

Pseudomonas sp. Aryl Acylamidase의 정제 및 성질

황인균¹ · 방원기*

¹한국식품의약품안전청, 고려대학교 자연자원대학 응용생명환경화학과

Purification and Characterization of Aryl Acylamidase from *Pseudomonas* sp. Hwang, In-Gyun¹ and Won-Gi Bang*. ¹Department of Food, Korea Food and Drug Administration, Seoul 122-704, Korea, Department of Agricultural Chemistry, Korea University, Seoul 136-701, Korea - Aryl acylamidase [EC 3.5.1.13] present in an acetaminophen-assimilating *Pseudomonas* sp. has been purified to a homogeneity using series of ammonium sulfate fractionation, DEAE-Sephacel anion exchange, Phenyl-Sepharose CL-4B hydrophobic, and Sephadex G-100 gel-permeation chromatography. The molecular weight, which was estimated by gel-permeation filtration and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, was about 57 kDa and 56 kDa, respectively, indicating that this enzyme is a monomeric protein. The optimum pH was 10.5 and the optimum temperature was 40°C. After incubation of the enzyme at 50°C for 30 min, residual activity of the enzyme was 34% compared to its original activity. The Km values for acetaminophen and 4'-nitroacetanilide were 0.10 mM and 0.11 mM, respectively.

Key words: aryl acylamidase, *Pseudomonas* sp.

Aryl acylamidase(Aryl-acylamide amidohydrolase [EC 3.5.1.13]는 N-acyl 일차 방향족 amine류(anilide)를 가수분해하여 carboxylic acid anion과 aniline을 형성하는 효소이다. 이 효소는 병아리 신장 미토콘드리아에서 처음으로 발견한 이후[26], 동물 조직[7-9, 20, 22], 식물조직[6, 18] 및 곤충조직[10] 등에서 연구되어 왔다. 미생물에 있어서의 aryl acylamidase에 관한 연구는 두 가지 방향으로 나뉘어진다. 첫째는, 여러가지 제초제의 변환 및 이와 관련된 aryl acylamidase에 대한 연구로서 토양중에서의 이들 제초제들의 분해와 관련된 연구이며 [21, 24, 29, 32], 두번째로는 acylanilide 약품류를 포함한 N-acyl 일차 amine류의 정량에 사용하고자 하는 연구이다[15, 27]. Acetanilide를 유일한 탄소원 및 질소원으로 이용하는 *Pseudomonas striata*의 돌연변이주로부터 aryl acylamidase를 추출하였으며[19], *Pseudomonas acidovorans* AE1으로부터 acetanilide 가수분해 효소를 분리하여 분자량 및 효소적 특성을 관찰하였다[1, 2]. 또한, Gram 양성균인 *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* NCIB 10803[12]과 *Rhodococcus* sp.[23]에서도 aryl acylamidase의 활성이 보고되었다. Acylanilide을 유일한 탄소원으로서 이용할 수 있는 *Ps. fluorescence* ATCC 39004를 토양에서 분리하였으며, 이 균주로부터 aryl acylamidase를 분리하여 그 특성에 대해 조사하였다 [13]. *Ps. fluorescens* ATCC 39005와 *Ps. putida* ATCC

39004를 유도 물질로서 N-acylaniline(acetanilide류)을 0.05~0.15%(w/v) 포함하는 배지에서 배양하여 aryl acylamidase를 생산하였다[14]. 최근에는, acetaminophen을 유일한 탄소원 및 에너지원으로 이용할 수 있는 *Rhodococcus erythropolis* NCIB 12273을 분리하여, 효소의 유도물질로서 acetanilide 0.15%(w/v)를 포함하는 tryptone soy broth에서 배양함으로써 aryl acylamidase를 생산하고자 하였다.

본 연구에서는 상기와 같이 임상화학에서 acetaminophen 등의 acylanilide류의 진단용 시약으로 사용하는 aryl acylamidase를 생산하기 위하여 토양으로부터 효소 생산 미생물을 분리하여 효소적 특성을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

본 실험에 사용한 균주는 경상남도 창원시 창원공단 소재의 하천에서 채취한 토양으로부터 분리한 acetaminophen 자화성 세균이다. 균주 분리용 배지는 0.1%(w/v) acetaminophen을 함유하는 Vaughan 등[30]의 최소배지를 약간 변형하여 사용하였다. 균주 선별을 위한 배지는 acetaminophen 대신 0.1%(w/v)의 acetanilide를 함유하는 최소배지를 사용하였다. 선별균주의 전배양배지로는 1%(w/v) tryptone, 0.5%(w/v) yeast extract 및 1%(w/v) NaCl을 함유하는 Luria-Bertani(LB) 배지를 사용하였으며, 균체 수확용 배지로는 0.1%(w/v) acetanilide를 함유하는 1%(w/v) tryptone broth를 사용하였다.

*Corresponding author
Tel. 82-2-3920-3022, Fax. 82-2-925-1970
E-mail: agrchem@kucenx.korea.ac.kr

Aryl acylamidase 효소 생산균주의 분리 및 선별

Aryl acylamidase의 활성이 높은 균주를 토양으로부터 분리하기 위하여, 유일한 탄소원 및 에너지원으로 0.1%(w/v) acetaminophen을 함유하는 균주 분리용 최소 배지에 토양 현탁액을 가하고 30°C에서 3일간 진탕 배양(200 rpm/min)한 후, streak-plate법으로 균주를 순수 분리하였다. 분리한 균주를 0.1%(w/v) acetanilide를 함유하는 최소 배지에 접종한 후, 30°C에서 24시간 진탕배양한 다음 균체를 수확하여, 25 mM Tris-Cl(pH 7.5) 완충액 5 ml에 현탁하여 sonication하여 파쇄한 다음 원심분리하여 조효소액을 얻은 후 aryl acylamidase 활성이 우수한 균주 12종을 1차 선별하였다. 선별된 균주들중에서 열안정성(50°C, 30 min)이 높은 효소를 지니는 균주를 최종 선별하여, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(8th Ed.)[28]에 의해 동정하였다.

Aryl acylamidase 효소 활성의 측정

Aryl acylamidase의 효소 활성 측정은 기질로 acetaminophen을 사용하여 Hammond 등[16]과 Best 등[4]의 discontinuous method에 따라 활성을 측정하였으며, 각기 다른 기질인 4'-nitroacetanilide[13], acetanilide[17], phenacetin[2] 및 acetamide[31]에 대한 효소 활성은 각각의 가수분해물을 정량하여 측정하였다. 분리균주의 aryl acylamidase 효소활성을 확인하기 위하여 기질로서 10 mM의 acetaminophen과 1 mM의 ascorbic acid, 25 mM Tris-Cl 완충액(pH 8.6)으로 구성된 반응 혼합액 25 ml에 조효소액 25 단위를 가하여 30°C 항온수조에서 3시간 반응시킨 후 반응액에 생성된 p-aminophenol을 Gotelli 등[11]의 방법에 따라 high performance liquid chromatography(HPLC)로 분석하여 정성적으로 확인하였다.

Aryl acylamidase 효소 활성 1 단위는 30°C에서 1분 동안에 기질 1 μ mole의 acetaminophen을 가수분해하는 효소의 양으로 정의하였으며, 효소의 비활성은 1 mg의 단백질당 효소 활성의 단위수로 정의하였다.

단백질은 표준 단백질로 bovine serum albumin을 사용하여 280 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하거나 혹은, Bradford[5]의 Coomassie brilliant method를 사용하여 595 nm에서의 흡광도를 측정하여 정량하였다.

Aryl acylamidase의 정제

Aryl acylamidase의 모든 정제 단계는 4°C의 cold chamber에서 수행하였다.

조효소액의 조제 생균체 6 g을 50 mM glucose와 10 mM EDTA를 함유하는 25 mM Tris-Cl(pH 8.0)의 lysis buffer 50 ml에 4°C에서 현탁한 후, lysozyme(58,000 unit/mg) 40 μ g/ml를 가하여 30°C의 진탕기에서 30분

간 용균하였다. 용균후 15분간 원심분리(8,000 \times g)한 후 상등액을 취하여 조효소액으로 사용하였다.

Ammonium sulfate 분별 침전 얻어진 조효소액은 4°C에서 (NH₄)₂SO₄로 25~65%로 포화시켜 침전된 단백질을 30 ml의 25 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5)에 현탁한 후 동일한 완충용액으로 6시간 동안 2회 투석하였으며, 투석된 효소액을 12,000 \times g에서 15분간 원심분리하여 상등액을 취하였다.

DEAE-Sephacel anion exchange chromatography 얻어진 효소액은 1 mM의 mercaptoethanol과 0.2 mM의 EDTA를 함유하는 10 mM Tris-HCl(pH 7.5) 완충액으로 평형된 130 ml DEAE-Sephacel(fast flow) 컬럼(3.0 \times 18.5 cm)에 loading하여 흡착시킨 후 완충액으로 충분히 세정한 다음 800 ml로 0~0.5 M까지의 KCl로 gradient를 걸어 30 ml/hr의 용출속도로 용출하였다. 용출된 100개 분획중 활성이 있는 10개의 분획(13.0 ml/분획)을 모아 Amicon UF 8010(Amicon사, 미국)으로 농축 및 탈염하였다.

Hydrophobic interaction chromatography 얻어진 효소액은 30%(v/v) isopropanol로 세정한 후 다시 증류수로 세정한 다음, 100 mM Tris-Cl(pH 7.5) 완충액으로 평형된 15 ml의 Phenyl-Sepharose CL-4B 컬럼(2.0 \times 5.0 cm)에 200 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5)로 1:1로 희석하여 loading하여 흡착시킨 다음, 10 bed volume의 동일 완충액으로 세정하고, 600 ml로 100~5 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5)의 gradient를 걸어 효소를 용출하였다(용출속도 10 ml/hr). 용출된 75개 분획중 활성이 높은 분획(10.0 ml/분획)을 모아 Amicon UF 8010(Amicon사, 미국)으로 농축 및 탈염하였다.

First gel-permeation chromatography 얻은 농축 효소액을 0.1 M KCl과 1mM mercaptoethanol을 함유하는 25 mM Tris-Cl 완충액으로 평형된 255 ml의 Sephadex G-100 컬럼(1.9 \times 90 cm)에 loading하여 통과시켰으며, 용출 속도는 5 ml/hr이었다. 용출된 분획(3.4 ml/분획)중 활성이 높은 분획을 모아 Amicon UF 8010(Amicon사, 미국)으로 농축 및 탈염하였다.

Second gel-permeation chromatography 얻은 농축 효소액을 동일한 방법으로 255 ml의 Sephadex G-100 컬럼(1.9 \times 90 cm)에 loading하여 통과시켰으며, 용출 속도는 5 ml/hr이었다. 용출된 분획(6.0 ml/분획)중 활성이 높은 분획을 모아 농축 및 탈염하여 정제하였다.

Aryl acylamidase의 분자량 측정

Native aryl acylamidase의 분자량을 측정하기 위하여 Andrews[3]의 방법에 따라 Sephadex G-100 컬럼에 의한 gel-permeation chromatography를 수행하였으며, aryl acylamidase의 subunit의 분자량은 Neville[25]의

방법에 따라 SDS-PAGE에 의해 결정하였다. 사용한 표준 단백질은 bovine serum albumin(66 kDa), egg albumin(45 kDa), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(36 kDa), carbonic anhydrase(29 kDa)이었다.

결과 및 고찰

Aryl acylamidase 생산 균주의 분리 및 선별

Aryl acylamidase를 생산할 수 있는 균주를 토양으로부터 분리하기 위하여 유일한 탄소원 및 에너지원으로서 acetaminophen을 첨가하여 배양한 결과, 미생물 130여종을 하천토양으로부터 순수분리하였으며, 배양액은 acetaminophen의 가수분해 결과 생성된 *p*-aminophenol로 인해 배양액 및 고체배지가 진한 갈색으로 변화하였다. 이들 순수분리 균주들중 생육 속도가 상대적으로 빠른 균주들을 선별하기 위하여 유도물질 및 유일한 탄소원으로 acetaminophen 대신 같은 anilide류인 acetanilide를 0.1%(w/v) 함유하는 액체 최소배지 상에서 18시간 배양하여 생육이 우수한 균주 7종을 일차로 선별하였다. 일차로 선별된 균주들을 다시 동일한 방법으로 배양한 후 각각의 균주들의 생육 정도 및 aryl acylamidase의 비활성과 30℃에서의 열안정성을 비교하였다. 그 결과 Table 1의 결과와 같이 생육은 HL-033, 비활성은 HL-057이 우수하였다. 그러나 aryl acylamidase는 산업적으로 사용되기 위해서는 효소 정제시 및 저장, 보관시의 안정성을 지녀야 한다. 따라서 배양한 균체로부터 얻은 조효소액을 30℃에서 12시간 동안 처리한 후 잔존활성을 측정함으로써 분리균주가 생산하는 aryl acylamidase의 열안정성을 시험하였다. 그 결과 다른 균주에 비해 생육속도가 다소 낮은 HL-026만은 각각 97.84%의 잔존활성을 나타내어 열에 안정한 것으로 판단되었

Table 1. Cell growth and enzyme activity and thermal stability of aryl acylamidase of microorganisms isolated from soils

| Strains | Cell growth ¹ (O.D., 600 nm) | Specific activity (U/mg) | | Residual activity ratio ² (%) |
|---------|--|-----------------------------|-------|---|
| | | 0 hr | 12 hr | |
| HL-026 | 0.396 | 0.693 | 0.678 | 97.84 |
| HL-033 | 0.506 | 0.847 | 0.049 | 5.78 |
| HL-035 | 0.432 | 1.125 | 0.033 | 2.93 |
| HL-037 | 0.456 | 0.841 | 0.188 | 22.35 |
| HL-054 | 0.478 | 0.820 | 0.103 | 12.56 |
| HL-055 | 0.468 | 0.948 | 0.072 | 7.56 |
| HL-057 | 0.462 | 1.246 | 0.240 | 19.26 |

1. The isolates were cultivated for 18 hrs at 30℃ in the basal medium containing 0.1%(w/v) of acetanilide.
2. Residual activities were assayed after the treatment for 12 hrs at 30℃.

으며, HL-026주를 최종적으로 선별하여, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(8th. Edition)[28]에 의해 *Pseudomonas* sp.로 부분 동정하였다(Table 2).

증식세포의 생육 및 aryl acylamidase 활성의 경시적 변화

Aryl acylamidase의 활성이 높은 *Pseudomonas* sp. HL-026의 균체를 수확하기 위하여 유도물질로서 0.1%(w/v)의 acetanilide를 함유하는 1%(w/v) tryptone broth에 접종한 후 30℃에서 진탕배양하면서 시간의 경과에 따른 균체의 생육 및 aryl acylamidase의 효소활성의 변화를 관찰하였다. Fig. 1과 같이 균체의 생육은 배양 개시 14시간 후에 정지기에 도달하였다. 반면 aryl acylamidase의 활성은 대수 증식기 시작부터 유도되기 시작하여 대수 증식기 중기인 10시간 후에 활성이 최고치인 1.03 U/ml(비활성 2.41 U/mg protein)에 도달하였으며, 그후 점차 감소하였다. 따라서 이후의 실험에서는

Table 2. Physiological and biochemical characteristics of the strain HL-026 isolated from soils

| Characteristics | HL-026 |
|---|--------|
| Morphological characteristics | |
| Motility | + |
| Shape | rod |
| Gram test | - |
| Assimilation of carbon compounds | |
| D-Glucose | + |
| D-Mannose | + |
| L-Sorbose | - |
| D-Melibiose | + |
| Lactose | - |
| Sucrose | + |
| D-Fructose | - |
| L-Arabinose | - |
| D-Ribose | + |
| D-Arabinose | + |
| Citric acid | + |
| Succinic acid | + |
| D-Gluconate | + |
| Mannitol | + |
| Acetic acid | + |
| Physiological characteristics | |
| Oxidase | + |
| Catalase | + |
| Oxygen requirement | aerobe |
| Reduction of nitrates to nitrite | - |
| Methyl red test | - |
| Starch hydrolysis | -+ |
| Gelatin hydrolysis | - |
| Indole production | + |
| Glucose acidification | - |
| Urease test | - |

+ positive; - negative.

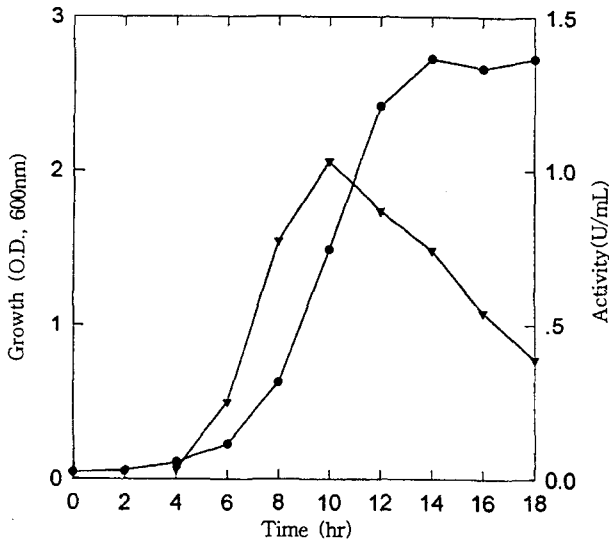


Fig. 1. Growth and aryl acylamidase production of *Pseudomonas* sp. HL-026. *Pseudomonas* sp. HL-026 was cultivated at 30°C in 1% (w/v) tryptone broth containing 0.1% (w/v) acetanilide.

●●, Growth; ▼▼, Activity.

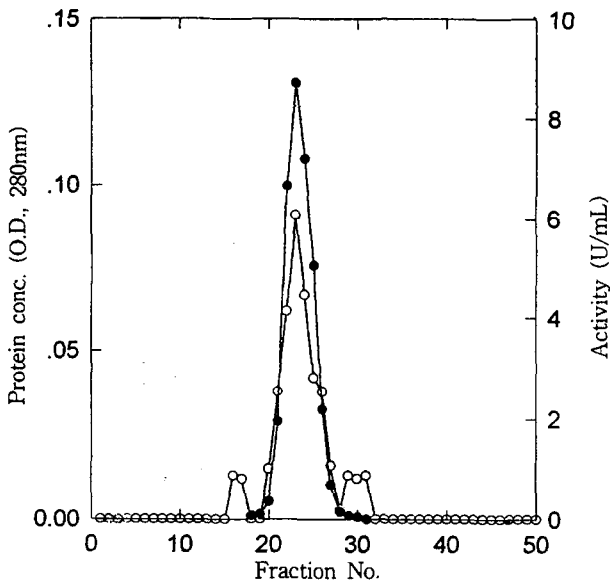


Fig. 2. Second gel-permeation chromatography of aryl acylamidase on Sephadex G-100 column.

Enzyme solution (3.0 ml) was applied on top of a column (1.9 × 90 cm) of Sephadex G-100 which had been equilibrated with 25 mM Tris-Cl buffer (pH 7.5), containing 0.1 M KCl and 1 mM 2-mercaptoethanol. The enzyme was eluted with the same buffer at a flow rate was 5 ml per hr and fractions of 6.0 ml were collected. ○○, Protein conc. (O.D., 280 nm); ●●, Activity.

aryl acylamidase의 활성이 최대인 배양시간 10시간 후에 균체를 수확하여 -80°C에 보관하면서 사용하였다.

Aryl acylamidase의 정제

균체 6g으로부터 얻은 조효소액을 재료 및 방법에서 언

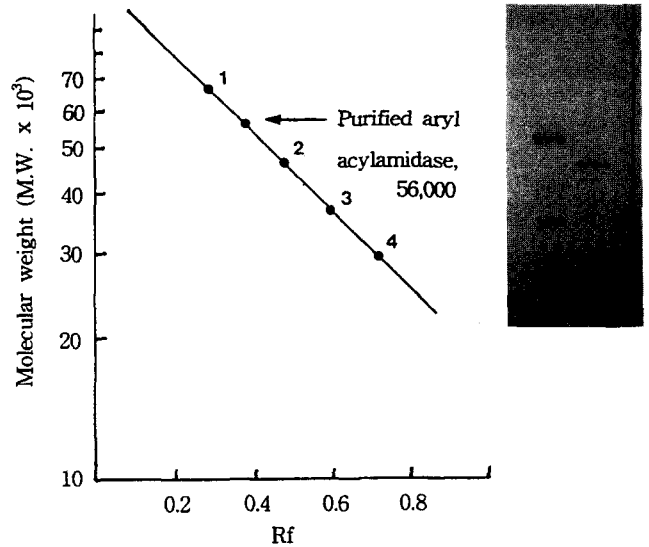


Fig. 3. Estimation of subunit molecular size of the purified aryl acylamidase by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

Electrophoresis was performed on 10% polyacrylamide gel in the presence of SDS.

The standard proteins used were the following :

1. Albumin, bovine serum, 66,000
2. Albumin, egg, 45,000
3. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 36,000
4. Carbonic anhydrase, 29,000

급한 바와 같이 정제하였으며, Sephadex G-100 column 상에서의 용출 pattern은 Fig. 2와 같다. 이 때까지의 정제 결과 정제 수율 17.73%로 조효소액에 비하여 17.44배 정제된 효소액을 얻을 수 있었다. 상기의 과정을 거쳐 Fig. 3와 같이 단일 band의 효소 단백질을 얻을 수 있었다. 정제 과정의 결과는 Table 3과 같으며, 정제 결과 수율은 11.24%였으며, 조효소액에 비하여 57.37배 정제된 138.27 U/mg의 specific activity를 지니는 효소를 얻었다.

Aryl acylamidase의 분자량 및 subunit 조성

정제된 aryl acylamidase의 subunit의 분자량은 Fig. 3에서와 같이 56 kDa으로 확인되었으며, Sephadex G-100(1.9 × 90 cm) column을 이용하여 native aryl acylamidase 분자량을 측정된 결과 57 kDa으로 추정하였다(Fig. 4). 따라서 SDS-PAGE 상의 분자량과 native 효소의 분자량이 거의 동일한 것으로 보아 본 효소는 단일 subunit로 구성된 효소로 판단되었다. 이같은 결과는 *Ps. fluorescens* ATCC39004[13]의 52.5 kDa보다는 조금 큰 수치였으며, *Ps. acidovorans* AE1[1]의 57.5 kDa과는 유사한 수치였다.

효소의 일반적 성질

효소활성에 미치는 pH의 효과 일반적으로 aryl acylamidase는 알칼리성에서 활성이 높은 것으로 알려져 있다[13, 24, 30]. 본 실험에서는 중성에서 pH 11.5까

Table 3. Purification of aryl acylamidase from *Pseudomonas* sp. HL-026

| Sample | Volume (ml) | Total protein (mg) | Total activity (U) | Yield (%) | Specific activity (U/mg) | Purification (fold) |
|-----------------------|-------------|--------------------|--------------------|-----------|--------------------------|---------------------|
| Crude extract | 95.0 | 657.86 | 1586.30 | 100 | 2.41 | 1 |
| Ammonium sulfate | 61.5 | 472.42 | 1274.62 | 83.35 | 2.70 | 1.12 |
| DEAE-Sephacel | 39.7 | 139.27 | 689.94 | 43.49 | 4.95 | 2.05 |
| Phenyl-Sepharose | 7.4 | 6.69 | 281.24 | 17.73 | 42.04 | 17.44 |
| First Sephadex G-100 | 2.7 | 2.14 | 201.44 | 12.70 | 94.13 | 39.66 |
| Second Sephadex G-100 | 2.0 | 1.29 | 178.37 | 11.24 | 138.27 | 57.37 |

Six grams of wet weight cells were used for the purification.

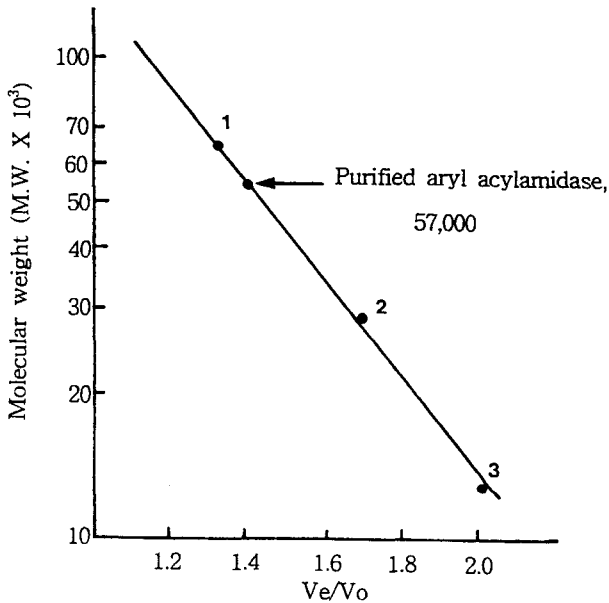


Fig. 4. Estimation of the molecular weight of purified aryl acylamidase by Sephadex G-100 gel filtration. The column (1.9×90 cm) was equilibrated with 25 mM Tris-Cl buffer at pH 7.5

The standard proteins used were the following :

1. Albumin, bovine serum, 66,000
2. Carbonic anhydrase, 29,000
3. Cytochrome C, 12,400

지 pH에 따라 각각 같은 100 mM의 phosphate, Tris-Cl, borate buffer를 사용하여 효소 반응에 미치는 pH의 영향을 관찰하였으며, 그 결과를 Fig. 5에 나타내었다. HL-026의 aryl acylamidase는 중성에서 알칼리성으로 갈수록 효소의 활성이 증가하였으며, pH 10.5에서 최대의 활성을 나타내어 상기 보고들과 일치함을 나타내었다.

효소 활성에 미치는 반응 온도의 영향 본 실험에서는 효소의 활성에 미치는 반응 온도의 영향을 조사하였다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 효소 반응의 속도는 온도가 증가할수록 증가하여 40℃에 이르러 최대에 도달하였으며, 40℃ 이후에는 급격히 감소하였다.

효소의 열안정성 효소의 열 안정성을 조사하기 위하여 동일한 농도의 완충용액내에서 30, 40, 50, 60℃의 온

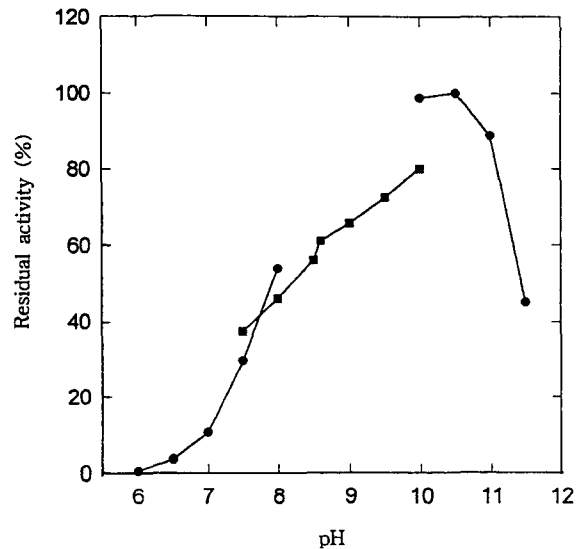


Fig. 5. Effect of pH on the activity of aryl acylamidase from *Pseudomonas* sp. HL-026.

The activity was measured with acetaminophen as the substrate at different pHs. The pHs were adjusted with 100 mM potassium phosphate for pH 6~8, 100 mM Tris-Cl for pH 7.5~10, and 100 mM sodium borate/NaOH for pH 10~11.5.

도에서 1시간 동안 처리하면서 열처리가 효소의 안정성에 미치는 영향을 관찰하였다. 그 결과 Fig. 7와 같이 효소는 60℃에서 10분만에 완전히 불활성화되었으며, 50℃에서는 30분 후에 약 34%정도의 활성만이 남았고, 40℃에서는 비교적 안정하여 1시간 동안의 열처리에도 약 75% 정도의 활성이 남아 있었다.

효소 활성에 미치는 금속이온의 영향 효소활성에 미치는 각종 금속이온들의 영향을 조사하기 위하여 반응액 내에 여러가지 2가 금속이온을 1 mM씩 첨가하여 효소 활성에 미치는 영향을 대조구와 비교하였다. 효소 활성은 Ag⁺, Cd²⁺, Hg²⁺에 의해서 완전히 저해되고, 그밖에 Zn²⁺, Pb²⁺, Fe²⁺에 의해서도 저해되었다. 이와 같은 결과는 Hammond 등[13]의 결과와 일치하였다.

Kinetic studies

Pseudomonas sp. HL-026에서 순수분리한 aryl acyl-

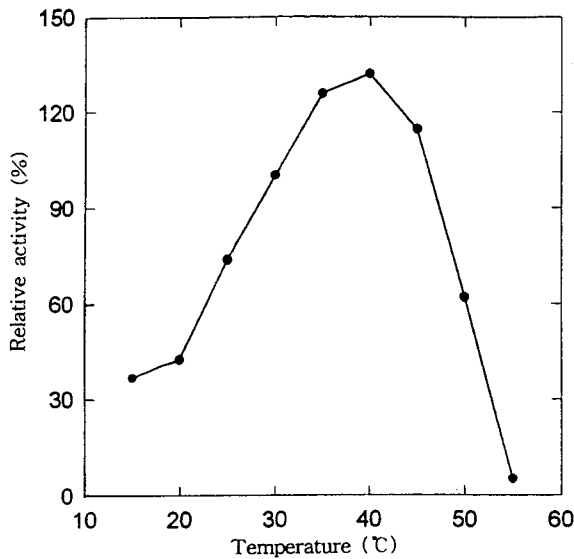


Fig. 6. Effect of temperature on the activity of aryl acylamidase activity from *Pseudomonas* sp. HL-026.
The activity was measured with acetaminophen as the substrate at the indicated temperature.

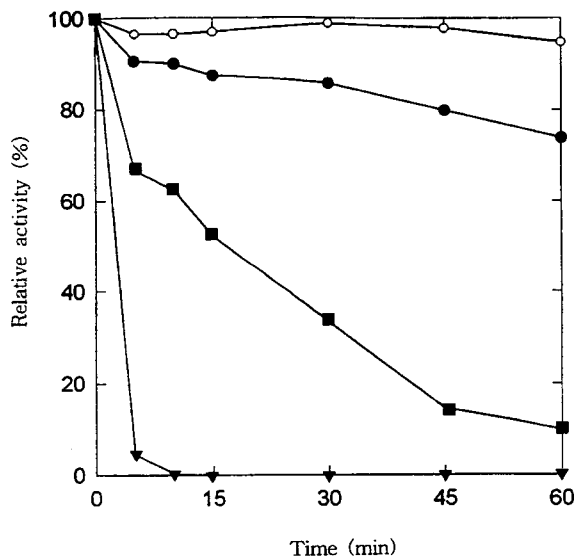


Fig. 7. Thermal inactivation of aryl acylamidase from *Pseudomonas* sp. HL-026.
The thermal inactivation of the enzyme was investigated at the following temperature: 30°C (○), 40°C (●), 50°C (■), and 60°C (▼). The enzyme activity was measured in the presence of acetaminophen as the substrate.

amidase의 여러가지 anilide류 기질에 대한 특이성이 조사되었다. 각 anilide류에 대한 기질친화력(Km)을 Lineweaver-Burk plot로부터 측정하였으며, 각 기질에 대한 특이성을 Table 4에 나타내었다. Acetaminophen에 대한 Km은 0.10 mM로 나타났으며, 4'-nitroacetanilide, acetanilide, phenacetin에 대한 Km은 각각 0.11 mM, 16.81 mM, 14.68 mM로 나타나 acetaminophen과

Table 4. Kinetic parameters of aryl acylamidase from *Pseudomonas* sp. HL-026

| Substrate | Km (mM) | V _{max} (μmole/mg/min) | V _{max} /Km × 10 ³ |
|---------------------|---------|---------------------------------|--|
| Acetaminophen | 0.10 | 144 | 1.40 |
| 4'-Nitroacetanilide | 0.11 | 162 | 1.53 |
| Acetanilide | 16.81 | 1161 | 0.07 |
| Phenacetin | 14.68 | 2879 | 0.20 |

4'-nitroacetanilide에 대한 친화력이 좋은 것으로 나타났다. Vaughan 등[30]에 따르면 일반적으로 임상적으로 혈장에서 acetaminophen의 중요한 농도는 0에서 3 mM 사이였으므로 HL-026의 aryl acylamidase의 Km값 0.10 mM은 acetaminophen의 임상 진단용으로 사용하기 충분한 것으로 생각된다.

또한 Table 4의 결과에서와 같이 V_{max}/Km을 각각의 기질에 대해 구하였을 때 4'-nitroacetanilide가 가장 높았으며, acetaminophen도 다른 두 기질에 비해 매우 높게 나타났다. 따라서 4'-nitroacetanilide와 acetaminophen은 aryl acylamidase에 대해 매우 적합한 기질로 작용하는 것을 알 수 있었다.

요 약

Acetaminophen 자화성 *Pseudomonas* sp.에 존재하는 aryl acylamidase[EC 3.5.1.13]는 ammonium sulfate fractionation, DEAE-Sephacel anion exchange chromatography, Phenyl-Sepharose CL-4B hydrophobic interaction chromatography 및 Sephadex G-100 gel-permeation chromatography를 통해 순수 정제되었다. 정제된 효소는 SDS-PAGE 상에서 분자량을 측정한 결과 56 kDa, Sephadex G-100 gel-permeation chromatography로 측정한 결과 57 kDa이었으며, 따라서 단일한 subunit로 구성된 효소이었다. 정제된 효소의 최대 활성을 위한 pH와 온도는 각각 pH 10.5와 40°C이었다. 50°C에서 30분간 처리시 34%의 잔존활성을 나타내었다. Acetaminophen과 4'-nitroacetanilide에 대한 Km값은 각각 0.10 mM과 0.11 mM 이었다.

감사의 글

이 논문은 한국과학재단의 핵심전문과제(961-0605-041-2)에 의해서 이루어진 것이며, 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Alt, J., E. Heymann, and K. Krisch. 1975. Characterization

- of an inducible amidase from *Pseudomonas acidovorans* AE1. *Eur. J. Biochem.* **53**: 357–369.
2. Alt, J., K. Krisch, and P. Hirsch. 1975. Isolation of an inducible amidase from *Pseudomonas acidovorans* AE1. *J. Gen. Microbiol.* **87**: 260–272.
 3. Andrews, P. 1964. Estimation of the molecular weight of proteins by Sephadex gel-filtration. *Biochem. J.* **91**: 222–233.
 4. Best, D. J. and P. A. Vaughan. 1991. *Rhodococcus* bacterium for the production of aryl acylamidase. *US Patent 5,030,571*.
 5. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248–254.
 6. Frear, D. S. and G. G. Still. 1968. The metabolism of 3,4-dichloropropionamide in plants. Partial purification and properties of an aryl acylamidase from rice. *Phytochemistry (Oxf.)* **7**: 913–920.
 7. George, S. T. and A. S. Balasubramanian. 1980. The identity of the serotonin-sensitive aryl acylamidase with acetylcholinesterase from erythrocytes, sheep basal ganglia and electric eel. *Eur. J. Biochem.* **111**: 511–524.
 8. George, S. T. and A. S. Balasubramanian. 1981. The aryl acylamidases and their relationship to cholinesterases in human serum, erythrocyte and liver. *Eur. J. Biochem.* **121**: 177–186.
 9. George, S. T., M. Varghese, L. John, and A. S. Balasubramanian. 1985. Aryl acylamidase activity in human erythrocyte, plasma and blood in pesticide (organophosphates and carbamates) poisoning. *Clin. Chim. Acta* **145**: 1–7.
 10. Gleeson, P., L. G. Sparrow, and L. W. Ward. 1976. Aryl acylamidase activity in larvae of the webbing clothes moth, *Tineola bisselliella*. *Comp. Biochem. Physiol.* **53B**: 187–190.
 11. Gotelli, G. R., P. M. Kabra, and L. J. Marton. 1977. Determination of acetaminophen and phenacetin in plasma by high-pressure liquid chromatography. *Clin. Chem.* **23**: 957–959.
 12. Grant, D. J. W. and J. Wilson. 1973. Degradation and hydrolysis of amides by *Corynebacterium pseudodiphtherium* NCIB 10803. *Microbios.* **8**: 15–22.
 13. Hammond, P. M., C. P. Price, and M. D. Scawen. 1983. Purification and properties of aryl acylamidase from *Pseudomonas fluorescens* ATCC 39004. *Eur. J. Biochem.* **132**: 651–655.
 14. Hammond, P. M., C. P. Price, and M. D. Scawen. 1984. Production of aryl acylamidases. *US Patent 4,430,433*.
 15. Hammond, P. M., M. D. Scawen, and C. P. Price. 1981. Enzyme based paracetamol estimation. *Lanset* **1**: 391–392.
 16. Hammond, P. M., M. D. Scawen, T. Atkinson, R. S. Campbell, and C. P. Price. 1984. Development of an enzyme-based assay for acetaminophen. *Anal. Biochem.* **143**: 152–157.
 17. Hiramatsu, A., S. Yasumoto, O. Kodama, and T. Akatsuka. 1982. Affinity chromatography of swep hydrolase from *Paecilomyces varioti* on a column Sepharoylamino-caproyl-3-chloroanilide. *Agri. Biol. Chem.* **46**: 1751–1756.
 18. Hoagland, R. E. and G. Graf. 1971. Nitroaceanilides as chromogenic substrates for assaying de-acetylating activity. The isolation and partial purification of aryl acylamidases from erepsin and tulip. *Enzymologia* **41**: 313–319.
 19. Hsiung, K. P., S. S. Kuan, and G. G. Guilbault. 1975. An inducible amidase from *Pseudomonas striata*. *Biochem. Biophysic. Res. Commun.* **66**: 1225–1230.
 20. Hsu, L. L. 1986. Multiple forms of aryl acylamidase in regional tissues of developing rat brain. *Int. J. Dev. Neurosci.* **4**: 189–192.
 21. Kearney, P. C. 1967. Purification and properties of an enzyme responsible for hydrolyzing phenylcarbamates. *J. Agr. Food Chem.* **13**: 561–564.
 22. Kiese, M. and G. Penner. 1966. The hydrolysis of acetanilide and some of its derivatives by enzymes in the microsomal and soluble fraction prepared from livers of various species. *Arch. Exp. Path. Pharmacol.* **252**: 480–500.
 23. Lechner, U. and G. Straube. 1984. Influence of substrate concentration of the induction of amides in herbicide breakdown. *Z. Allg. Mikrobiol.* **24**: 581–584.
 24. Marty, J. L. and J. Vouges. 1987. Purification and Properties of a phenylcarbamate herbicide degrading enzyme of *Pseudomonas alcaligenes* isolated from soil. *Agric. Biol. Chem.* **51**: 3287–3294.
 25. Neville, D. M. 1971. Molecular weight determination of protein-dodecyl sulfate complexes by gel electrophoresis in a discontinuous buffer system. *J. Biol. Chem.* **246**: 6328–6334.
 26. Nimmo-Smith, R. H. 1960. Aromatic N-deacylation by chick kidney mitochondria. *Biochem. J.* **75**: 284–293.
 27. Price, C. P., P. M. Hammond, and M. D. Scawen. 1983. Evaluation of an enzymatic procedure for the measurement of acetaminophen. *Clin. Chem.* **29**: 358–361.
 28. Sneath, P. H. A., N. S. Nair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt. 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2. 8th ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
 29. Tiedje, J. M. and M. I. Hagedorn. 1975. Degradation of Alachlor by a soil fungus, *Chaetomium globosum*. *J. Agr. Food Chem.* **23**: 77–81.
 30. Vaughan, P. A., G. F. Hall, and D. J. Best. 1990. Aryl acylamidase from *Rhodococcus erythropolis* NCIB 12273. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 42–46.
 31. Weatherburn, M. W. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal. Chem.* **39**: 971–974.
 32. Yoshimoto, T., Y. Tamesa, K. Gushi, N. Murayama, and D. Tsuru. 1988. An aminopeptidase N from *Escherichia coli* HB101: Purification and demonstration that the enzyme possesses arylamidase and peptidase activities. *Agric. Biol. Chem.* **52**: 217–225.

(Received June 12, 1998)