

Penicillium sp. LAM 91-89가 생산하는 bilirubin oxidase의 특성

이동희* · 이동호 · 김종배 · 이노운

건국대학교 미생물공학과

초록: 토양에서 분리한 bilirubin oxidase를 생산하는 *Penicillium* sp. LAM 91-89의 배양액으로부터 효소를 정제하여 여러가지 성질을 조사하였다. LAM 91-89 bilirubin oxidase는 ethanol(40~80%) 추출 및 2회의 Sephadex G-200 column chromatography로 약 70배 정제하였으며 회수율은 12%였다. 이 효소는 분자량이 약 53,000 dalton이었으며 40°C, pH 8.5에서 최대의 활성을 보였고 pH 6에서 10까지의 넓은 범위와 40°C 이하에서 안정하였다. 또 효소의 활성이 Mg^{2+} 에 의해서 증가하였으며 Ag^+ , Hg^{2+} , Mn^{2+} , Pb^{2+} , p-CMB, iodoacetate 및 SDS에 의해서 저해되었다. 그리고 이 효소는 bilirubin에 대한 특이성이 컸으며 bilirubin에 대한 K_m 값은 6.67 μM 이었다(1993년 2월 24일 접수, 1993년 5월 11일 수리).

Bilirubin은 적혈구가 파괴되어 생성되는 hemoglobin에서 유리되는 heme의 분해산물로, 일반적으로 혈액, 십이지장액 및 뇨 중의 bilirubin의 정량은 간기능 검사에 있어서 중요한 지표로 사용되고 있는데 황달증세를 가진 환자에서는 혈액 중에 높은 농도로 축적되며¹⁾ 특히 신생아의 경우에 혈중 bilirubin의 농도가 높아지면 기능적이고 복합적인 양상으로 신경장애 및 뇌성마비가 일어나게 된다.²⁻⁴⁾ 따라서 혈중 bilirubin의 측정은 임상진단에서 매우 중요한 가치를 지니게 된다. 그러나 bilirubin의 측정방법은 일반적으로 diazo반응에 의해서 생성되는 azo-bilirubin의 측정이 흔히 사용되고 있는 실정이지만 그 방법이 매우 복잡하고 감도가 낮아서 저농도의 것은 정량하기 어려우며 동시에 hemoglobin 등의 혈액 내에서 정상적으로 존재하는 물질에 의해서 영향을 많이 받는 등의 결점을 가지고 있어서 자동분석기에의 적용도 어려운 실정이다.⁵⁻⁸⁾ 그래서 반응에서의 특이성이 큰 bilirubin oxidase에 의한 효소적 분석이 고려되었다. 그 결과 Brodersen과 Bartels⁹⁾가 guinea pig의 뇌수에 bilirubin oxidase가 존재한다고 보고하였으나 함량이 너무 낮아서 순수분리하는데 실패하였다. 그 후 Murao와 Tanaka¹⁰⁻¹³⁾가 미생물인 *Myrothecium verrucaria*의 배양액에서 bilirubin oxidase 활성을 발견하였으며, 생산과 정제 방법 및 효소학적 성질에 관해서 연구 보고하였다. 그런데 그 이외에는 연구 보고된 것이 없어서 독점생

산으로 인한 높은 가격 때문에 구미, 일본 등 선진국에서만 임상진단용 효소로서 사용되고 있을 뿐이다. 그래서 저자들은 미생물성 bilirubin oxidase에 관해서 연구하던 중 토양으로부터 효소생산능이 우수한 *Penicillium*속 균주 LAM 91-89를 선별하였기에 배양 후 정제하여 얻은 효소의 성질에 관해서 보고하고자 한다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 선별

Glucose 4%, polyopeptone 1%, K_2HPO_4 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, NaCl 0.05% 조성의 배지(pH 6)를 사용하여 토양에서 분리한 *Penicillium*속 2370여 균주를 대상으로하여 30°C에서 4일간 진탕배양(120 rpm)한 후 배양액 중의 bilirubin oxidase 활성을 측정된 결과 효소생산능이 가장 우수한 균주 LAM 91-89를 최종 선별하여 본 연구에 사용하였다.

균의 배양

Glucose 2%, yeast extract 1%, K_2HPO_4 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, NaCl 0.05%, hemoglobin 0.005% 조성의 배지(pH 6) 3L를 5L fermenter(Mituwa KMJ-5S)에 넣고 전배양한 배양액을 5% 수준으로 접종하여 통기량 1 vvm, 교반속도 200 rpm으로 30°C에서 72시간 배양하였다.

Key words: *Penicillium* sp. LAM 91-89, bilirubin oxidase
Corresponding author: D. H. Yi

효소활성 측정

Bilirubin oxidase 활성은 bilirubin이 산화되어 biliverdin이 생성되면 황적색에서 녹색으로 변화하여 440 nm에서 흡광도의 감소가 나타나는 원리를 이용한 Murao와 Tanaka¹⁰⁾의 방법을 조금 변화시켜 측정하였다. 즉, 0.2 M Tris-HCl 완충액(pH 8.5) 1.8 ml와 동일한 완충액에 용해한 bilirubin 용액(20 mg/dl) 0.2 ml 및 효소용액 0.5 ml를 혼합하여 40°C에서 10분간 반응시킨 후 440 nm에서 흡광도의 감소(ΔA)를 측정하였다. 효소활성은 1분간 1 μ M의 bilirubin을 산화시키는데 상당하는 효소량을 1 unit로 표시하였다.

효소의 정제

배양여액을 사용하여 ethanol 40~80%(v/v) 농도로 효소단백질을 침전(0°C, 5 hr)시킨 후 3500×g에서 20분간 원심분리하여 얻은 침전물을 2회의 Sephadex G-200 column(2×25 cm) chromatography로 정제하여 효소액으로 사용하였다. 이때 사용한 완충액은 0.2 M Tris-HCl 완충액(pH 8.5)이었다.

분자량 측정

효소의 단일성 및 분자량을 측정하기 위한 SDS-poly-

acrylamide gel electrophoresis는 Laemmli¹⁴⁾의 방법에 따라 행하였으며 12% acrylamide를 사용하였고 전기영동 후 0.05% Coomassie brilliant blue G로 염색하였다. 표준단백질로는 phosphorylase b(M. W. 94,000), bovine serum albumin(M. W. 67,000), ovalbumin(M. W. 43,000), carbonic anhydrase(M. W. 30,000), soybean trypsin inhibitor(M. W. 20,100) 및 α -lactalbumin(M. W. 14,400)을 사용하였다.

결과 및 고찰

효소의 정제 및 분자량 측정

1) Ethanol 침전

배양여액에 냉각(-20°C) 에탄올을 40%되게 가한 후 3500×g에서 20분간 원심분리한 상등액에 냉각 ethanol을 80%(v/v) 농도가 되게 첨가한 후 0°C에서 5시간 방치 후 3500×g에서 20분간 원심분리하여 효소단백부분을 분별침전하여 0.2 M Tris-HCl 완충액(pH 8.5)에 용해하였다.

2) Sephadex G-200 gel filtration

Ethanol 분별침전의 결과로 얻은 효소의 용액을 위의 완충액으로 평형화시킨 Sephadex G-200 column(2×25 cm)에 주입하고 동일한 완충액으로 시간당 9 ml 유속으로 1.5 ml씩 분획한 결과 첫번째 peak에서 bilirubin oxidase 활성을 갖는 단백질이 용출되었다. 24~36번 분획을 보아 냉동 감압 농축시킨 후 같은 조건하에서 2차 Sephadex G-200 gel filtration을 한 결과 Fig. 1과 같이 효소활성이 단백질 peak와 일치하는 결과를 얻었다. 이렇게하여 정제한 결과 Table 1에서와 같이 회수율은 12%였으며 약 70배 정제할 수 있었다.

3) 분자량 측정

Penicillium sp. LAM 91-89가 생산하는 bilirubin oxidase의 분자량을 측정하기 위하여 SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 한 결과, 분자량은 약 53,000 dalton 정도로 추정되었다(Fig. 2). 그리고 그림으로 나타내지는 않았지만 Sephadex G-100 column chromatography로 분자량을 측정한 결과 52,500이었다. 한편 Murao와 Ta-

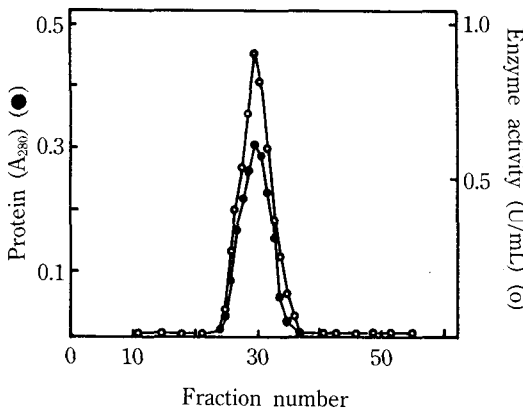


Fig. 1. Second Sephadex G-200 column chromatography.

Table 1. Summary of the enzyme purification

| Purification step | Total protein (mg) | Total activity (unit) | Specific activity (unit/mg) | Yield (%) |
|-----------------------|--------------------|-----------------------|-----------------------------|-----------|
| Culture filtrate | 6216 | 561 | 0.09 | 100 |
| Ethanol precipitation | 924 | 314 | 0.34 | 56 |
| 1st Sephadex G-200 | 26 | 121 | 4.7 | 22 |
| 2nd Sephadex G-200 | 11 | 69 | 6.3 | 12 |

naka¹²⁾가 *Myrothecium verrucaria*에서 얻은 bilirubin oxidase의 분자량은 52,000으로 LAM 91-89 균주가 생산하는 효소와 유사하였다.

효소의 성질

1) 최적 pH 및 pH 안정성

0.2 M Tris-HCl 완충액(pH 7~9)과 0.2 M K₂CO₃-NaHCO₃ 완충액(pH 9~11)을 사용하여 반응액의 pH를 7에서 11까지 조절한 후 효소활성을 측정한 결과는 Fig. 3 (A)와 같이 최적 pH는 8.5였으며 pH 9에서도 90% 이상의 활성을 나타내었다. 이와같은 결과는 Murao와 Tanaka¹²⁾가 보고한 bilirubin oxidase의 최적 pH보다 다소 높았다. 한편 0.1 M citrate 완충액(pH 4~6), 0.1 M phosphate 완충액(pH 6~8) 및 0.1 M K₂CO₃-NaHCO₃ 완충액(pH 8~11)을 사용하여 효소액의 pH를 4에서 11까지 조절하여 37°C에서 1시간 처리한 후 pH 8.5에서 잔존 활성도를 측정한 결과 Fig. 3(B)와 같이 pH 6에서 11까지 비교적 넓은 범위에서 안정하였으며 pH 5에서는 약 25%, pH 11에서는 약 35%정도 실패하였다. 그리고 Murao와 Tanaka¹²⁾가 보고한 *Myrothecium verrucaria*의 효소는 pH 5에서 9.7까지 안정하여 본 효소와 유사하였다.

2) 최적 온도 및 열안정성

효소의 작용 최적 온도를 조사하기 위하여 25°C에서 50°C까지 5°C 간격으로 변화시키면서 활성을 측정

결과는 Fig. 4(A)와 같이 40°C 부근에서 효소의 활성이 가장 높았다. 한편 pH 8.5의 0.1 M phosphate 완충액으로 조제한 효소용액을 40~70°C에서 10~60분간 처리한 후 잔존활성도를 측정한 결과는 Fig. 4(B)에서와 같이 40°C에서는 매우 안정하였으나 50°C에서는 다소 실패되었고 60°C 이상에서는 활성이 급격히 감소하여 60°C 10분 처리로 약 40%, 60분 처리로 약 90% 정도가 실패되었다. 이와 같은 결과는 Murao와 Tanaka¹²⁾가 *Myrothecium verrucaria*에서 분리한 bilirubin oxidase가 40°C에서 최적 활성을 가지며 37°C까지는 안정하였으나 그 이상의 온도에서는 점차 실패한다고 보고한 결과와 비교하여 볼 때 최적 온도는 유사하였으나 안정성에 있어서는 본 효소가 *Myrothecium verrucaria*가 생산하는 효소보다 비교적 안정성이 크다는 것을 알 수 있었다.

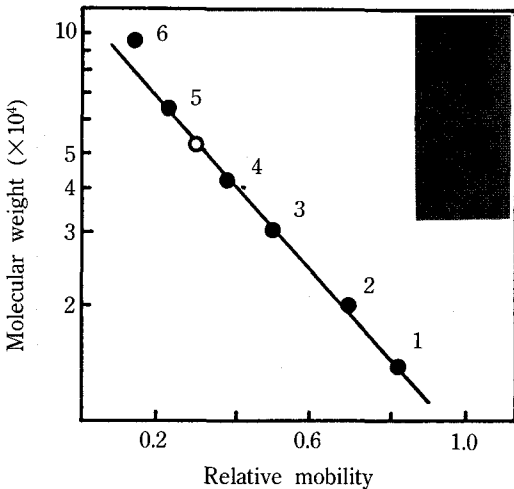


Fig. 2. Determination of molecular weight of bilirubin oxidase by SDS-PAGE. 1, α -lactalbumin (M.W. 14,400); 2, soybean trypsin inhibitor (M.W. 20,000); 3, carbonic anhydrase (M.W. 30,000); 4, ovalbumin (M.W. 43,000); 5, bovine serum albumin (M.W. 67,000); 6, phosphorylase b (M.W. 94,000)

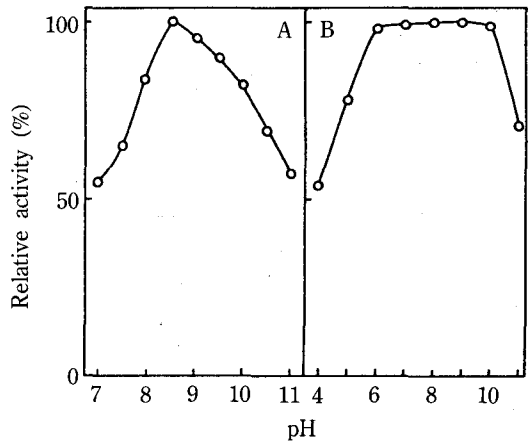


Fig. 3. Optimal pH (A) and pH stability (B) of the purified enzyme.

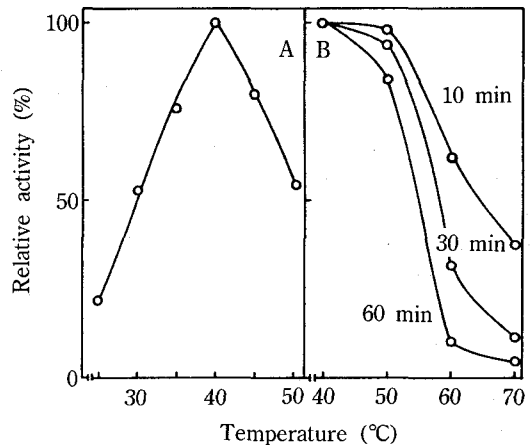


Fig. 4. Optimal temperature (A) and thermal stability (B) of the enzyme.

3) 금속 이온의 영향

반응액 중의 농도가 1 mM이 되게 각종 금속 이온을 가한 후 효소활성을 측정 한 결과는 Table 2와 같이 Mg²⁺ 이온에 의해서 효소활성이 약 20% 증가하였으나 Ba²⁺ 에 의해서는 활성이 약 90%정도 저해되었고 Ag⁺, Mn²⁺, Hg²⁺ 및 Pb²⁺ 등에 의해서는 완전히 저해되었다. 한편 *Myrothecium verrucaria*의 효소¹²⁾는 Fe²⁺에 의해서 완전히 저해되었다고 보고되어 본 효소와는 상이한 결과를 나타내었다.

4) 효소 저해제의 영향

효소활성에 미치는 저해제의 영향을 알아보기 위하여 각종 유기화합물을 반응액 중에 1 mM되게 가한 후 효소활성을 측정 한 결과는 Table 3에서와 같이 p-chloro-mercuribenzoic acid, iodoacetate, sodium dodecyl sulfate 등에 의해서 완전히 저해되었으며 EDTA, KCN, thiourea에 의해서는 40~60%정도 저해되었다. 그러나 *Myrothecium verrucaria*의 효소¹²⁾는 KCN에 의해서 완전히 저해되었고 sodium azide에 의해서 약 40%, thiou-

Table 2. Effect of metal ions on the enzyme activity

| Metal ion (1 mM) | Relative activity (%) |
|------------------|-----------------------|
| K ⁺ | 107 |
| Na ⁺ | 93 |
| Ag ⁺ | 0 |
| Ba ²⁺ | 11 |
| Ca ²⁺ | 52 |
| Cu ²⁺ | 100 |
| Fe ²⁺ | 68 |
| Hg ²⁺ | 0 |
| Mg ²⁺ | 122 |
| Mn ²⁺ | 0 |
| Pb ²⁺ | 0 |

Table 3. Effect of organic compounds on the enzyme activity

| Cinound (1 mM) | Relative activity (%) |
|-------------------------|-----------------------|
| None | 100 |
| Sodium azide | 100 |
| Potassium cyanide | 42 |
| EDTA-2Na | 62 |
| p-Chloromercuribenzoate | 0 |
| Sodium fluoride | 86 |
| Iodoacetate | 0 |
| Thiourea | 61 |
| SDS | 0 |
| Serum (human, 10%) | 102 |

rea에 의해서 약 15% 저해되었다고 보고되었다.

5) 기질특이성 및 K_m값

Bilirubin을 비롯하여 tetrapyrrole 구조를 가진 각종 물질을 기질로 사용하여 LAM 91-89 bilirubin oxidase의 기질특이성을 조사한 결과 bilirubin에 대한 특이성이 상당히 높았으며, biliverdin에 대해서는 bilirubin과 비교해서 약 20% 작용하였으나 기타의 기질에 대해서는 활성이 없었다(Table 4). 한편 *Myrothecium verrucaria*의 bilirubin oxidase¹²⁾는 biliverdin에 대해서 약 50%정도의 활성을 나타내었다고 보고된 사실과 비교하여 볼 때 본 효소가 bilirubin에 대한 특이성이 더욱 크기 때문에 실제의 임상적인 응용에 있어서는 상당히 유리한 장점이 될 수 있다고 생각된다. 그리고 bilirubin의 농도를 변화시켜 효소 초기 반응속도를 측정하여 K_m값을 구한 결과 K_m값은 6.67 μM이었고 V_{max}는 0.105 μM/min이었다 (Fig. 5). *Myrothecium*의 효소¹²⁾는 K_m값이 약 190 μM이어서 본 효소가 bilirubin에 대한 친화력이 훨씬 크기 때문에 혈액이나 뇨 등에 있는 저농도의 bilirubin을 측정하는데 더욱 효과적이라 생각된다.

Table 4. Substrate specificity of the enzyme

| Substrate | Relative activity (%) |
|--------------------|-----------------------|
| Bilirubin | 100 |
| Biliverdin | 19 |
| Hemoglobin | 0 |
| Chlorophyll | 0 |
| o-Phenylenediamine | 0 |

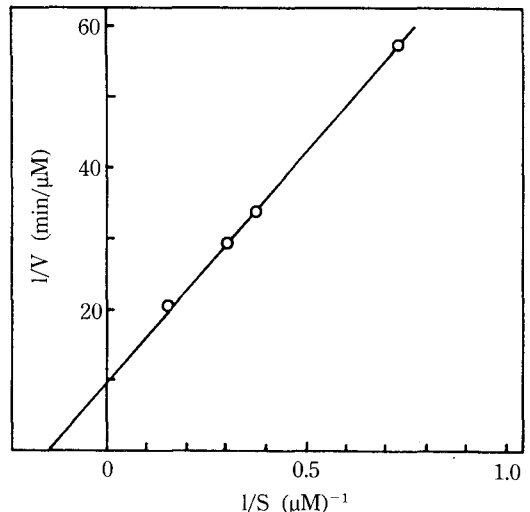


Fig. 5. Lineweaver-Burk plots of LAM 91-89 bilirubin oxidase.

감사의 글

본 연구는 1991~2년도 한국과학재단의 일반연구비로 수행된 결과의 일부입니다(과제번호; 911-0407-036-2).

참 고 문 헌

1. Lehninger, A. S.: in 'Principles of Biochemisgtry', p. 627, Worth Publishers, New York(1982)
2. Zetterstom, R., and L. Ernster: Nature, 178 : 335 (1956)
3. Mustafa, M. G., M. L. Cowger and T. E. King: J. Biol. Chem., 244 : 6403(1969)
4. Odell, G. B.: Pediatrics, 46 : 16(1970)
5. Malloy, H. T., and L. A. Evelyn: J. Biol. Chem., 119 : 481(1937)
6. Doums, B. T., B. W. Perry and E. A. Sasse: J. Clin. Chem., 19 : 984(1973)
7. Doums, B. T., P. P. Kwok-Cheung and B. W. Perry: J. Clin. Chem., 31 : 1779(1985)
8. Nosslin, B.: Scand. J. Clin. Lab. Invest., 12 : 49 (1960)
9. Boldersen, R., and P. Bartels: Eur. J. Biochem., 10 : 468(1969)
10. Murao, S., and N. Tanaka: Agric. Biol. Chem., 45 : 2383(1981)
11. Murao, S., and N. Tanaka: Agric. Biol. Chem., 46 : 2031(1982)
12. Tanaka, N., and S. Murao: Agric. Biol. Chem., 46 : 2499(1982)
13. Tanaka, N., and S. Murao: Agric. Biol. Chem., 49 : 843(1985)
14. Laemmli, U. K.: Nature, 227 : 680(1970)

Properties of a bilirubin oxidase from *Penicillium* sp. LAM 91-89

Dong-Heui Yi*, Dong-Ho Lee, Jung-Bae Kim and No-Woon Lee (Department of Microbiological Technology, Kon-Kuk University, Seoul 133-701, Korea)

Abstract : A bilirubin oxidase produced by *Penicillium* sp. strain LAM 91-89 was purified and partially characterized. The enzyme was purified about 70 folds from culture broth by ethanol precipitation, first and second Sephadex G-200 column chromatography with overall yield of 12%. The molecular weight of the enzyme was estimated to be 53,000 dalton by SDS-PAGE. The optimum pH and temperature was 8.5 and 40°C, respectively. The enzyme was stable in the pH range 6~10 and below 40°C. Activity of the enzyme was increased by the addition of Mg²⁺ but was gretly inhibited by Ag⁺, Hg²⁺, Mn²⁺, Pb²⁺, iodoacetate, p-chloromercurobenzoic acid and sodium dodecyl sulfate. Among various substrates, bilirubin was favorably reacted and K_m value for bilirubin was 6.67 μmole.