

Pseudomonas 屬菌이 生産하는 Alcohol Dehydrogenase 에 관한 研究

(第 1 報) Alcohol Dehydrogenase 精製와 一般의 性質

康順善 · 岡田弘輔*

濟州大學 農化學科, *大阪大學 醱酵工學科

(1980년 2월 22일 수리)

Alcohol Dehydrogenase Active on Furfuryl Alcohol from *Pseudomonas* sp.

(Part 1) Purification and Properties of Alcohol Dehydrogenase

Soon Sean Kang and Hirosake Okada*

Department of Agricultural Chemistry, JeJu University

*Department of Fermentation Technology, Faculty of Engineering, Osaka University.

(Received February 22, 1980)

Abstract

We isolated a strain of *Pseudomonas* sp. from soil to utilize furfuryl alcohol as a carbon source by enrichment culture. Alcohol dehydrogenase from this bacteria was purified 700-fold by Sephadex G-200 and affinity column chromatography to be homogeneous by electrophoresis and analytical centrifugation. This enzyme had a molecular weight of 120,000 and was composed of four subunits consisting of 266 amino acid residues. The optimal pH of the enzyme was pH 8.5 to 9, and the optimal temperature was 45°C. This enzyme was stable at 55°C, but lost 80% of its activity in 10min at 60°C.

서 론

Furfural은 pentosan을 함유한 전분물질을 가수 분해할때 생기는 부산물로서 天然原料를 이용한 醱酵生産에는 널리 존재한다¹⁻²⁾. Furfuryl alcohol, furfural 산에 微生物變換은 일부 연구되고 있으나³⁻⁴⁾, 微生物에 의한 furan環 開裂에 관한 연구보고는 전혀 찾아 볼수 없다.

저자는 heterocyclic 물질의 微生物의 利用을 상세히 검토하기 위해서 토양중에서 *Cephalosporium*屬을 분리하여 단일 炭素源으로 furfuryl alcohol을 한 medium에 증식시켜 유도된 alcohol dehydrogenase (ADH)에 관심을 갖고, 본균주의 furfuryl alcohol 代謝⁵⁾와 酵素精製⁶⁾ 및 酵素的性質

에 대하여 보고 한바 있다.

본 연구는 furfuryl alcohol를 炭素源으로 하여 증식하는 細菌에서 *Pseudomonas* 속을 새로 분리 검색하여 유도된 ADH 精製 및 酵素的性質에 대하여 실험하였으므로 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 使用培地

분리용 배지는 3 ml furfuryl alcohol, 0.5 g NH₄NO₃, 2g KH₂PO₄, 3g K₂HPO₄, 0.1g MgSO₄ 7H₂O 0.2g yeast extract, 1 l 물로 하여 furfuryl alcohol을 자화할 수 있는 細菌을 분리하였다. 배양용 배지는 분리용배지에 10g/l pepton을 첨가하여 사용하였다.

2. 測定法

菌體量과 蛋白質濃度는 光電比色計(Hitachi 101 '220)를 사용하여 600 nm 와 280 nm 의 吸光度를 측정하고, furfuryl alcohol 농도는 diphenyl amine 을 이용한 방법⁸⁾으로 하였다.

3. ADH의 活性 測定法

酵素活性는 NADH 생성에 의하여 판단했다. 효소반응은 30°C 에서 행하고 spectro photometer (Hitachi 124)를 이용하여 흡광도 370 nm 에서 측정하였다. 반응액은 50 mM Tris-HCl 완충액 3 ml (pH8.5), 0.1 mM NAD, 1% furfuryl alcohol 로 하고 0.2 ml 효소를 첨가하므로써 반응을 시작했다.

4. 材料

Chromatography 와 electrophoresis 에 의한 分子量測定用 標準蛋白質은 Boeringer-Manhaim 제품을 Sephadex G-25 와 G-200, DEAE-sephadex, blue-sepharose CL-6B 는 Pharmacia 제품을 사용하였다. Furfuryl alcohol 과 furfural 는 사용전에 증류하였고, NAD 와 NADH 는 oriental yeast 제품이다.

結果

1. 菌株의 分離

토양시료를 分離用培地에서 배양시켜 細菌이 成長하는 시험관을 선택 3~4 회 enrichment culture 하여 furfuryl alcohol 자화세균을 분리하였다. 자화의 정도는 furfuryl alcohol 의 감소를 측정하여 이중에 가장 성장이 우수한 균주를 선발하여 본 실험의 사용균주로 하였다.

2. 菌株의 同定

토양에서 분리한 세균의 형태학적 성질을 조사한 결과는 다음과 같다.

- (1) Single straight rod
- (2) Gram negative
- (3) Motile by polar flagella
- (4) Grew aerobically
- (5) Produced yell owish-green water soluble pigment with fluorescence in solid medium

이상의 결과에서 Bergey's manual⁹⁾에 의거 *Pseu-*

domonas 속으로 同定했다.

3. 酵素의 精製

정제조작은 5°C 에서 실시했다.

1) 粗酵素調製

斜面培養에서 1 백금이를 培養用培地 100 ml 를 함유한 500 ml conical flask 에 접종하여 30°C 에서 24시간 진탕배양한 것을 種培養으로 하였다. 다음에 1l 의 배양용배지를 함유한 3l Sakaguchi flask (2개)에 10ml 의 種培養을 접종하여 첨가된 furfuryl alcohol 이 전부 소비된 때 (24~30시간) 균체를 수확하였다. 10% glycerol 과 0.1% β -mercaptoethanol 을 함유한 20 mM-potassium phosphate, 완충용액으로 2 번 씻고 30 ml 의 완충용액에 현탁했다. 이 세포현탁액을 French press (Ohtake 400 kg/cm²)로 파쇄하여 원심분리 (15,000 rpm/20min) 하였다. 이때 얻은 고형물질을 완충액으로 현탁하여 초음파 파쇄장치 (Kaijo Denki)로 20 Kc/5분간 처리한후 양쪽 상층액을 합쳐 50,000 rpm/60분간 ultracentrifuge(Hitachisop)하여 얻은 상층액 (40 ml) 를 조효소로 이용했다.

2) Sephadex G-200 column chromatography

조효소 (20 ml) 를 완충액으로 평형화한 Sephadex G-200 column 에 흡착시켜 동일완충액으로 용출 (6 ml/hr) 하여 분획 (각 5 ml) 하였다. 5 ml 적 fraction collector 에서 분획하여 活性부분을 모았다 (Fig. 1).

활성분획부분 (fraction No. 51~57) 을 ultramembrane filter (Toyo UK5)에서 5 ml 로 농축하여 위와

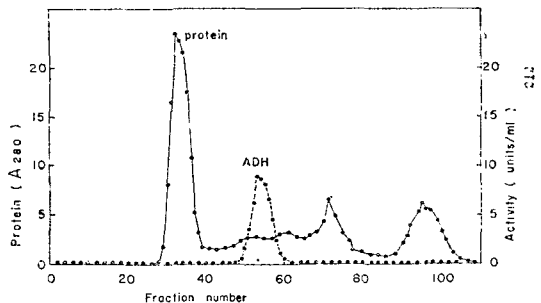


Fig. 1. Sephadex G-002 Column Chromatography.

Twenty ml of the crude enzyme were applied on the column (ϕ 2.8 \times 52 cm), eluted with the buffer at flow rate 6 ml/hr, and fractions of 5 ml were collected.

같은 방법으로 Sephadex G-200 column chromatography를 되풀이 했다.

(3) Affinity chromatography

위의 농축효소액 (10 ml)을 blue-sepharose L-6B가 충전하여 평형화된 column ($\phi \times 13$ cm)에 흡착시켜 affinity chromatography를 행하였다. 농축효소액을 흡착시킨후 비흡착된 단백질 부분을 제거하기 위하여 완충액으로 용출시킨후 0.1mM NAD가 함유된 완충액으로 용출시켜 활성부분이 거의 용출될 때까지 실시한다. 다음에 2M KCl 용액으로 용출시켰으나 비활성부분만이 용출된다 (Fig. 2).

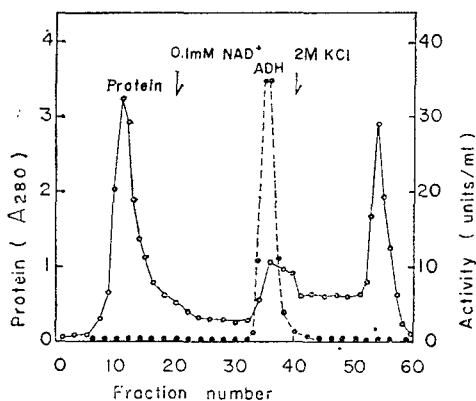


Fig. 2. Blue Sepharose CL-6B Column Chromatography.

Ten ml of enzyme solution obtained in previous experiment were charged on blue sepharose CL-6B column ($\phi 2 \times 13$ cm), eluted with the buffer (60 ml), the buffer containing 1 mM NAD (60 ml), and 2 M KCL (60 ml) at a flow rate 30 ml/hr, and fractions of 3 ml were collected.

활성부분효소액을 membrane filter에서 5ml로 농축시켜 Sephadex G-25 column을 통과시켜 NAD를 제거한 것을 정제효소로하여 실험에 이용했다. ADH의 정제정도는 700 배이며 수율은 48%이었다 (Table. 1).

4. 酵素의 純度 確認

Sephadex G-200 column chromatography와 affinity chromatography에서 얻은 효소는 single peak만을 형성하고 단백질 peak와 잘 일치되고 있다.

이상에서 정제된 효소를 Davis 방법¹⁰⁾에 따라 pH 9와 pH 8에서 polyacrylamide gel (7.5%) disk

Table 1. Purification of Alcohol Dehydrogenase.

	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Activity recovery (%)
Crude enzyme	2350	200	0.085	100
Sephadex G-200	108	148	2.3	74
Blue sepharose CL-6B	1.62	96	59	48

electrophoresis를 이용하여 분석한 결과 single band만이 나타났다 (Fig. 3A).

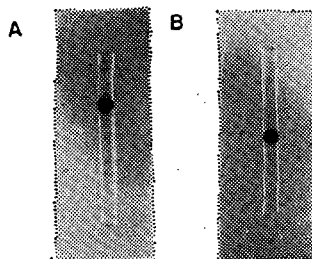


Fig. 3. Polyacrylamide Gel Disc Electrophoresis at pH 8.0 (A) and SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis (B).

Thirty μ g of protein in (A) and 2 μ g of protein in (B) were charged, and were stained with amidoblack and were stained with amidoblack and coomassie brilliant blue, respectively after electrophoresis.

또한 Weber 및 Osborn 방법¹¹⁾에 따라 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS)가 함유된 gel의 電氣泳動한 결과에서도 single protein band가 나타났다 (Fig. 3B).

沈降分析에 의한 schlieren patterns는 symmetrical movement이다 (Fig. 4). Sedimentation constant (S 20)는 7.6S로 계산되었다.

이상의 실험에서 본 효소는 단일단백질로 정제된 것을 확인하였다.

5. 分子量 決定

분자량측정은 Sephadex G-200 column chromatography¹²⁾를 이용하여 측정하였다. 標準蛋白質 catalase (MW: 240,000), aldolase (158,000), bovine serum albumin (67,000), hen egg albumin (45,000),

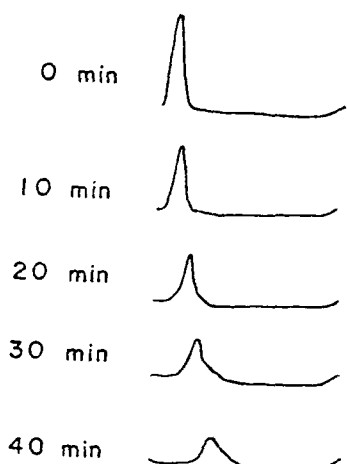


Fig. 4. Schlieren Pattern of Alcohol Dehydrogenase.

Purified enzyme was passed through Sephadex G-25 column to exchange the buffer to 50 mM potassium phosphate buffer pH 6.7. This enzyme solution (2 mg/ml) was centrifuged at 44,000 rpm at 25°C. Time in Fig. 4 showed time after attained the above rotor speed. This work was done at Inst. Protein Res.

chymotrypsinogen (25,000), cytochrome-C (12,500) 을 사용하였다.

이 표준단백질은 평형화된 Sephadex G-200 column 에 흡착시켜 같은 완충액으로 용출한 용량으로부터 분자량 환산선을 작성한 다음, 본효소

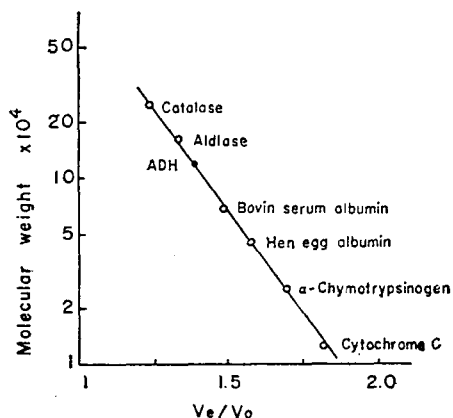


Fig. 5. Molecular Weight Determination by Sephadex G-200 Column Chromatography.

The column ($\phi 1.5 \times 90$ cm) was calibrated with standard proteins at a flow rate 3.6 ml/hr.

(ADH)의 용출을 검토하여 분자량이 대략 120,000 으로 추산되었다(Fig. 5). 효소의 subunit, 분자량은 SDS polyacrylamide gel electro phoresis¹⁰⁾로 측정했다.

標準蛋白質 RNA polymerase (β' , β 및 α 는 각각 MW 165,000, 150,000 및 39,000) bovine serum albumin (68,000), catalase (60,000), trypsin inhibitor (21,500)을 사용하였다(Fig. 6)

Subunit 분자량은 30,000으로 추산되어 본 ADH 는 동일한 4개의 subunit 로 구성된 것으로 추정 된다.

Table 2. Amino Acid Composition of Alcohol Dehydrogenase.

Amino acid	g/100g. protein	No. of residues /mole	Amino acid	g/100g. protein	No. of residues /mole
Cysteine	0.42	2	Isoleucine	2.94	13
Aspartic acid	6.28	28	Leucine	4.69	21
Threonine	2.18	11	Tyrosine	1.76	6
Serine	1.72	10	Phenylalanine	2.14	8
Glutamic acid	6.21	25	Tryptophan	0.59	2
Proline	1.91	10	Lysine	4.16	17
Glycine	3.99	31	Histidine	1.23	5
Alanine	5.16	34	Ammonia	0.68	23
Valine	5.44	28	Arginine	3.08	10
Methionine	1.22	5	Total		266

Total amino acid residues were 266 and its molecular weight was calculated to be 29,000. Purified enzyme was passed through Sephadex G-25 to remove the buffer, was lyophilized, was hydrolyzed by 4N-methane sulfonate at 110°C for 24 hr, and was subjected to amino acid analyzer (Hitachi 50). This work was done at the Inst. of Protein Research.

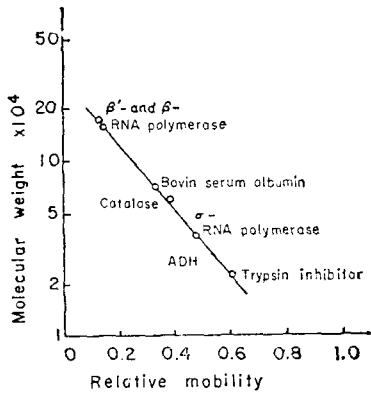


Fig. 6. Molecular Weight Determination by SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis.

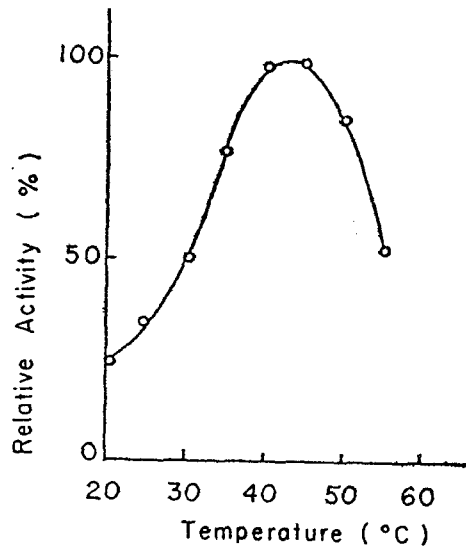


Fig. 8. Effect of Incubation Temperature on the Enzyme Activity.

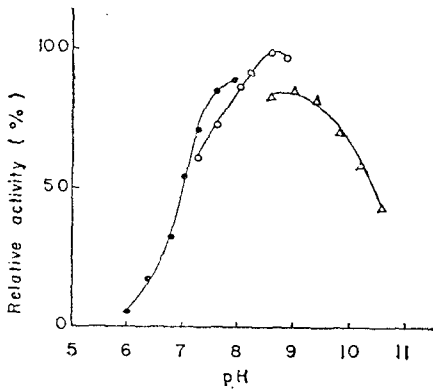


Fig. 7. Effect of Incubation pH on the Enzyme Activity.

The enzyme was incubated in different pH of buffers such as 0.2M potassium phosphate(O), 0.1 M Tris-HCl (O), and 0.2 M glycine NaOH (Δ).

6. Amino 산 分析

凍結시킨 효소를 4 N-methane sulfate 로 24시간 110°C 에서 가수분해 한 다음 amino acid analyzer (Hitachi 50) 로 분석했다. amino 산 조성은 Table 2 와 같다. 본 효소는 266 amino 산 residues 로 구성되고 있으며 이수치에서 subunit MW 는 29,000 으로 추산된다.

7. 酵素의 性質

최적 pH 는 8.5~9.0 범위에서 최대의 활성을

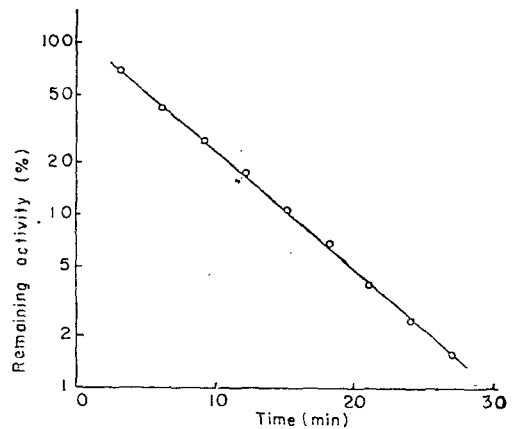


Fig. 9. Heat Inactivation of the Enzyme at 60°C.

나타내고(Fig. 7), 최적온도는 45°C 이다(Fig. 8). Arrhenius plot 를 한 결과에서 活性 energy 는 14 kcal/mol 로 계산되었다. 본효소는 55°C 에서 10분 간 안전성이 있으나 60°C 에서 熱失活을 보면(Fig. 9) 활성의 반이 5분 이내에 失活하고, 15分內에 90%의 失活이 된다. 본효소는 5°C 에서 1 주동안은 10~20 %만이 失活하였다.

考 察

전보^{5,6)}에서 토양으로부터 분리한 furfuryl alco-

hol 자화성균인 *Cepharosporium* sp. 가 생산하는 ADH를 硫安沈澱, Sephadex G-200 및 DEAE-cellulose column을 이용하여 정제한 결과 比活性이 粗酵素보다 약 24 배의 精製效果和 收率 0.5%에 불과했으나, 本酵素를 정제하는데 affinity chromatography column을 이용한 결과 700배의 精製效果和 48%의 收率 효과가 있었다. 精製된 酵素는 電氣泳動上, 沈降分析에서 純粹蛋白質로 나타났으며, Andrews의 gel filtration 법에 의한 정제된 ADH의 분자량은 12×10^4 정도이고, subunit의 M.W는 3×10^4 정도로 측정되어 본 효소는 tetramer로 판단된다. Horse liver의 ADH는 분자량 39,500¹³⁾의 dimer이며 효모에서 정제한 ADH는 분자량 375,000의 tetramer¹⁴⁾에 비교하여 분자량이 적은 편이다.

ADH의 분자량 크기에 따른 基質特異성과 給源이 다른 ADH의 類似酵素로서의 관련성에 대하여 分子進化論의 推論은 금후에 흥미있는 연구대상이 다.

要 約

本 實驗에서 얻은 成果를 要約하면 다음과 같다.

① Furfuryl alcohol를 單一炭素源으로 利用하여 ADH를 生産하는 細菌을 토양중에서 분리하고, 菌學的 性質에 따라 *Pseudomonas* sp.라 同定하였다.

② 本酵素는 disc 電氣泳動的, SDS 電氣泳動的, 超遠心沈降的, 分析에서 完全히 均一하였다.

③ 本 酵素의 沈降係數는 7.6 S, 反應最適活性 pH는 8.5~9.0에 위치하였으며, 最適活性溫度는 45°C 이었다.

④ 4개의 동일 subunit (M.W 30,000)가 會合하여 本 活性酵素를 형성하는 tetramer이며, 分子量은 개략 120,000이다.

⑤ 本 酵素의 subunit 1分子는 266개의 amino 산 residues로 구성되고 있다.

謝 意

이 연구를 수행함에 있어 시종 지도해주신 大阪大學 醱酵工學科 岡田弘輔 教授에게 감사드리며 아울러 amino 산 組成 및 超遠心分析에 協助해주신 大阪大學 蛋白質研究所 관계연구원 여러분께 심심한 감사를 드립니다.

이 研究는 1979년도 문교부 연구 조성비로서 실험한 결과이다.

參 考 文 獻

- Morimoto, S.: J. Ferment. Technol., **44**, 467 (1966).
- Kayahara, K., Taguchi, T., Aoyagi, N. and Miyachi, N.: J. Ferment. technol., **44**, 120 (1966).
- Neuberg, C., Lustig, H. and Dressel R.: Arch. Biochem., **19**, 163 (1948).
- Morimoto, S: J. Ferment. Technol., **45**, 442 (1967).
- Kang, S.S., Kinoshita, S., Takada, N., Okada, H.: J. Ferment. Technol., **51**, 111 (1973).
- Kang, S.S., Okada, H.: J. Ferment. Technol., **51**, 118 (1973).
- Kang, S.S., Okada, H.: J. Ferment. Technol., **51**, 151 (1973).
- Burton, K.: Biochem. J., **62**, 315 (1956).
- Buchnan, R.E., Gibbons, N.E.: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th Ed., P.217, The williams and wilkins Co. (1974).
- Davis, B.J.: Ann N.Y. Acad. Sci., **121**, 405 (1965).
- Weber, K., Osborn, M.: J. Biol. Chem., **244**, 4406 (1969).
- Andrew, P.: Biochem. J., **96**, 596 (1965).
- Jörnvall, H.: Eur. J. Biochem., **16**, 25 (1970).
- Jörnvall, H.: Eur. J. Biochem., **72**, 425 (1977).