抗酸菌의 Amino基 轉移酵素系에 관한 實驗

金成鎮 · 金尙材

(結協 · 中央結核檢査所)

序 論

Amino 基 轉移反應은 一般의 生物에 共通되는 것으로서 生物이 周圍 環境으로 부터 獲得한 Amino 酸을 自體 代謝過程에 必要한 形態의 Amino 酸으로 轉化 利用하는 反應을 말하며 1937 年 Braunstein 과 Kritzmman 等⁽¹⁾이 動物組織에서 처음으로 이러한 反應을 觸媒하는 酵素系를 報告하였다.

微生物에서는 Roine(1947)⁽²⁾이 酵母에서 Lichstein(1945)⁽³⁾이 洗滌한 細菌에서 各各 Amino 基 轉移酵素系를 發見 報告하였고 Feldman 과 Gunsalus(1950)等⁽⁴⁾은 E. Coli 에서 이러한 酵素를 純粹 分離함과 아울러 pyridoxal phosphate 를 prosthetic group 으로 가지고 있다는 事實을 밝혔다.

抗酸菌의 Amino 基 轉移酵素系에 關해서는 Ito(1945)⁽⁵⁾ Kanski(1955)等⁽⁶⁾에 依해서 처음으로 研究되었으며 그 後 Ionesco-mihaiesi(1960)⁽⁷⁾는 特히 INH 및 PAS 耐性菌이 感受性 菌보다 Amino 基 轉移酵素 活性이 高調된다는 事實을 觀察 報告했다.

著者等은 韓國人 結核患者로부터 分離한 藥劑 感受性 人型結核菌, 保存人型結核菌, INH 耐性菌 및 Scotochromogen, 및 M. smegmatis 等의 Glutamic pyruvic Transaminase 와 Glutamic oxaloacetic Transaminase 活性을 比較 觀察한 結果를 報告하는 바이다.

實驗材料 및 方法

使用菌株: 使用菌株로는 抗結核劑 使用 經驗이 全혀 없는 患者로부터 分離된 藥劑 感受性 人型結核菌 2株, 標準 人型結核菌(H₃₇Rv) 1株, INH 耐性 人型結核菌 1株, INH-SM 二者 耐性 結核菌 1株, Scotochromogen 1株 및 M. smegmatis 等 總 7株를 試驗菌으로 供試했다.

酵素液 製造: 上記 試驗菌을 Löwenstein-Jensen 培地上에 四週間 培養한 다음 菌莖를 採取 秤量하여 硝子球가 든 瓶에다 넣고 菌 50mg 當 10% Tween80 1滴을 滴下한 後 磨碎하여 均等化한 다음 滅菌蒸溜水로 數回 遠心分離하여 洗滌한 다음 菌 50mg 當 滅菌 蒸溜水 1ml를 加해 菌液을 만들어 每試驗마다 0.4 ml를 取해서 酵素

液으로 使用하였다.

Glutamic Oxaloacetic Transaminase 基質: Aspartic acid(2.66gr), KH₂PO₄(2gr), 및 α-ketoglutaric acid(0.6gr)를 蒸溜水 40ml에 녹힌 다음 0.1N KOH로 PH 7.4로 修正하여 總量 100ml되게 蒸溜水를 加하여 만들었다. 여기서 Aspartic acid는 Amino 基 供與者로 α-keto 酸은 Amino 基 受容者로 作用하게 된다.

Glutamic Pyruvic Transaminase 基質: Amino 基 供與者로 Alaine(1.78gr)을 使用하는것 外는 GOT 基質 製造法과 同一하다.

Amino 基 轉移酵素 力價測定: GOT 力價 測定은 Umbr-eit(1957)⁽⁸⁾法에 따랐으며 GPT 活性은 Wroblewski(1957)法⁽⁹⁾에 따라 測定되었다.

GOT 活性의 測定은 곧 菌이 生成한 GOT의 觸媒作用으로 基質 Aspartic acid의 amino 基를 α-Ketoglutaric acid 轉移시켜 Glutamic acid와 Oxaloacetic acid가 生成되는 反應을 生産된 Oxaloacetic acid를 定量하여 菌의 酵素力價를 算出했다.

GPT 活性의 測定도 亦是 菌이 生成한 GPT의 觸媒作用으로 基質 alanine의 amino 基를 α-Ketoglutaric acid로 轉移시켜 Glutamic acid와 pyruvic acid가 生成되는 反應을 生成된 pyruvic acid를 定量하여 菌의 酵素力價를 算出했다.

操作過程은 다음과 같다. 먼저 菌懸濁液 0.4ml와 基質 0.6ml를 遠心 分離管에 注入하고 對照管엔 蒸溜水 0.4ml와 基質을 넣어 37 안에서 10時間 동안 作用시킨 다음 Trichloroacetic acid와 Aniline citrate를 各各 加하여 20分間 放置해 두었다가 Dinitrophenylhydrazine을 處理하여 다시 5分間 放置한 後 Toluene을 加해 强하게 振盪한 다음 300rpm으로 10分間 遠心分離하여 Toluene 層을 取해 cuvette에 옮겨 alcoholic KOH Solution으로 發色시켜 分光分析器(Beckman B)로 490mμ에서 optical density를 읽어 酵素活性을 測定하였다.

1菌株에 對해 上記 實驗操作을 10回以上 實施하여 그 平均値로 酵素 活性을 表示했다.

標準化 處理: 위의 實驗을 통해 測定된 optical density

는 標準化 處理에 依해 그려진 calibration curve에 따라 그 酵素 活性의 力價(unit)를 算出하였다.

結果 및 考察

本實驗을 통해 測定된 供試菌의 Amino基 轉移酵素 力價는 表 1, 2에서 보는 바와 같이 菌型別에 따라서 多少의 差가 있음을 알 수 있다.

Table 1 Glutamic Oxalacetic-Transaminase Activities of Mycobacteria

Name of Strains	Optical Density	Units
PR 135	0.090	47
PR 104	0.082	42
H ₃₇ Rv	0.101	53
INH resistant human tubercle bacilli	0.078	40
INH-SM resistant human tubercle bacilli	0.080	41
Runyon Group	0.110	57
M. smegmatis	0.025	12

表 1의 GOT 活性을 보면 人型 結核菌은 藥劑 耐性菌을 包含해서 모두 約 40~50units 이며 Runyon G-Ⅱ 1株는 比較의 力價가 強해 57units 이었고 M. Smegmatis는 12

Table 11 Glutamic Pyruvic-Transaminase Activities of Mycobacteria

Name of Strains	Optical Density	Units
PR 135	0.031	14
PR 104	0.042	18
H ₃₇ Rv	0.046	20
INH resist. TB	0.068	33
INH-SM resist. TB	0.065	32
Runyon Group Ⅱ	0.093	44
M. smegmatis	0.012	7

—Abstract—

STUDIES ON MYCOBACTERIAL TRANSAMINASES

Sung Chin Kim, M.D. & Sang Chie Kim, M.P.H.

(Central TB Laboratory, KNTA)

It is included on present papers that the enzyme activities of Glutamic oxaloacetic(GOT) and Glutamic Pyruvic Transaminase(GPT) were testified with several strains of human tubercle bacilli and other Mycobacteria

units로서 상당히 弱한 便이었다. 人型結核菌의 境遇를 보면 H₃₇Rv株가 分離菌株보다 力價가 多少 높은 傾向을 나타내고 있으나 INH 耐性株와 感性株사이의 差는 有意하다고 볼 수 없다.

表 2의 GPT 活性을 보면 全菌株 共히 GOT 보다 力價가 낮으며 가장 力價가 높은 菌株는 Runyon G-Ⅱ이며 M. smegmatis는 亦是 力價가 낮다. 特히 興味있는 事實은 人型結核菌 中 INH 耐性菌이 感性菌보다 GPT 活性이 훨씬 強하다는 事實이다. 이러한 現象은 Ionesco-Mihaesti(1960)⁽⁷⁾의 實驗結果와 一致하는 事實로서 藥劑의 作用을 받아 耐性을 獲得한 耐性菌이 正常的인 代謝過程을 바꾼다는 事實을 推測할 수 있다.

그리고 M. smegmatis는 GOT, GPT 모두 그活性이 상당히 弱한데 이러한 現象은 그들의 榮養 要求型이 이와 같은 Amino基 轉移反應을 要하지 않는 代謝過程인것 같기도 推測된다.

結 論

數株의 抗酸菌을 材料로 Glutamic Oxaloacetic Transaminase(GOT) 및 Glutamic Pyruvic Transaminase(GPT) 活性을 比較觀察한바 다음과 같은 結論을 얻었다.

患者에서 分離한 藥劑感受性 人型結核菌(PR 135, PR 104) 2菌株의 GOT 活性은 各各 47, 42 units 였고 GPT 活性은 各各 14, 18units 였다.

人型結核菌(H₃₇Rv)의 GOT 活性은 53units 였고 GPT 活性은 20units 였다.

INH 耐性 人型結核菌의 GOT 活性은 40units 였고 GPT 活性은 41units 였다.

INH-SM 耐性 人型結核菌의 GOT 活性은 41units 였고 GPT 活性은 57units 였다

Scotochromogen 1株의 GOT 活性은 57units 였고 GPT 活性은 32units 였다.

M. Smegmatis의 GOT 活性은 12units 였고 GPT 活性은 7units 였다.

(Scotochromogen and M. Smegmatis.).

Calculation of both enzyme activities were conducted with Wroblewski's method (GPT) and Umbreit's method (GOT) in both techniques the formation of oxaloacetic

or Pyruvic acid from L-ketoglutaric acid and aspartic or alanine are catalyzed by the Mycobacterial GOT or GPT. The Oxaloacetic or Pyruvic acid formed are then reacted with dinitrophenylhydrazine to form the colored hydrazones which are measured spectrophotometrically.

Glutamic Oxaloacetic Transaminase activities of the tested strains are following as: Drug sensitive tubercle bacilli isolated from TB patients, 42, 47 units; INH resistant human tubercle bacilli, 40, 41 units; H₃₇Rv 53 units; Scotochromogen (one strain), units; M. smegmatis, 12 units.

Glutamic Pyruvic Transaminase activities of the tested strains are following as: Drug sensitive tubercle bacilli, 14, 18 units; INH resistant tubercle bacilli, 32, 33 units; H₃₇Rv, 20 units; Scotochromogen, 44 units; M. Smegmatis, 7 units.

References:

1. Braunstein, A.E. and Kritzmman, M.G.: *Emzymologia*, 2:129, 1937.
2. Roine, p., thesis, Helsinki: *On the formation of primary Amino acids in protein synthesis in yeast*. 1947.
3. Lichstein, H.C. and Cohen, p.p.: *J. biol. chem.*, 157: 85, 1945.
4. Feldman, L.I. and Gunsalus, I.C.: *J. biol. chem.*, 187: 821, 1950.
5. Ito, F. and Sugano, T.: *Kekkaku*, 29:368, 1954.
6. Kanski, M. et al.: *Chem. Abstr.* 49:11044, 1955.
7. Ionesco-Mihaiesi, et al: *Chem. Abstr.* 54:16545, 1960
8. Umbreit et al.: *J. Lab and Clin. Med.*, 49:454, 1957
9. Wroblewski et al: *Am. J. Clin. Path.*, 27:235, 1957.