

해양 미생물 *Pseudomonas* sp.의 유전자 재조합 Alginate Lyase의 특성

김영옥 · 김구택 · 김현국 · 김대경 · 허성희* · 공인수
부경대학교 생물공학과, *해양학과

Characteristics of Recombinant Alginate Lyase of a Marine Bacterium, *Pseudomonas* sp.

Young-Ok KIM, Gu-Taek KIM, Hyun-Kuk KIM, Dae-Kyung KIM, Sung-Hoi HUH and In-Soo KONG

Department of Biotechnology & Bioengineering, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

* Department of Oceanography, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

We isolated a marine bacterium, *Pseudomonas* sp., which could produce the enzyme of alginate lyase, and cloned the alginate lyase gene in *Escherichia coli*. The cloned DNA was overexpressed with approximately 50% amount of total proteins. In addition, the expressed proteins were not secreted into the medium, and most of them existed in the cytoplasm by the soluble form, but not observed any inclusion body by TEM. For the optimum enzyme activity, temperature was 20°C, pH was 7.0, and Km and Vmax values of the enzyme were 0.4% and 625 units/mg, respectively.

Key words : recombinant alginate lyase, plasmid, *Pseudomonas* sp.

서 론

알긴산은 갈조류의 세포벽에 존재하는 다당체로써 여러 응용범위 내에서 사용되고 있다. 칼슘 이온의 존재하에서 형성된 겔 형태의 알긴산은 안정제, 유화제 등으로써 식품, 화장품, 의약품 등의 산업 제품에 사용되고 있으며, 특히 고정화 담체로써 세포나 효소의 고정화에 널리 이용되고 있다 (Gacesa, 1988). 알긴산은 β-D-mannuronate (M)와 C5 epimer인 α-L-guluronate (G)가 (1-4)-link된 다당체로써 한가지 종류의 단당으로 되어 있는 homopolymer (poly M or poly G) 형태이거나 M과 G가 적절히 포함된 heteropolymer (poly MG) 형태로 되어 있다. 알긴산의 겔 형성 능력은 두가지 다른 uronic acid 비율에 따라 결정되어진다 (Haug and Larsen, 1962; Haug et al., 1967; Haug et al., 1967; Rees, 1972).

Alginate는 갈조류에서 처음 추출되었다. 또한 미역, 다시마 등과 같은 갈조류의 cell wall의 주요성분으로 존재한다. Alginate는 그 자체로 식품첨가물로 이용되고 그 용도가 다양할 뿐만 아니라 그 결합 물질에 따라 성질이 각각 달라지므로 사용 목적에 따라 가장 적합한 형태의 제품이 선택되고 있다. Alginate는 알긴산의 수산화, 또는 친수 유도체를 총칭한 것으로 가장 일반적으로 알려진 alginate는 알긴산 나트륨 (sodium alginate)이며 그 밖에 산업적으로 중요한 역할을 가진 화합물은 alginate 그 자체 뿐만 아니라 알긴산 칼륨, 알긴산 암모늄 및 프로필렌 글리콜 알지네이트 (propylene glycol alginate, PGA)이다. alginate와 알긴산 나트륨을 제외하고 상업적으로 쓰여지는 알긴산 생성물은 점질성을 갖는 용액을 만드는 수용성 물질이다.

Alginate는 여러 효소에 의해서 4-o-linked glycosi-

재료 및 방법

β -elimination작용을 받아 불포화 uronic acid 유된 oligosaccharide의 형태로 분해된다 (And Turvey, 1977). 이와같은 반응 mechanism 의해서 pectin이 분해되는 반응과 유사하다 (Bam et al., 1975). Hydrolyase에 의해서 depolymerization이 일어날 수 있는 다른 polyuronide와는 다르게 alginate에서는 alginate를 depolymerize시키는 hydrolyase가 발견되지 않는 효소는 alginate lyase가 있으며 alginate lyase는 작용하는 부위의 당의 종류에 따라 2가지로 분류한다. 즉, 한 쪽 residue인 non-reducing bond가 β -D-mannuronate (mannuronate lyase)와 α -L-guluronate (guluronate lyase)인 경우이다 (Gacesa, 1988). 또한 polyguluronate lyase (EC 4.2.2.11)은 homopolymeric 1,4- α -L-guluronate만을, polymannuronate lyase (EC 4.2.2.3)은 homopolymeric 1,4- β -D-mannuronate만을 기질로 하는 특성을 보여주고 있다. 보고된 대부분의 alginate lyase는 manuronate block에 특이성이 있는 많은 guluronate block에 특이성이 있는 것보다 더 많은 연구가 이루어져 있는 것도 특징이다. 현재까지 발견된 alginate lyase는 매우 다양한 생물에서 보여 주고 있다. 갈조류 (Shiraiwa et al., 1975; Watanabe and Nishizawa, 1982), 연체동물 (Elyakova and Favorov, 1974; Nishizawa et al., 1968), 해양으로부터 분리한 곰팡이 (Wainwright and Sherbrock, 1981), 세균 (Boyd and Pes-Turvey, 1977; Davidson et al., 1976; Romeo and Wusteman, 1986; Stevens and Levin, 1977; Gacesa and Wusteman, 1990; Muramatsu and Sogi, 1990) 등으로 부터 정제하여 그 특성을 보고 하였다.

최근 본 연구실에서는 alginate를 분해하는 미생물을 분리하여 *Pseudomonas* sp.로 동정하였으며 이 균 으로부터 alginate lyase 유전자를 *Escherichia coli*에 cloning한 결과를 보고하였다 (Kong et al., 1995). 본 연구에서는 alginate lyase 유전자가 들어가 있는 *E. coli*로부터 재조합 alginate lyase를 정제하여 효소활성 에 영향을 미치는 온도, pH등과 기질의 친화력등을 조사하였다.

사용균 및 plasmid
 Alginate lyase생산균으로는 해양으로부터 분리한 *Pseudomonas* sp.를 사용하였으며 재조합 alginate lyase생산을 위한 균으로서 *E. coli* JM83, JM109를 사용 하였으며 plasmid는 본 연구실에서 cloning한 alginate lyase유전자가 들어가 있는 pKAL26 (4.3kb insert)를 사용하였다 (Fig. 1).

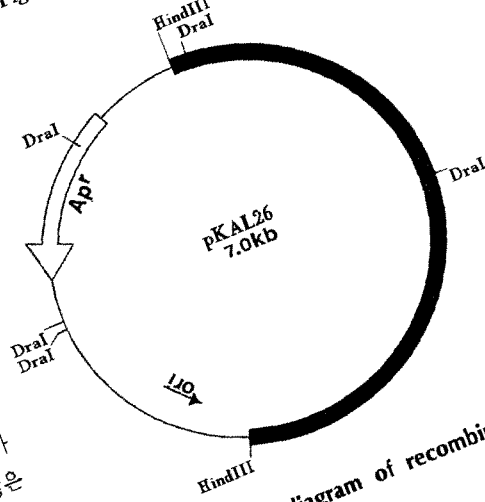


Fig. 1. Schematic diagram of recombinant plasmid DNA pKAL26.

효소 정제
 배양액 1l를 원심분리하여 균체를 얻은 후 50 mM phosphate buffer (pH 7.5)에 현탁시키고 sonicator로써 균체를 파쇄하였다. 원심분리하여 (8,000 xg, 30 min) cell debris는 버리고 상등액을 50 mM phosphate buffer (pH 7.5)로 평형화시킨 DEAE-Sepharose CL-6B column (2~15 cm)에 loading시킨다음 activity가 있는 fraction을 모아서 투석한 후 phosphate buffer로서 평형화된 HPLC에 loading함으로써 정제하였다. 이때 사용된 용액으로는 0~0.2 M NaCl이 포함된 50 mM phosphate buffer를 직선농도 구배 (linear gradient) 주어 elution하였다.

효소활성 측정

Kong 등이 사용한 방법에 따라 행하였다 (Kong et al., 1995).

분자량 측정

10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)는 Laemmli방법 (Laemmli, 1970)으로 실시하여 단백질의 정제와 분자량을 결정하였다. 단백질 분자량 측정을 위한 표준 단백질로는 lysozyme (14 KDa), trypsin inhibitor (21.5KDa), bovine carbonic anhydrase (31KDa), ovalbumin (45KDa), bovine serum albumin (66KDa), phosphorylase b (97KDa)를 사용하였다.

TEM (Transmission Electron Microscope) 관찰

E. coli (pKAL26) cell을 2.5% glutaraldehyde와 1% osmium tetroxide (OsO₄)로 2회 고정시킨 후 0.1 M phosphate buffer (pH 7.3)에서 cashing하였다. 에탄올 농도를 증가시키므로써 탈수시킨 후 Epon 수지에 흡착시켰다. 절단된 박편은 lead citrate와 uranylacetate로 염색한 다음 JEOL 1200 EXII로 조사하였다.

결과 및 고찰

재조합 단백질의 세포 내외의 분포 및 정제

E. coli JM83 (pKAL26) 재조합 균주에 의해서 생산되는 alginate lyase의 세포 내외의 분포는 Cornelis 등 (1982)의 방법에 따라 조사해 본 결과 Table 1과 같이 생산 효소의 98%가 세포내 분획에서 검출되었다.

E. coli 세포내에서 외래 유전자 산물이 축적될때 inclusion body형태로서 단백질이 aggregation되는 경

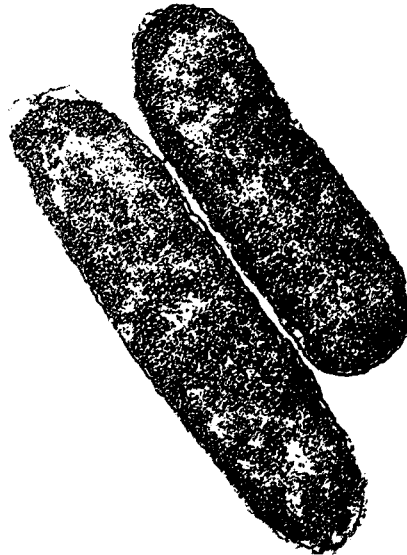


Fig. 2. TEM picture of *E. coli* JM83 (pKAL26) which produce alginate lyase.

우가 많기 때문에 이를 확인하기 위하여 전자 현미경으로 관찰하였다. Fig. 2에서 나타난 바와 같이 재조합 alginate lyase의 경우 inclusion body로 보이는 것을 찾아 볼수가 없었으며 이는 alginate lyase가 세포질내에서 soluble한 형태로 존재하고 있음을 보여주고 있다. *E. coli* JM83 (pKAL26)을 배양 후 얻은 균체를 초음파 파괴, DEAE-sepharose column chromatography, Mono Q column을 사용한 HPLC 방법으로 분자량이 40KDa인 정제된 단백질을 얻었다 (Fig. 3). 또한 Fig. 3에서 볼수 있듯이 재조합 alginate lyase의 expression은 *E. coli* 내에서 전체 단백질의 50%이상 대량 생산해 내는 고효율성을 보여주고 있다.

Table 1. Distribution of alginate lyase activity in *E. coli* JM83¹⁾ containing recombinant plasmid DNA

Plasmid	Alginate lyase activity ²⁾ in following fraction		
	Extracellular (%)	Periplasmic (%)	Cytoplasmic (%)
pKAL26	0	2 (2.2)	90 (97.8)
pUC9	0	0	0

¹⁾ *E. coli* strains were aerobically grown in 10 ml of L-broth for 18hr at 37°C

²⁾ One unit of activity was defined as the 0.001 increase of absorbance at 235 nm

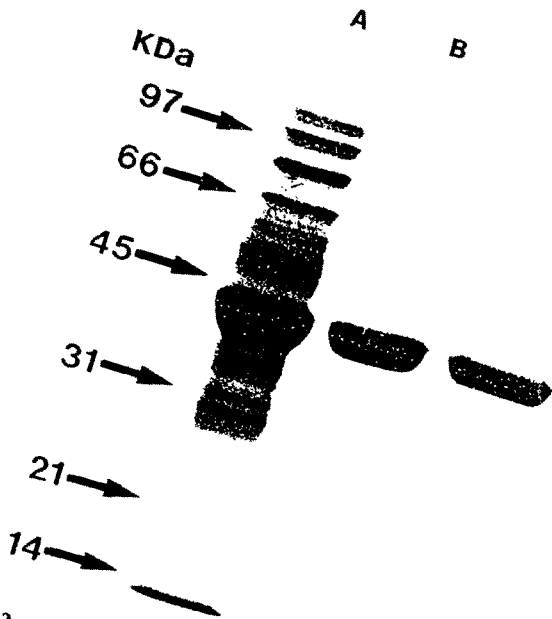


Fig. 3. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of alginate lyase.
 Lane A: Crude supernatant Lane
 B: Ion-exchange chromatography on DEAE Sepharose CL-6B Lane
 C: Anion exchange HPLC using Mono Q column

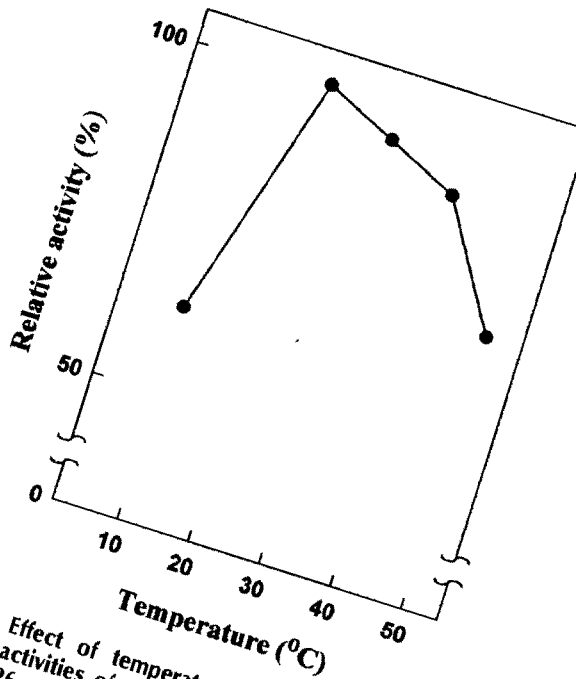


Fig. 4. Effect of temperature on alginate lyase activities of *E. coli* JM83 containing pKAL26.

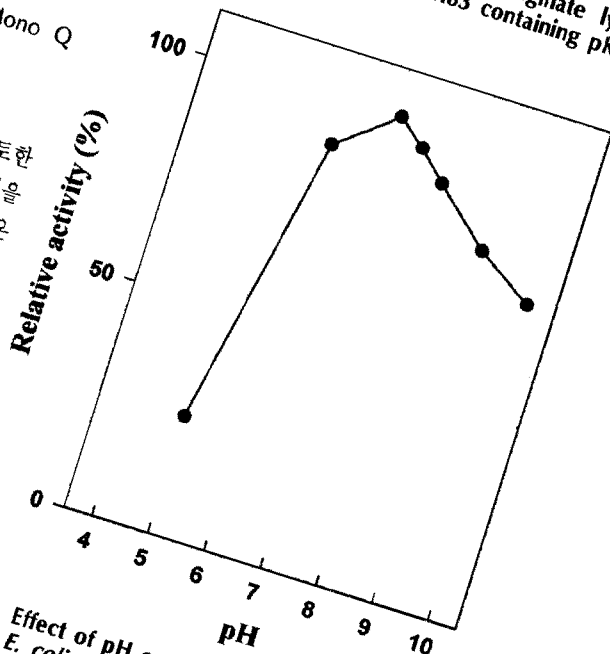


Fig. 5. Effect of pH on alginate lyase activities of *E. coli* JM83 containing pKAL26.

최적온도 및 pH
 재조합 alginate lyase의 활성 최적 온도를 검토한 결과 Fig. 4에서와 같이 20°C에서 최대 효소 활성을 보여 주었다. 일반적으로 육상 세균의 최적 생육 온도인 30~37°C에서도 약 90% 이상의 활성을 지니고 있으나 20°C가 최적 온도를 보여주는 것은 alginate lyase 유전자를 갖는 원균주가 해양으로부터 분리한 *Pseudomonas* sp. 이었고 이 균의 서식 환경인 해양의 평균 온도에 해당되고 있다는 점에서 해양 미생물 유래의 유전자임을 보여주고 있다.
 이 pH 7 부근에서 최대 활성을 나타내었으며 pH가 5 이하일 때는 활성이 매우 낮음을 알 수 있었다. 그러나 알칼리성인 pH 10에서도 70% 정도의 활성을 유지하는 것으로 나타나 cloning된 alginate lyase는 산성, 중성, 알칼리성 영역에서 적절한 효소 활성을 나타내는 것으로 사료된다.

Alginate lyase의 기질에 대한 kinetics
 기질인 alginate에 대한 반응 속도 정수 (K_m)와 최

대 반응 속도 (V_{max})를 측정하기 위하여 low viscosity alginate를 기질로 하여 반응 후 Lineweaver-Burk식에 따라 구하였다. Fig. 6에 나타난 바와 같이 K_m 값은 0.4% V_{max} 값은 625 unit/mg이었다.

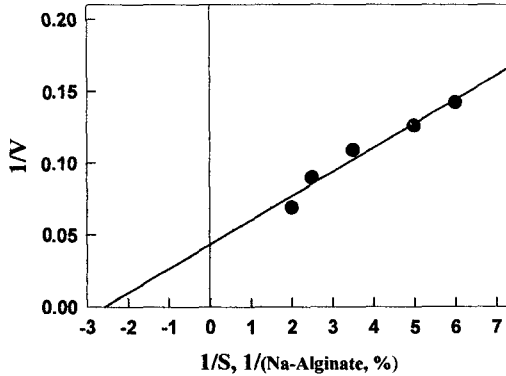


Fig. 6. Lineweaver-Burk plot of cloned alginate lyase (pKAL26).

요 약

해양으로부터 alginate lyase분해능이 있는 *Pseudomonas* sp.을 분리하여 이 균으로부터 alginate lyase 유전자를 *E. coli*에 cloning 하여 재조합 alginate lyase의 특성을 검토하였다.

재조합 alginate lyase는 *E. coli*내에서 50% 이상이 expression되었다. 또한 생산된 재조합 alginate lyase는 세포외로의 분비가 없었으며, 전자현미경으로 확인한 결과 대부분이 inclusion body를 형성하지 않고 세포질내에서 soluble한 형태로 존재하고 있는 것으로 나타났다. 활성을 나타내는 최적 조건은 온도 20°C, pH 7.0으로 보여주고 있으며 기질에 대한 K_m 값은 0.4%, V_{max} 는 625 unit/mg이었다.

감사의 글

이 연구는 교육부 기초과학 연구소 1995년도 교육부 기초과학 육성 연구비 지원에 의한 것입니다 (BSRI-95-4410).

References

- Basham, H. G. and D. F. Bateman. 1975. Relationship of cell death in plant tissue treated with a homogeneous endopectate lyase to cell wall degradation. *Physiol. Plant Pathol.* 5, 249~262.
- Boyd, J. and T. R. Turvey. 1977. Isolation of a poly- α -L-gulonate lyase from *Klebsiella aerogenes*. *Carbohydrate Res.* 57, 163~171.
- Cornelis, P., C. Digneffe and K. Willinot. 1982. Cloning and expression in *Escherichia coli*, *Mol. Gen. Genet.*, 86, 507.
- Davidson, I. W., Sutherland, I. W. and C. J. Lawson. 1976. Purification and properties of an alginate lyase from marine bacterium. *J. Biochem.* 159, 707~713.
- Elyakova, L. A. and V. V. Favorov. 1974. Isolation and certain properties of alginate lyase VI from the mollusc *Littorina* sp. *Biochem. Biophys. Acta.* 358, 341~354.
- Gacesa, P. 1988. Alginates. *Carbohydrate Polymers*, 8, 161~182.
- Gacesa, P. and F. S. Wusteman. 1990. Plate assay for simultaneous detection of alginate lyase and determination of substrate specificity. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2265~2267.
- Haug, A. and B. Larsen. 1962. Quantitative determination of the uronic acid composition of alginate. *Acta Chem. Scand.* 16, 1908~1918.
- Haug, A., Larsen, B. and O. Smidarod. 1967. Structure on the sequence of uronic acid residues in alginic acid. *Acta Chem. Scand.* 21, 691~704.
- Haug, A., Myklestad, S., Larsen, B. and O. Smidarod. 1967. Correlation between chemical structure and physical properties of alginates. *Acta Chem. Scand.* 21, 768~778.
- Kong, I. S., Kim, Y. O., Kim, J. M., Kim, S. K., Oh, D. H., Yu j. H. and J. Y. Kong. 1995. Alginate lyase production of halophilic *Pseudomonas* sp. by recombinant *Escherichia coli*. *J. Micorobiol. Biotech.* 5 (2), 92~95.

- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*. 227, 680.
- Muramatsu, T. and T. Sogi. 1990. Characterization of alginate lyase from marine bacterium. *Comp. Biochem. Physiol.* 978, 103~108.
- Nisizawa, K., Fujibayashi, S. and S. Kashiwabara. 1968. Alginate lyase in the hepatopancreas of a marine mollusc *Dolabella auricula*. *J. Biochem.* 64, 25~37.
- Rees, D. A. 1972. Shapely polysaccharides. *J. Biochem.* 126, 257~273.
- Romeo, T. and F. Peston. 1986. Purification and structural properties of an extracellular (1-4)- β -D-Mannuronan-specific alginate lyase from a marine bacterium. *Biochemistry* 25, 8285~8391.
- Shiraiwa, Y., K. Abe, S. F. Sasaki, J. Ikawa and K. Nishizawa. 1975. Alginate lyase activities in the extracts from several brown algae. *Bot. Mar.*, 18, 97~104.
- Stevens, R. A. and R. E. Levin. 1977. Purification and characteristics of an alginate from *Alginobrio aquatilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 33, 1156~1161.
- Wainwright, M. and V. Sherbrock-Cox. 1981. Factors influencing alginate degradation by marine fungi; *Dendryphiella salina* and *D. arenario*. *Bot. Mar.* 24, 489~491.
- Watanabe, T. and K. Nishizawa. 1982. Enzymatic studies on alginate lyase from *Undaria pinnatifida* in relation to texture-softening prevention by ash-treatment (Haiboshi). *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 48, 243~249.

1996년 6월 13일 접수

1996년 9월 3일 수리