAD의 약 72%가 NADP로 전환되었다. 한편 생균체로 전환 반응을 한 경우는 8시간만에 약 63%의 전환율을 보였다. 이에 반해 acetate kinase에 의한 ATP 생성계 대신 5 mM 분석용 ATP를 NADP 전환 반응계에 가했을 때는 생균체와 고정화 균체 모두 전환율이 50% 미만으로 낮게 나타났다.

요 악

에너지 요구 반응인 NADP 전환 반응계에 acetate kinase에 의한 ATP 생성계를 도입하여 NAD의 NADP로의 효율적인 전환을 시도하였다. 전환 균체는 세포막 투과성 향상을 위하여 toluene 처리 후 동결건조한 *B. ammoniagenes* cells를 사용하였으며, 전환 균체의 고정화 담체로는 3% *k*-carrageenan을 사용하였다. 한편 ATP 생성계 효소인 acetate kinase는 *E. coli*로부터 추출 정제하여 사용하였다. 전환 반응의 최적 온도 및 pH는 각각 37°C, pH 7.5였다. 또한 10 mM acetyl phosphate, 5 mM ADP, 200 mM inorganic phosphate, 10 mM MgCl₂, 고정화 균체 250 mg / mℓ, acetate kinase 49.5mUnit / mℓ에서 가장 높은 전환율을 나타내었다. 상기 최적 조건하에서

12시간 전환 반응시 5 mM(340 mg / mℓ)NAD가 3.6 mM NADP로 전환되어 약 72%의 전환율을 나타내었다.

참고문헌

1. Kornberg, A. : Enzymatic synthesis of triphosphopyridine nucleotide, *J. Biol. Chem.*, 182, 805(1950)
2. Uchida, J., Kato, J. and Chibata, I. : Continuous production of NADP by immobilized *Achronobacter aceris* cells, *Biotech. Bioeng.*, 20, 255(1978)
3. Tanaka, Y., Hayashi, T. and Tokoyama, T. : Production of NADP by immobilized cell with NAD kinase, *Biotech. Bioeng.*, 24, 859 (1982)
4. Matsushita, S., Yokoyama, S. and Kobayashi, A. : NADP production using thermostable NAD kinase of *Corynebacterium flaccumfaciens* AHV-1662, *Can. J. Micro.*, 32, 585(1986)
5. Khorana, H.G. : *Some Recent Developments in the Chemistry of Phosphate Ester of Biological Interest*, John & Willey, (1961)
6. Tochikura, T. and Kuwahara, M. : Fermentation and Metabolism of Nucleic acid-Related Compound in Yeast, *J. Ferment. Technol.*, 45, 511(1967)
7. Pace, G.W., Yang, H.S., Tanenbaum, S.R. and Archer, M.C. : Photosynthetic Regeneration of ATP Using Bacterial Chromatophores, *Biotech. Bioeng.*, 20, 2987 (1978)
8. Laufer, L. and Guteho, S. : Preparation of 5'-Polyphosphate Nucleotides, U.S. Patent 3, 138, 539(1964)
9. Knowles, A.F. and Racker, E. : Formation of ATP from Pi and ADP by purified Ca²⁺-Adenosine Triphosphatase, *J. Biol.*

- Chem.*, **250**, 1949(1975)
10. Campbell, J. and Chang, T.M.S. : Enzymatic Recycling of Coenzymes by a Multi-Enzyme System Immobilized within Semipermeable Collodion Microcapsules, *Biochim. Biophys. Acta.*, **397**, 101(1975)
 11. Langer, R.S., Hamilton, B.K., Gadner, C.R. and Colton, C.K. : Enzymatic Regeneration of ATP. Part II : Equilibrium Studies with Acetate Kinase and Adenylate Kinase, *ALCHE J.*, **23**, 1(1976)
 12. Fujio, T. and Furuya, A. : Production of ATP from adenine by *Brevibacterium ammoniagenes*, *J. Ferment. Technol.*, **61**, 261 (1983)
 13. Shimosaka, M., Fukuda, Y. and Kimura, A : Application of plasmid to ATP production by *E. coli*, *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 1025(1981)
 14. Murata, K., Kato, J. and Chibata, I. : Continuous production of NADP by immobilized *Brevibacterium ammoniagenes* cells, *Biotech. Bioeng.*, **21**, 887(1979)
 15. Youngsmith, B. and Chutima, K. : Production of Vitamin B₁₂ by living bacterial cells immobilized in calcium alginate gel, *J. Ferment. Technol.*, **61**, 593(1983)
 16. Nishida, Y., Sato, T., Tosa, T. and Chibata, I. : Immobilization of *E. coli* cells having aspartase activity with carrageenan and locust bean gum, *Enzyme Micro. Technol.*, **1**, 95(1979)
 17. Grffith, M.J. and Nishimura, J.S. : Acetate kinase from *Veilonella alcalescens*, *J. Biol. Chem.*, **235**, 442(1979)

(1993년 8월 6일 수리)