

*Escherichia coli*에서 발현된 Recombinant *Bacillus pasteurii* Urease의 정제 및 효소학적 특성

이은탁·김상달*
영남대학교 응용미생물학과

Purification and Enzymatic Characteristics of the *Bacillus pasteurii* Urease Expressed in *Escherichia coli*

Lee, Eun-Tag and Sang-Dal Kim*

Department of Applied Microbiology, Yeungnam University, Gyongsan 712-749, Korea

Abstract — The gene coding for urease of alkalophilic *Bacillus pasteurii* had been cloned in *Escherichia coli* previously. The urease protein was purified 63.1-fold by TEAE-cellulose, DEAE-Sephadex A-50, Sephadex G-150 and Sephadex G-200 chromatographies with a 7.3% yield from the sonicated fluid of the *E. coli* HB101(pBU11) encoding *B. pasteurii* urease gene. The ureases of *E. coli* (pBU11) and *B. pasteurii* possessed a K_m for urea, 42.1 mM and 40.4 mM, respectively. They hydrolyzed urea with V_{max} of 86.9 $\mu\text{mol}/\text{min}$ and 160 $\mu\text{mol}/\text{min}$, respectively. Both ureases were composed with four subunits (Mrs 67,000) and a subunit (Mr 20,000). The molecular weight of both native enzymes was $\text{Mr } 280,000 \pm 10,000$ determined by gel filtration chromatography and Coomassie blue staining of the subunits. The optimal reaction pH of both ureases were pH 7.5. The ureases were stable in pH 5.5~10.5. The optimal reaction temperature of both ureases were 60°C, and the ureases were stable for an hour at 50°C, 40min at 60°C and 10 min at 70°C. The activity of both enzymes were inhibited completely by Ag^{2+} , Hg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , and were inhibited 60% by Co^{2+} , 30% by Fe^{2+} and 10% by Pb^{2+} . However it was increased by the addition of Sn^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} at concentration of 1×10^{-3} M. Both ureases were inhibited completely by ρ -CMB and aceto-hydroxamic acid. The urease expressed in *E. coli* (pBU11) was inhibited 70% by SDS. The urease of *B. pasteurii* was inhibited 40% by hydroxyurea, whereas the recombinant urease of *E. coli* strain was inhibited 17%. Both enzymes were not inhibited by cyclohexanediaminetetraacetic acid (CDTA) and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA).

Urease(EC 3.5.1.5)는 urea를 ammonia와 CO₂로 가수분해하는 효소로써 미생물이나 동물, 특히 초식 동물의 질소대사와 영양에 아주 중요한 역할(1-5)을 하며 Sumner에 의해 효소중에서 가장 먼저 결정화된 역사적 의의가 큰 효소로 알려져 있으며 여러 미생물에 의해 다양하게 생산되고 있다(6, 7).

Urease는 경제적 유익성과 질병원인이 되는 유해성의 양면성을 가지는 효소로써 그 연구의 필요성이 아주 크나 지금까지는 그 중요성에 비해 구체적인

연구가 많이 이루어져 있지 않다. 더욱이 세균중에서 호알칼리성 세균이며 가장 강력한 urease 생산균주로 알려진 *Bacillus pasteurii*의 urease에 대한 효소학적 특성연구는 Larson 등(8)과 Wiley 등(9)의 연구 이외에는 거의 이루어지지 않았으며, 최근에 Christians 등(10)이 행한 nickel 함유 조사와 그 효소 정제에 관한 연구가 있었을 뿐이다. 그러므로 본 연구에서는 *B. pasteurii*의 urease gene을 pBR322의 HindIII site로 옮겨 *E. coli*내에서 발현시킨 바 있는 (11) *E. coli* HB101(pBU11)에서 생산된 recombinant urease를 정제하여 그 효소학적 특성과 분자량을 조사하고자 하였다. 한편 *Bacillus*의 고온성 amylase

Key words: *Bacillus pasteurii*, *Escherichia coli*, urease gene, pBU11

*Corresponding author

가 *E. coli*내에서 발현될 때 온도저항성의 변화가 있다는 보고(28) 등을 미루어 볼 때 호알카리성 *B. pasteurii*의 urease gene이 *E. coli*내에서 발현될 때 일어날 수 있는 효소특성의 변화여부를 알고자 하였으며, 이미 보고(11)한 native polyacrylamide gel electrophoresis의 gel상에서 관찰된 *B. pasteurii* urease와 recombinant urease의 band 차이를 확인하기 위하여 gene donor인 *B. pasteurii*의 urease와 cloning된 *E. coli*(pBU11)에서 발현된 *Bacillus*성 recombinant urease의 효소학적 특성을 비교조사하고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주

본 연구에 사용한 urease 생산균주는 *Bacillus pasteurii* ATCC 11859와 *B. pasteurii*의 10.5 kb의 urease gene library를 pBR322 plasmid로 cloning하여 *Escherichia coli* HB101내에서 발현시킨 균주 *E. coli* HB101(pBU11)을 사용하였다.

배지조성 및 배양

계대배양 및 효소생성용 배지로는 *E. coli*(pBU11)의 경우 nutrient broth에 50 µg/ml의 ampicillin을 함유시킨 배지를 이용하였고, *B. pasteurii*는 nutrient broth에 0.1% peptone, 0.1% yeast extract와 2% urea를 가하고 pH 9.0으로 조정한 후 사용하였다(8, 9). Ampicillin과 urea는 filtration시킨 후 살균한 배지에 첨가하였다. *B. pasteurii*는 30°C에서, *E. coli*(pBU11)은 37°C에서 160 rpm으로 3일간 진탕배양하였다.

조효소액 제조

*Bacillus pasteurii*의 urease는 배양액의 원심상등액에 50% 포화도가 되게 ammonium sulfate를 용해시켜 효소단백질을 침전시키고, *E. coli*(pBU11)에서 발현된 recombinant urease는 nutrient broth에서 배양된 균체를 1/15 M phosphate buffer(pH 7.5)로 3번 세척한 후 다시 현탁시켜 sonication시켰다. 이때 sonication은 Christians 등(10)의 방법에 따라 60 W, 1 min/ml로 4°C에서 행하였다. 균체 파쇄액의 원심 분리 상등액에 62.5% 포화도가 되게 ammonium sulfate를 용해 침전시켜 얻은 효소단백을 4°C에서 회수하였으며, 이를 1시간마다 5배 희석한 1/15 M phosphate buffer로 투석하였다.

Urease들의 정제

Escherichia coli HB101(pBU11)에서 발현된 recombinant urease는 균체 파쇄액의 ammonium sulfate 분별침전물로부터 TEAE-cellulose, DEAE-Sephadex A-50 등 이온교환 chromatography 및 Sephadex G-150과 Sephadex G-200으로 gel filtration하여 정제하였다. *B. pasteurii*의 urease 경우는 DEAE-Sephadex A-50, QAE-Sephadex A-50 및 Sephadex G-200 등을 사용하였다. 각 단계를 거칠때마다 활성부위만을 모아 투석용 cellulose tube에 넣은 다음 polyvinylpyrrolidone(MW : 360,000)으로 4°C에서 탈수 농축하였다.

Urease 활성도 측정

Urease의 활성도는 0.5 M urea를 기질로 하여 가수분해되어 생성되는 NH₃ 양을 Nessler's methods (12)로 발색시켜 425 nm에서 그 흡광도를 측정된 후 NH₄Cl로 작성한 calibration curve로 환산하여 구하였다.

Urease activity의 1 unit(U)는 urea를 기질로 60°C에서 1시간 반응 후 1 µmol의 NH₃를 생성하는 효소의 양으로 환산하여 나타내었다.

Polyacrylamide gel electrophoresis

정제된 효소단백들의 polyacrylamide gel electrophoresis는 Davis법(13)에 의해 7.5% polyacrylamide gel을 이용하여 tube당 5 mA로 90분 동안 전기영동하였다.

분자량 측정

Native 상태의 두 urease 분자량은 Andrew법(14)에 의해 Sephadex G-150(1×100 cm)을 이용하여 gel filtration으로 조사하였다. 이때 유속은 1 drop/20초이었으며 튜브당 3 ml씩 분획하였다. Subunit의 크기를 조사하기 위해서는 sodium dodecyl sulfate(SDS)-polyacrylamide electrophoresis로 분자량을 측정하였다. 방법은 Weber & Osborn법(15)에 의해 실시하였다.

결과 및 고찰

Urease들의 정제

Escherichia coli HB101(pBU11)내에서 발현된 *Bacillus pasteurii*의 urease는 TEAE-cellulose column

Table 1. Purification of the recombinant urease from *E. coli* HB101(pBU11)

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Cell sonicate	14,434.3	93,407.9	6.5	100	1.0
(NH ₄) ₂ SO ₄ (40-62.5%)	6,421.1	73,361.5	11.4	78.5	1.8
TEAE-cellulose	401.5	18,050.3	45.0	19.3	7.0
Sephadex G-200	91.1	13,617.3	149.5	14.6	23.1
DEAE-Sephadex A-50	44.3	11,086.0	250.5	11.9	38.7
Sephadex G-150(1st)	30.5	9,971.7	327.4	10.7	50.6
Sephadex G-150(2nd)	16.8	6,837.9	408.2	7.3	63.1

Table 2. Purification of urease from *Bacillus pasteurii*

Purification step	Total protein (mg)	Specific activity (unit/mg)
Culture filtrate	4,280	18.2
(NH ₄) ₂ SO ₄ (35-50%)	1,652	28.2
QAE-Sephadex A-50	368	925.2
DEAE-Sephadex A-50	185	1,238
Sephadex G-200	35	1,502
Sephadex G-150	19	3,371

chromatography(2.2×60 cm), Sephadex G-200 column gel filtration(2.2×60 cm), DEAE-Sephadex A-50 column chromatography(2.2×60 cm), 1차 Sephadex G-150 column gel filtration(2.2×60 cm), 2차 Sephadex G-150 column gel filtration(1×80 cm)를 통하여 순차적으로 정제한 결과 urease 이외의 단백을 모두 제거할 수 있었으며 좌우대칭의 urease 단백질의 단일 peak를 최종적으로 얻을 수 있었다(Table 1). Donor인 *Bacillus pasteurii*의 urease는 배양여액을 ammonium sulfate precipitation, QAE-Sephadex A-50 column chromatography(2.2×60 cm), Sephadex G-150 column gel filtration(2.2×60 cm) 등을 거쳐 정제할 수 있었다(Table 2).

Urease 정제에 관한 보고중에는 Hausinger(16)가 *Selenomonas ruminantium*의 urease를 specific activity가 592배까지 되게 정제하였고, Mulrooney 등(17)은 *E. coli*에 cloning시킨 *Providencia stuartii*성 urease를 331배까지 정제한 우수한 예가 있으나 본 실험에서는 *E. coli*에 cloning된 *B. pasteurii*성 recombinant urease를 63.1배까지 정제할 수 있었다. *B. pasteurii*와 *E. coli*(pBU11)로부터 정제된 두 urease의 효소단백은 disc gel electrophoresis에서 단일 밴드로

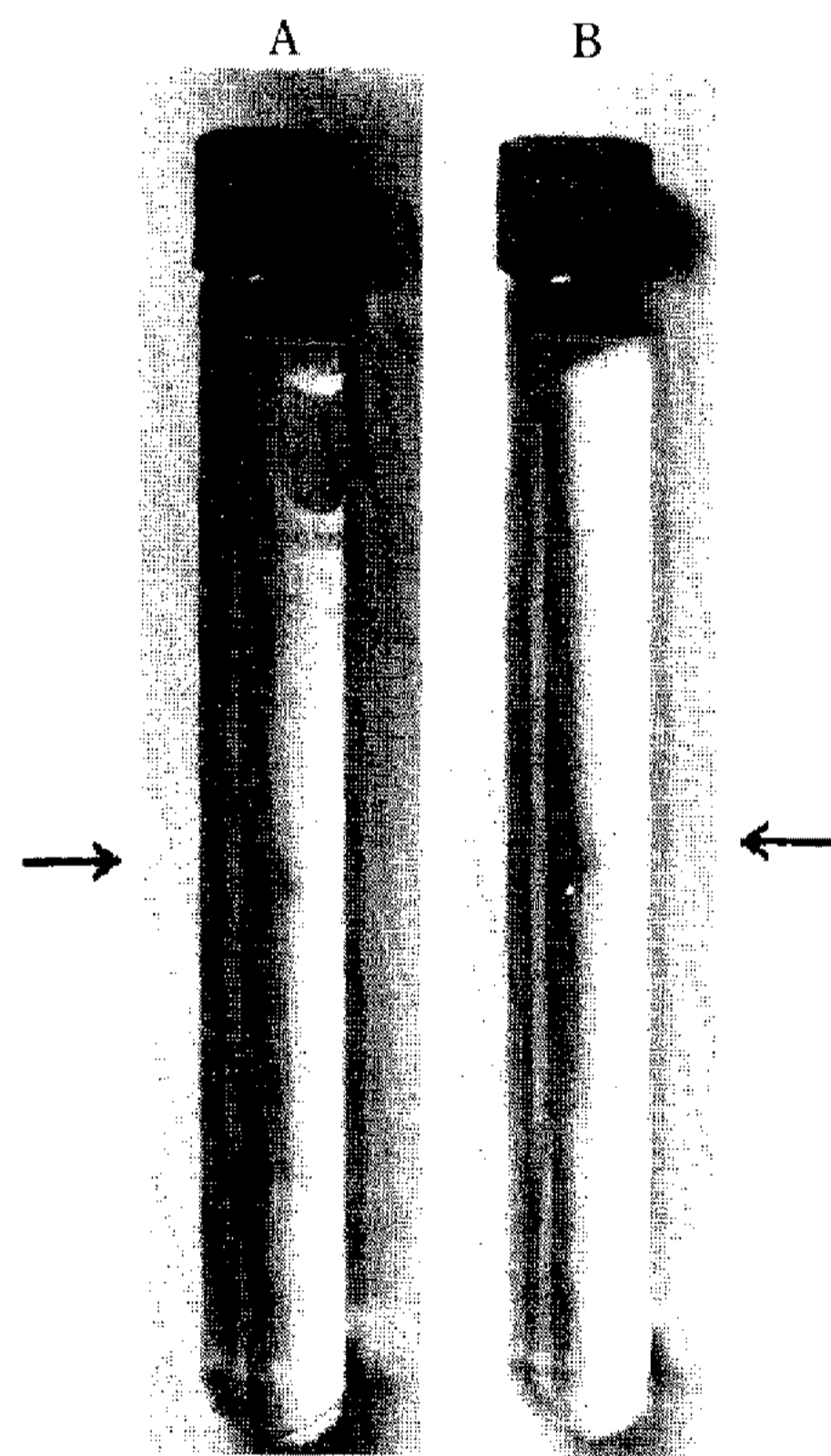


Fig. 1. Disc-polyacrylamide gel electrophoresis.
 A: *B. pasteurii* urease
 B: Recombinant urease expressed in *E. coli*(pBU11)

확인하였다(Fig. 1).

분자량 측정

정제된 *Bacillus pasteurii*의 urease와 *E. coli*(pBU11)에서 발현된 recombinant urease의 native 상태의 분자량은 gel filtration으로 조사한 결과 두 효소 공히 280,000±10,000 정도로 확인되었고(Fig. 2), SDS-electrophoresis를 하여 subunit 유무와 그 분자량을 확인한 결과 67,000 정도의 아주 진한 subunit가 확인되었으며 분자량 20,000 정도에 희미한 또 하나의 subunit가 관찰되었으므로 분자량 67,000(α)와 20,

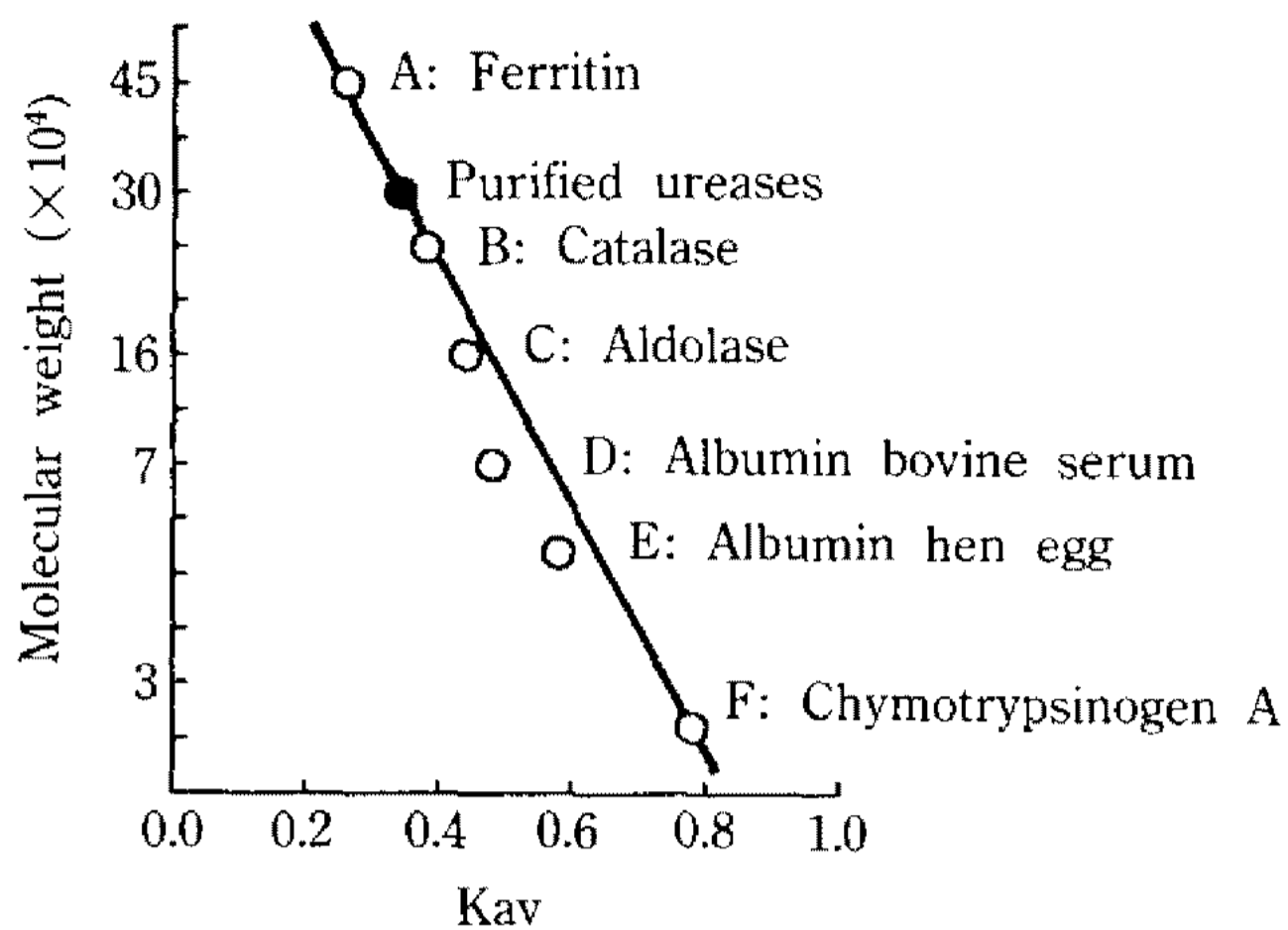


Fig. 2. Molecular weight of the ureases purified from *B. pasteurii* and *E. coli* (pBU11) by Sephadex G-150 gel filtration.

A: ferritin (M.W.: 450,000), B: catalase (M.W.: 240,000), C: aldolase (M.W.: 158,000). D: albumin bovine serum (M.W.: 68,000), E: albumin hen egg (M.W.: 45,000), F: chymotrypsinogen A (M.W.: 25,000), ●: purified ureases [*B. pasteurii* urease and *E. coli*(pBU11) recombinant urease]

000(β)의 polypeptide로 된 전체 분자량 280,000($\alpha_4\beta$)의 효소구조일 것으로 추정되어진다(Fig. 3). 이는 *Selenomonas ruminatum* urease 분자량의 360,000, subunit 50,000(16)과 *P. mirabilis*의 212,000과 *E. coli*에 cloning된 *P. stuartii*성 urease 230,000(18), *B. pasteurii*의 230,000(10), *Brevibacterium ammoniagenes*의 200,000(19), *Ureaplasma urealyticum*의 150,000(20) 그리고 *Aspergillus nidulans*의 240,000(21)과 종합 비교해 볼 때 일반적으로 식물성 urease의 분자량이 500,000 이상인데 비해 미생물성 urease의 분자량은 주로 200,000에서 300,000 정도라는 것을 알 수 있다. 특히 *B. pasteurii*는 native 분자량이 230,000과 subunit 분자량이 65,500이라는 Christians 등의 보고(10)와는 native 분자량에서 다소 차이가 있으며 subunit의 분자량이나 그 구성수도 다소 상이한 것으로 나타났는데 이는 실험에 사용한 균주가 상이함에서 기인되는 결과인 것으로 추정된다.

효소활성에 미치는 온도 및 pH의 영향

두 urease의 반응 최적 조건은 Fig. 4와 같이 *B. pasteurii*의 urease와 *E. coli*(pBU11)의 urease 공히 그 최적 pH가 7.5, 최적온도는 60°C에서 활성이 가장 높았다. 이는 *Corynebacterium renale* urease의 pH 7.5(22), *Spirulina maxima*의 pH 8.7(23), *U. urealyti-*

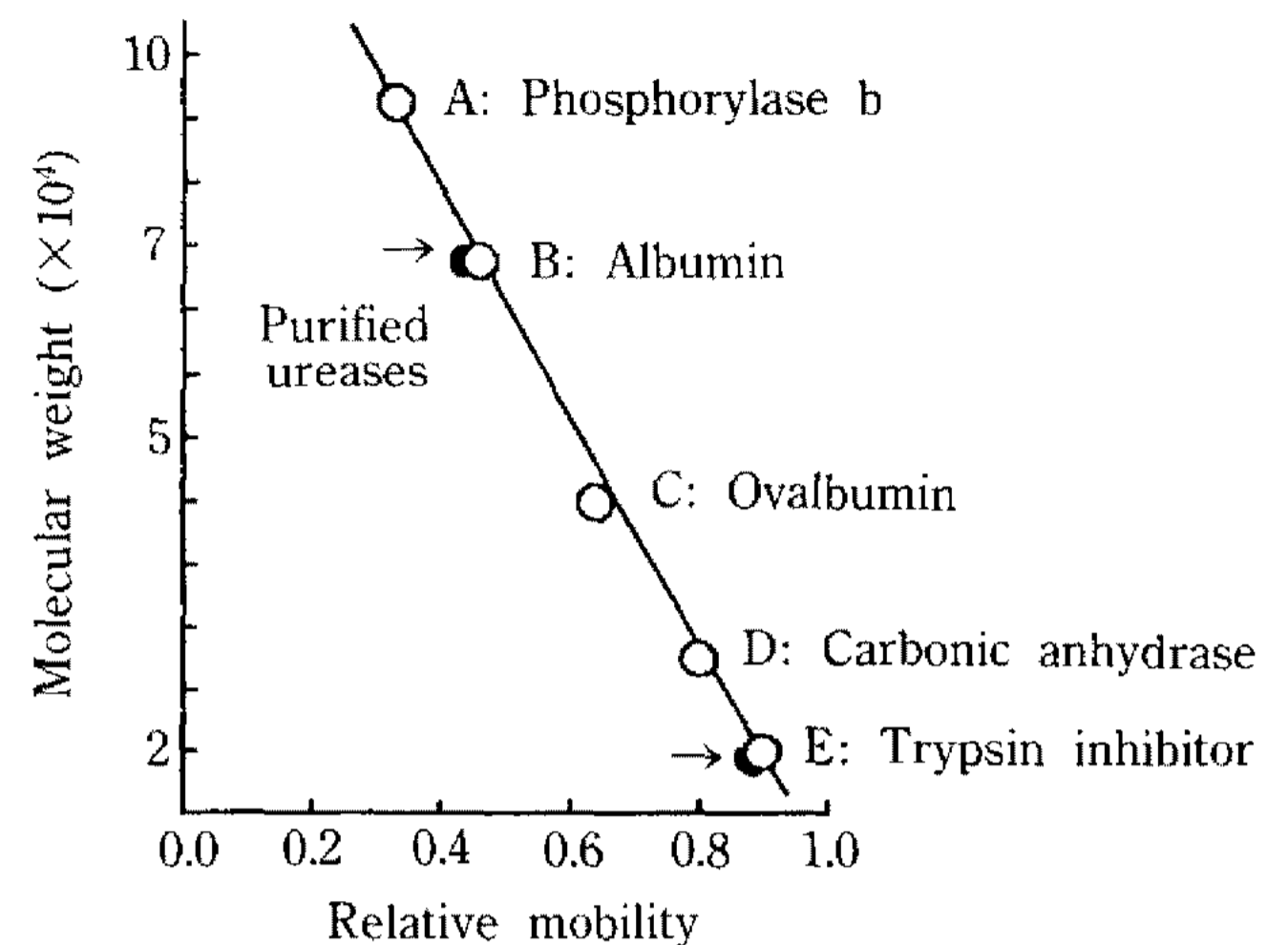


Fig. 3. Molecular weight of the ureases purified from *B. pasteurii* and *E. coli*(pBU11) by SDS-polyacrylamide electrophoresis.

A: phosphorylase b (M.W.: 94,000), B: albumin (M.W.: 67,000), C: ovalbumin (M.W.: 43,000), D: carbonic anhydrase (M.W.: 30,000), E: trypsin inhibitor (M.W.: 20,000)

*cum*의 pH 7.5(24), *B. ammoniagenes*의 pH 7.0, *A. nidulans*의 pH 8.5 등과 비교해 볼 때 유사한 pH 영역이었으나 식물 기원인 soybean leaf urease(25)의 최적 활성 pH인 5.25와는 비교적 상이하였다. 따라서 호알카리성 *B. pasteurii*의 urease가 *E. coli*내에서 발현될 경우에도 그 최적 작용 pH나 pH 안정성 등이 변화되지 않는다는 것을 알 수 있었다. 다만 식물성이나 미생물성이나, 또는 세균성이나 진균성이나에 따라 조금씩 상이한 것으로 추정된다. 그리고 최적온도의 경우는 *B. ammoniagenes*의 65°C 보다 5°C가 낮게 나타나 다소 상이하였다.

정제된 두 urease들의 pH에 대한 안정성은 Fig. 5에서와 같이 *B. pasteurii* urease와 *E. coli*(pBU11) urease가 공히 pH 5.5에서 10.5 사이에서 50% 이하로 활성이 떨어지지 않는 강한 pH 안정성을 보였다. 이는 *B. ammoniagenes*의 pH 6에서 11 사이에서 50% 이상 활성을 유지한다는 보고를 감안해 볼 때 *Bacillus*의 urease가 타 세균의 urease만큼 넓은 pH 안정성이 있는 것으로 추정된다. 열안정성은 Fig. 6에서와 같이 40°C와 50°C에서 60분동안 거의 활성도 감소를 나타내지 않았으며, 60°C에서는 40분, 70°C에서는 10분 열처리로 활성도 50% 감소를 보여 비교적 온도에 대한 저항성이 강한 것으로 나타났다. 이는 *B. ammoniagenes*의 urease가 55°C에서 80% 이상, 60°C에서

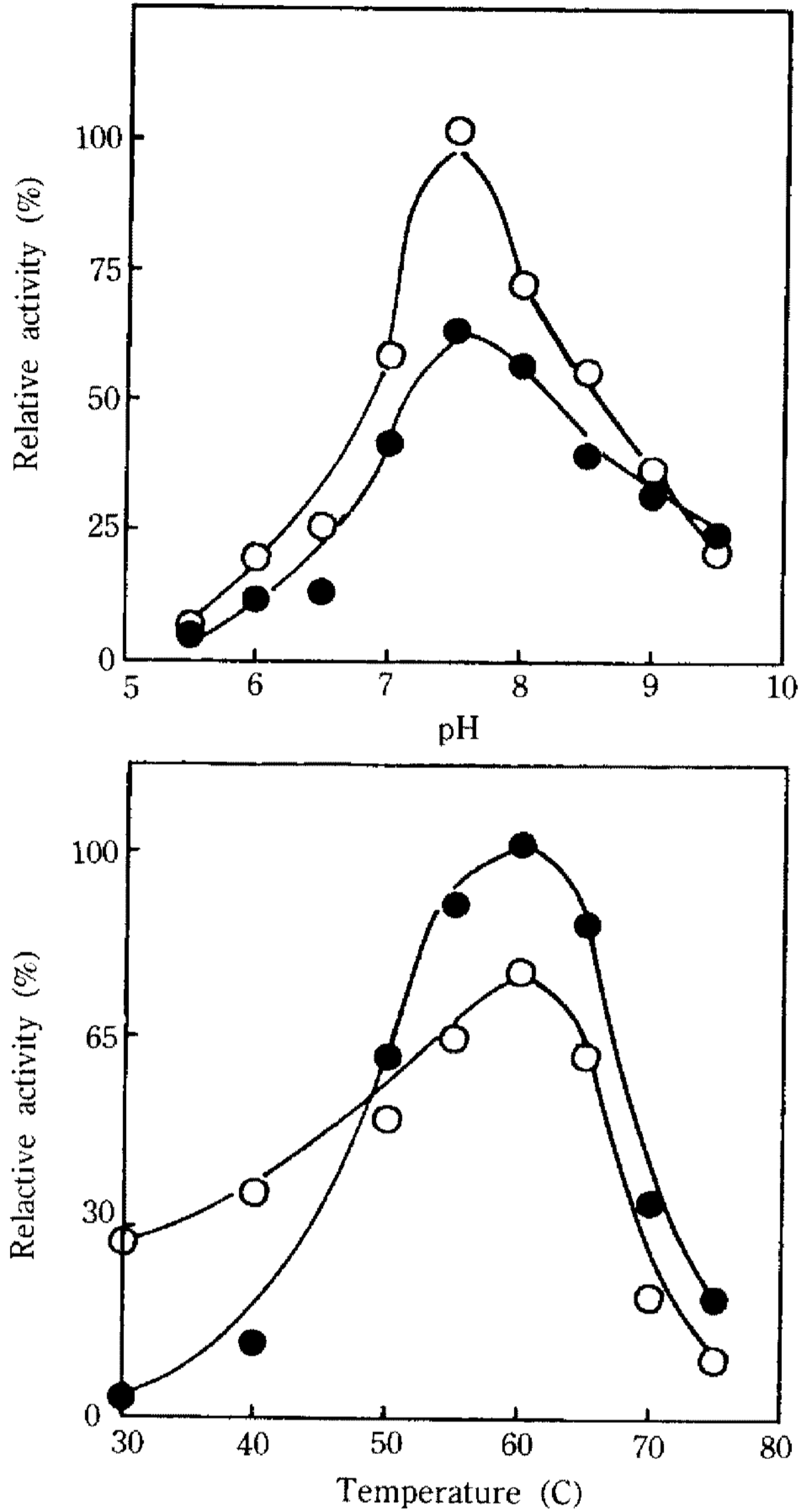


Fig. 4. Effect of pH and temperature on the activity of ureases.

○—○: *B. pastuerii* urease
●—●: The recombinant urease expressed in *E. coli* (pBU11)

50%, 65°C 에서 10% 정도의 활성을 보인 것과 *Anabaena variabilis*의 urease가 30°C 에서 여러 시간 동안, 50°C 에서 2시간 동안 75% 이상의 활성을 보인 것(26)과 같이 열에 대해서는 비교적 안정하였고 특히 고온에서는 타 urease에 비해 열저항성이 높은 효소인 것으로 추정되어진다.

효소저해제와 금속이온의 영향

여러가지 금속 이온들이 두 urease의 활성에 미치는 영향을 알아 본 결과 Table 3과 같이 Ni²⁺, Ag²⁺,

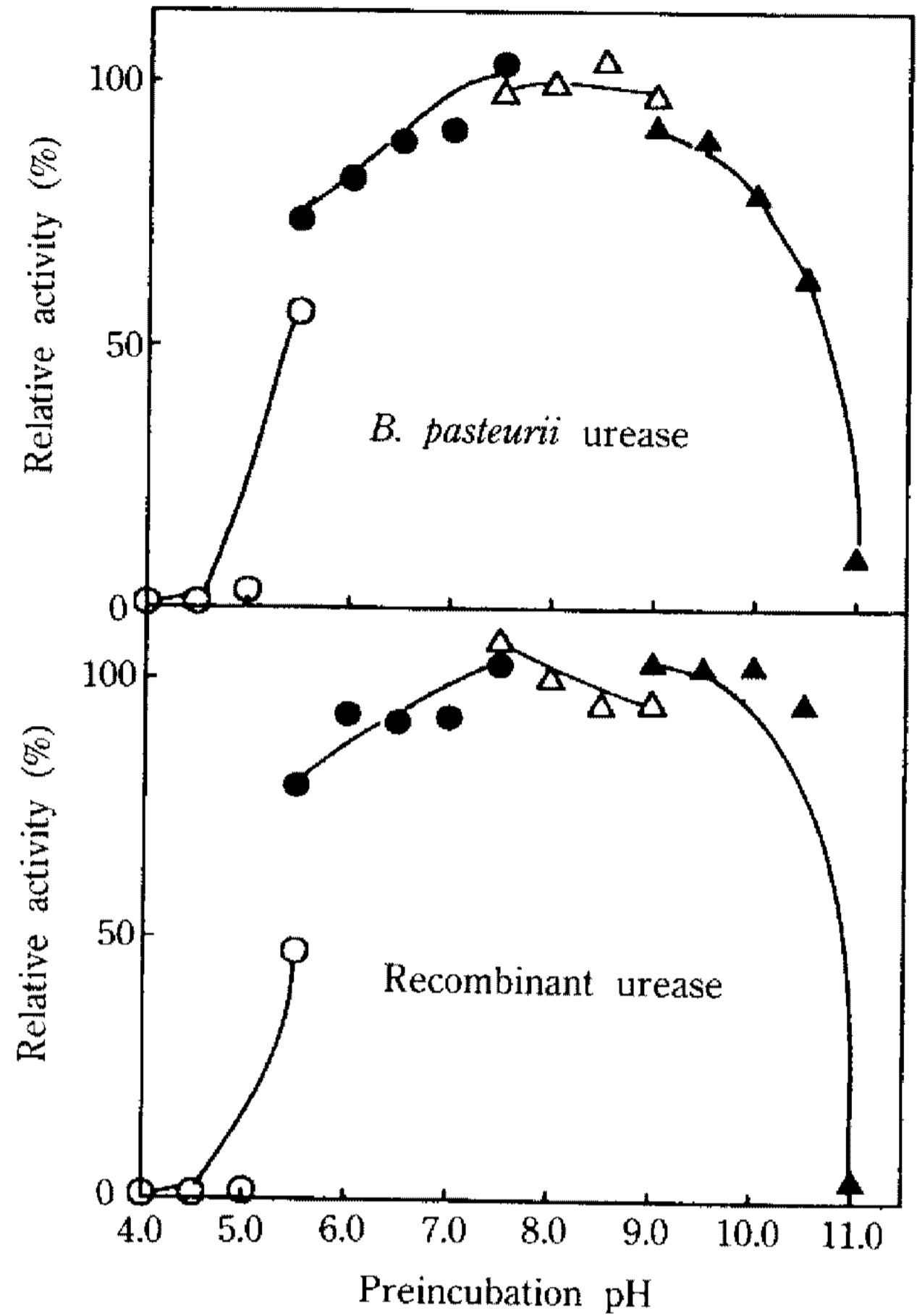


Fig. 5. pH stability of urease of the *B. pasteurii* and the recombinant urease expressed in *B. coli*(pBU11).

○—○: 1/5 M sodium acetate buffer (4.0-5.5)
●—●: 1/15 M phosphate buffer (5.5-8.0)
△—△: Tris-HCl buffer (8.0-9.0)
▲—▲: Na₂CO₃-NaHCO₃ (9.0-11.0)

Hg²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺에서는 양효소가 강한 저해를 받고, Co²⁺, Fe²⁺에서는 25% 내지 65% 정도의 저해를 받는 반면, Sn²⁺, Mn²⁺, Mg²⁺에서는 다소 촉진되는 현상을 보였다. 이는 *B. ammoniagenes* urease의 Hg²⁺, Cu²⁺에 의한 완전 저해와 Fe²⁺, Co²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺에 대해 각각 58, 61, 64, 74% 정도 활성이 감소하는 것과 거의 유사한 경향을 보였다. 그러나 흥미로운 것은 *U. urealyticum*의 urease가 HgCl₂, Pb(NO₃)₂에 의해 완전히 저해된다(27)는 결과와 비교해 볼 때 *B. pasteurii*의 urease와 그 유전자에 의해 *E. coli*내에서 발현된 urease의 경우 아주 낮게 저해 받는다는 사실은 두 urease가 중금속 Pb에 강한 저항성을 갖는다는 특이한 점이 관찰되었다.

각종 효소활성 저해제들이 *B. pasteurii*와 *E. coli* (pBU11)가 생산한 두 urease의 활성에 미치는 영향을 검토한 결과는 Table 4와 같았다. 이때 효소들은

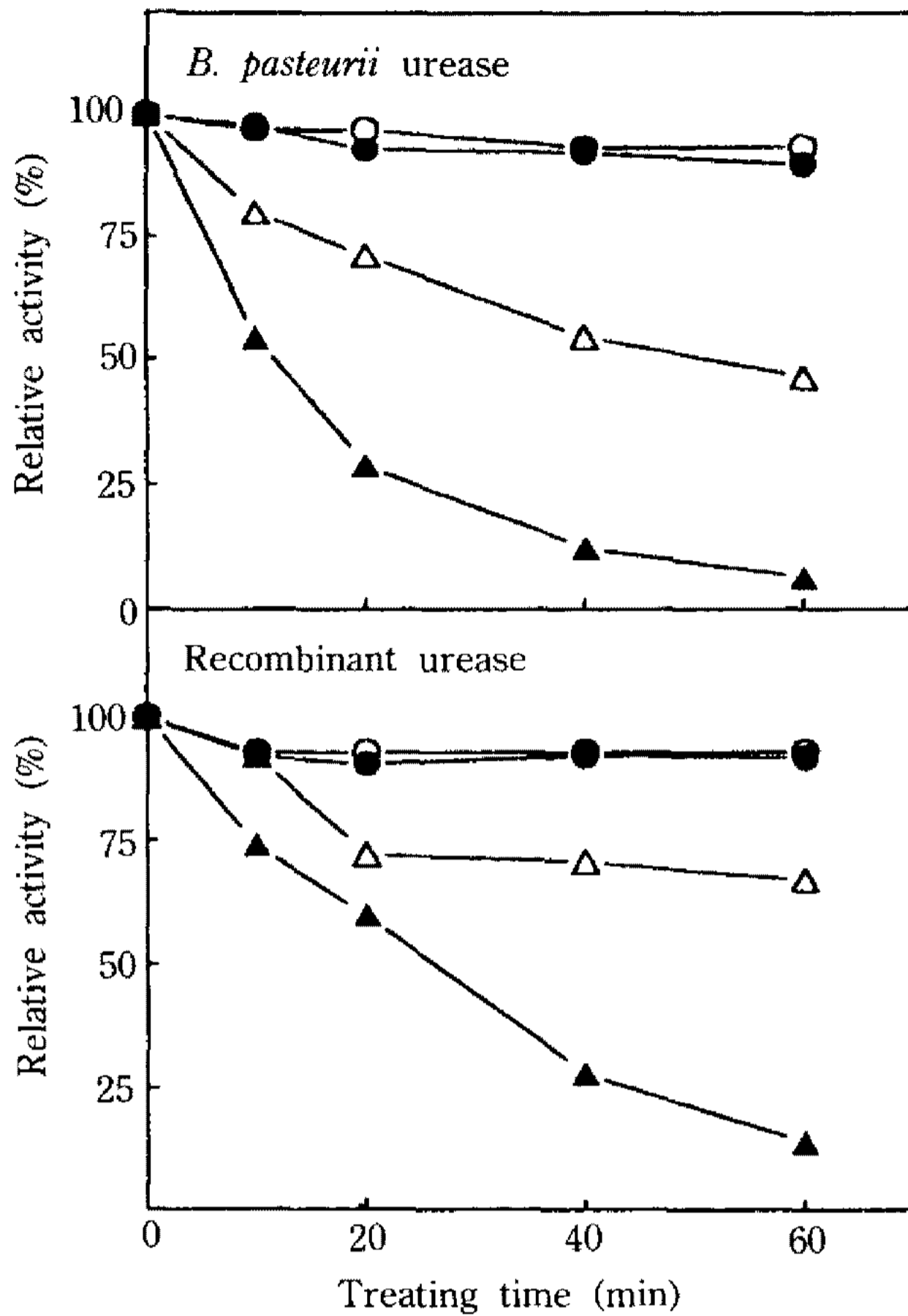


Fig. 6. Temperature stability of urease of the *B. pasteurii* and the recombinant urease expressed in *B. coli*(pBU 11).

○—○: 40°C, ●—●: 50°C, △—△: 60°C, ▲—▲: 70°C

Table 3. Effect of various metal ions on the activity of ureases

Compounds	Activity (%)	
	<i>B. pasteurii</i>	<i>E. coli</i> (pBU11)
MgSO ₄	204.1	113.6
SnCl ₂	169.1	159.1
BaCl ₂	141.3	89.9
MnCl ₂	129.2	123.9
Pb(CH ₃ COO) ₂	92.2	85.8
CaCl ₂	78.2	81.6
FeSO ₄	74.8	59.9
CoCl ₂	34.1	47.5
NiCl ₂	1.6	4.1
AgNO ₃	1.5	19.8
CuSO ₄	0.6	2.7
HgCl ₂	0.4	0.0
ZnSO ₄	0.2	5.9
None	100.0	100.0

(Final conc. 10⁻³ M)

Table 4. Effect of enzyme inhibitors on the activity of ureases

Inhibitor (10 ⁻² M)	Activity(%)	
	<i>B. pasteurii</i>	<i>E. coli</i> (pBU11)
CDTA	108.6	98.4
EDTA	104.9	107.3
Thiourea	100.9	92.7
L-Cysteine	94.1	107.8
Iodoacetate	89.4	101.6
Sodiumazide	83.4	81.3
SDS	75.2	26.0
Hydroxyurea	58.6	83.3
AHA*	8.7	5.2
ρ-CMB	1.2	10.9
None	100.0	100.0

(Final conc. 10⁻² M) *AHA: acetohydroxamic acid

각 저해제 1 ml에 urease 1 ml를 혼합하여 저해제의 최종농도를 10⁻³ M이 되게 조제하여 40°C에서 1시간 전처리시킨 후 효소로 사용하였다. 그 잔존 효소활성도를 측정해 본 결과 ρ-CMB, acetohydroxamic acid에 공히 강한 저해를 받았으며, 반면 SDS를 처리한 경우 *E. coli*(pBU11)의 urease는 약 70% 이상 저해를 받았으나 *B. pasteurii* urease는 25% 정도 저해를 받는 것으로 나타나 두 urease간에 약간의 상이함을 보였다. 또한 *B. pasteurii* urease는 hydroxyurea에 약 40% 이상 저해를 받는 반면 *E. coli* urease는 17% 정도의 저해를 받아 약간 다르게 나타났다. 이것은 *B. ammoniagenes*의 urease가 ρ-CMB, hydroxyurea에 저해를 받고, *A. variabilis*가 hydroxyurea와 acetohydroxamic acid에 저해를 받았다는 보고와 *U. urealyticum* urease가 acetohydroxamic acid에 저해를 받았다는 보고와도 유사하다. 이와 같이 두 균주의 urease가 공히 ρ-CMB에서의 저해를 받는 것으로 보아 본 urease는 아미노산의 disulfide 결합이 효소의 active site나 conformation의 중요부위에 위치하여 urease의 활성화에 관여할 가능성이 높은 것으로 추측된다. 또한 CDTA와 EDTA에 대해 저해가 거의 없어 금속이온이 활성부위에 관여할 가능성이 희박하며 대부분의 세균성 urease 효소분자에 nickel ion이 밀접하게 관계한다는 다른 보고들과는 상반되는 결과 이어서 계속 검토가 요구되어지나 이는 사용한 저해제의 농도나 효소내 nickel ion의 결합상태에 기인된 것으로 생각되어진다.

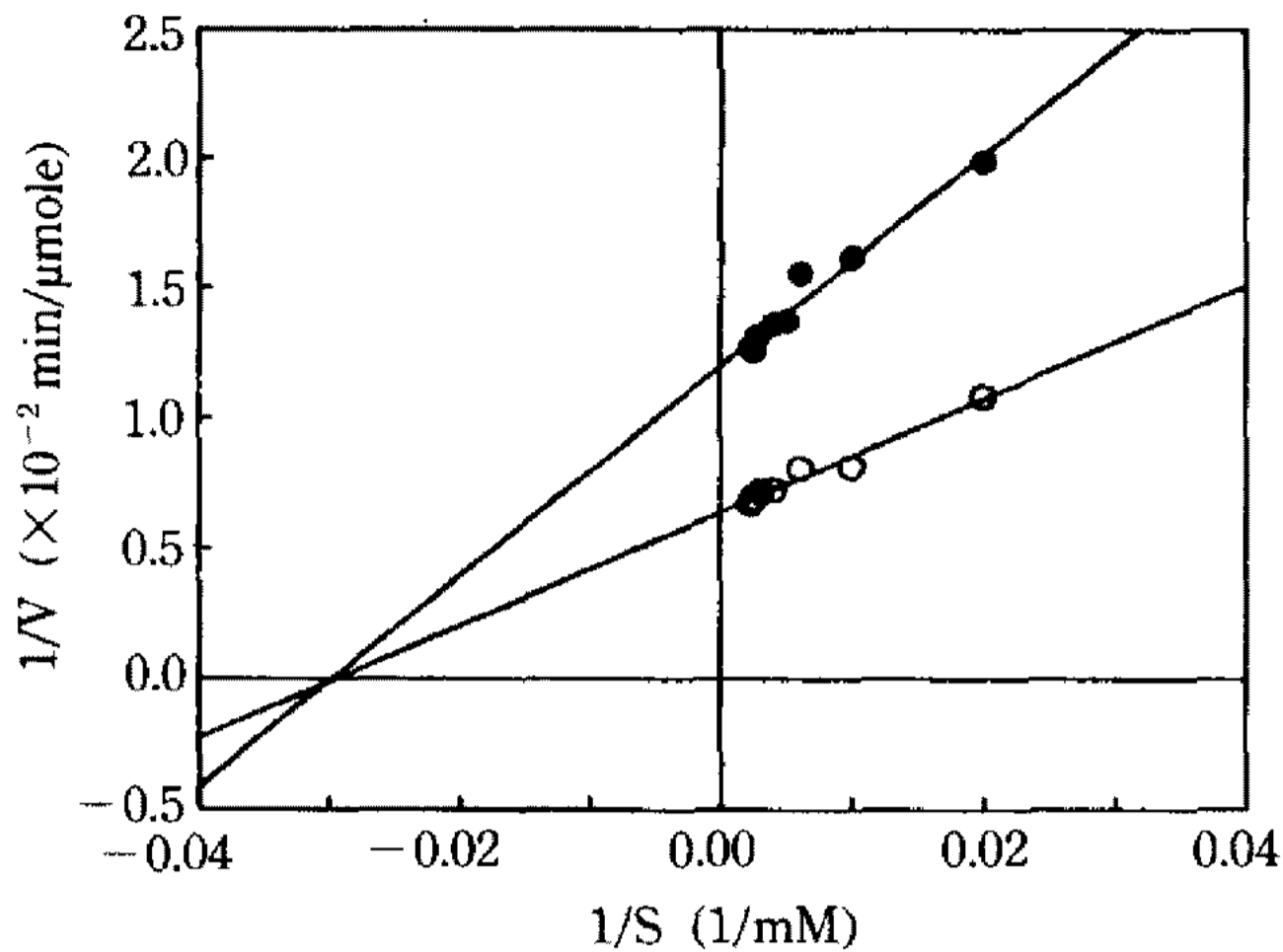


Fig. 7. Lineweaver-Burk plot for the hydrolysis of urea by the purified ureases.

○—○: *B. pasteurii* urease

●—●: The recombinant urease expressed in *E. coli* (pBU11)

Urease의 반응속도에 미치는 urea 농도의 영향

*Bacillus*의 urease gene이 *E. coli*내에서 발현되어 생산된 recombinant urease와 *B. pasteurii*가 직접 생산한 urease의 효소 반응속도에 미치는 기질농도의 영향이나 최대 반응속도를 측정함으로써 효소동력학적 특성을 알아보기 위해 Lineweaver-Burk plot로 K_m 치와 V_{max} 를 측정된 결과 Fig. 7과 같이 나타났다. *B. pasteurii* urease의 K_m 치와 V_{max} 는 각각 4.04×10^{-2} mol/l과 160 μ mol/min이었으며, *E. coli*의 urease의 K_m 치와 V_{max} 는 4.21×10^{-2} mol/l과 86.96 μ mol/min이었다. K_m 치는 두 urease가 거의 같은 결과이나 V_{max} 는 *B. pasteurii* urease가 거의 두배 정도나 높았다.

요 약

*Bacillus pasteurii*의 urease gene이 *Escherichia coli* HB101에서 발현된 *Bacillus*성 recombinant urease를 단일단백으로 정제하고 그 효소학적 특성을, 별도로 정제한 *B. pasteurii* urease의 그것과 비교검토하였다.

B. pasteurii urease gene이 cloning된 *E. coli* HB 101(pBU11)의 균체파쇄액으로부터 TEAE-cellulose, DEAE-Sephadex A-50, Sephadex G-150, Sephadex G-200 등의 이온교환 크로마토그래피와 gel filtration을 이용하여 *E. coli*내에서 발현된 *B. pasteurii*성 recombinant urease를 비활성도 기준 63.1배까지 정제하였으며, 또한 *B. pasteurii*로부터도 비활성도 185.2배의 urease를 정제하여 disc gel electrophoresis로

단일 단백질로 정제되었음을 확인하였다. 정제된 두 urease들의 native 상태의 분자량은 공히 $280,000 \pm 10,000$ 정도로 확인되었고, SDS-electrophoresis에 의해 subunit 유무와 분자량을 확인한 결과도 67,000 정도의 subunit 4개와 20,000의 subunit 1개로 된 $\alpha_4\beta$ 구조의 동일한 효소단백으로 추정할 수 있었다.

Gene donor인 *B. pasteurii*와 cloning된 균주 *E. coli*(pBU11)이 생산한 두 urease의 효소학적 특성을 비교 조사해본 결과 두 urease의 최적반응 pH는 공히 7.5로 나타났으며, pH에 대한 안정성도 두 urease가 공히 pH 5.5에서 10.5 사이에서 50% 이하로 활성이 떨어지지 않는 강한 pH 안정성을 보였다. 두 urease의 최적반응의 온도는 60°C 였으며, 비교적 온도에 대한 저항이 강한 효소임을 알았다. 두 urease의 활성에 미치는 금속이온의 영향은 Ag^{2+} , Hg^{2+} 등에서 양효소가 모두 강한 저해현상을 받는 반면, Mn^{2+} , Mg^{2+} 에서는 다소 촉진되는 현상을 보였다. 효소반응 저해제들의 영향을 조사해 본 결과 p-CMB, acetohydroxamic acid에 두 urease가 모두 강한 저해를 받았다. 두 urease의 K_m 값과 V_{max} 값은 *E. coli*(pBU11)의 urease는 4.21×10^{-2} mol/l, 86.96 μ mol/min이었고, *B. pasteurii* urease는 4.04×10^{-2} mol/l, 160 μ mol/min이었다. 따라서 *B. pasteurii*의 urease나 그 urease gene으로 cloning되어 *E. coli*내에서 발현된 recombinant urease는 분자량이나 효소학적 특성에서 거의 동일한 효소단백임을 알 수 있었다.

감사의 말

본 연구는 한국과학재단 일반연구비(901-0407-029-2)로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Cook, A.R. 1976. Urease activity in the rumen of sheep and the isolation of ureolytic bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **92**: 32-48.
2. Smith, C.J., R.B. Hespell and M.P. Bryant. 1981. Regulation of urease and ammonia assimilatory enzymes in *Selenomonas ruminantium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**: 89-96.
3. Pearson, R.M. and J.A.B. Smith. 1943. The utilization of urea in the bovine rumen. 2. The conversion of urea to ammonia. *Biochem. J.* **37**: 148-153.
4. Kennedy, P.M. and P. Milligan. 1980. The degra-

- dation and utilization of endogenous urea in the gastrointestinal tract of ruminants: a review. *Can. J. Anim. Sci.* **60**: 205-221.
5. Cheng, K.J. and R.J. Wallace. 1979. The mechanism of passage of endogenous urea through the rumen wall and the role of ureolytic epithelial bacteria in the urea flux. *Br. J. Nutr.* **42**: 553-557.
 6. Blakeley, R.L. and B. Zerner. 1984. Jack bean urease: the first nickel enzyme. *J. Mol. Catalysis* **23**: 263-292.
 7. Bekheet, I.A. and P.J. Syrett. 1977. Urea-degrading enzymes in algae. *Br. Phycol. J.* **12**: 137-143.
 8. Larson, A.D. and R.E. Kallio. 1954. Purification and properties of bacterial urease. *J. Bacteriol.* **68**: 67-73.
 9. Wiley, W.R. and J.L. Stokes. 1962. Requirement of an alkaline pH and ammonia for substrate oxidation by *Bacillus pasteurii*. *J. Bacteriol.* **84**: 730-734.
 10. Christians, S. and H. Kaltwasser. 1986. Nickel-content of urease from *Bacillus pasteurii*. *Arch. Microbiol.* **145**: 51-55.
 11. Kim, Sang-Dal and J. Spizizen. 1985. Molecular cloning and expression of *Bacillus pasteurii* urease gene in *Escherichia coli*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **13**: 297-302.
 12. Wriston, J.C. 1970. *Methods in Enzymol.* **17A**: 732-742.
 13. Davis, B.J. 1964. Disk electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **121**: 404-427.
 14. Andrew, P. 1964. Estimation of the molecular weight of proteins by Sephadex gel filtration. *J. Biochem.* **91**: 222-233.
 15. Weber, K. and M. Osborn. 1969. The reliability of molecular weight determinations by SDS-PAGE. *J. Biol. Chem.* **244**: 4406-4412.
 16. Hausinger, R.P. 1986. Purification of a nickel containing urease from the rumen anaerobe *Selemonas ruminantium*. *J. Biol. Chem.* **261**: 786-780.
 17. Mulrooney, S.B., M.J. Lynch, H.L.T. Mobley and R.P. Hausinger. 1988. Purification, characterization, and genetic organization of recombinant *Providencia stuartii* urease expressed in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **170**: 2202-2207.
 18. Jones, B.D. and H.L.T. Mobley. 1988. *Proteus mirabilis* urease: Genetic organization, regulation and expression of structural genes. *J. Bacteriol.* **170**: 3342-3349.
 19. Nakano, H., S. Takenishi and Y. Watanabe. 1984. Purification and properties of urease from *Brevibacterium ammoniagenes*. *Agric. Biol. Chem.* **48**(6): 1495-1502.
 20. Saada, A.B. and I. Kahane. 1988. Purification and characterization of urease from *Ureaplasma urealyticum*. *Zbl. Bakt. Hyg. A269*: 160-167.
 21. Creaser, E.H. and R.L. Porter. 1985. The purification of urease from *Aspergillus nidulans*. *Int. J. Biochem.* **17**: 1339-1341.
 22. Lister, A.J. 1956. The kinetics of urease activity in *Corynebacterium renale*. *J. Gen. Microbiol.* **14**: 478-484.
 23. Carvajal, N., M. Fernandez, J.P. Rodriguez and M. Donoz. 1983. Urease of *Spirulina maxima*. *Phytochemistry* **21**: 2821-2823.
 24. Stemke, G.W., H. Eng and J.A. Robertson. 1986. Properties of urease from *Ureaplasma urealyticum*. *Can. J. Microbiol.* **32**: 487-493.
 25. Kerr, P.S., D.G. Bleins, B.J. Rapp and D.D. Randall. 1983. Soybean leaf urease: Comparison with seed urease. *Physiol. Plant.* **57**: 339-345.
 26. Ge, X., K. Cain, and R. Hirschberg. 1990. Urea metabolism and urease regulation in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *Can. J. Microbiol.* **36**: 218-222.
 27. Blanchard, A., Razin, S., G.E. Kenny and M.F. Barile. 1988. Characteristics of *Ureaplasma urealyticum* urease. *J. Bacteriol.* **170**: 2692-2697.
 28. Tsukagoshi, N., H. Ihara, H. Yamagata and S. Udaka. 1984. Cloning and expression of a thermophilic α -amylase gene from *Bacillus stearothermophilus* in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **193**: 58-63.

(Received June 18, 1992)