

Bacillus pseudomycooides로 부터 분리된 alanine racemase 유전자의 발현 및 생화학 특성

강한철* · 김나현 · 정유정 · 윤상홍 · 이창묵

농촌진흥청, 국립농업과학원, 기능성물질개발과

Biochemical Characteristics of a Bacteria (*Bacillus pseudomycooides*) Alanine Racemase Expressed in *Escherichia coli*

Han-Chul Kang*, Na-Hyun Kim, Yu-Jeong Jeong, Sang-Hong Yoon, and Chang-Muk Lee

Department of Functional Bio-material, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea

Received July 12, 2010; Accepted September 1, 2010

A gene encoding a putative alanine racemase in *B. pseudomycooides* was cloned and expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) using a pET-21 vector harbouring 6xHistidine tag. Affinity purification of the recombinant alanine racemase with a nickel resin resulted in one band by SDS-PAGE analysis. The purified enzyme showed a molecular weight of 46 kDa. The enzyme was the most active toward L-alanine and secondly D-alanine, implying that the enzyme is an alanine racemase. D-cysteine significantly inhibited the enzyme activity and also L-cysteine to a lesser extent. The enzyme was considerably activated by addition of pyridoxal-5'-phosphate (PLP), showing that 73% increase in activity was observed at 0.3 mM, compared to control. The enzyme was the most active at pH 9.0 and more stable at alkaline pHs than acidic pHs.

Key words: alanine racemase, *Bacillus pseudomycooides*

서 론

Alanine racemase(EC 5.1.1.1)는 PLP 의존성 효소로서 L 및 D형의 alanine의 상호 racemization 반응을 이루어낸다. 이 효소는 bacteria에만 존재하는 것으로 인식되어 왔다. 그러나 fungus의 일종인 *Tolypocladium niveum*에서 항생물질인 cyclosporine을 제조하는데 이 효소가 관여하는 것으로 알려졌고[Hoffman 등, 1994] 그 외에도 yeast[Uo 등, 2001] 및 식물체인 alfalfa[Ono 등, 2006] 등에서도 alanine racemase가 발견되고 있다. 척추 동물에서 소량씩 발견되는 D-alanine은 음식물 또는 미생물 세포벽 등의 분해 산물로 추측되고 있다[Nagata 등, 1992].

일반적으로 alanine racemase는 그람 양성 및 음성균 박테리아 세포벽의 peptidoglycan layer의 일부 성분인 D-alanine을 생합성 하는데 필요한 효소이며 alanine의 racemization은 두 가지의 작용, 즉 PLP 결합 부위인 lysine과 효소 촉매에 관련되는

tyrosine의 작용에 의하여 이루어지는 것으로 알려지고 있다 [Watanabe 등, 1999]. 대부분의 bacteria의 경우는 alanine racemase gene을 하나 또는 두개씩(*alr* 및 *dadx*) 갖고 있는 것으로 알려졌다. *Lactobacillus plantarum*[Hols 등, 1997], *Mycobacteria smegmatis*[Strych 등, 2001], *Corynebacterium glutamicum*[Tauch 등, 2002] 등은 하나의 *alr*만을 갖고 있다. 그러나 *E. coli*[Lambert 등, 1972], *Salmonella typhimurium* [Wasserman 등, 1983] 및 *Pseudomonas aeruginosa*[Strych 등, 2000] 등에서는 두 종류의 유전자, 즉 *alr* 및 *dadx*가 존재하는 것으로 알려져 있다. 대부분의 bacteria의 alanine racemase는 세포 성장을 위해 지속적으로 발현이 되는 것으로 알려져 왔다[Strych 등, 2000; Saito 등, 2007; Zhang 등, 2007]. *Salmonella* 등 일부 bacteria의 다른 alanine racemase 유전자인 *dadx*는 고농도의 L-alanine이 존재할 때 유도되어 L-alanine을 D-alanine으로 전환시키는 것으로 알려졌다[Loboocka 등, 1994; Zhang 등, 2007].

Peptidoglycan이 세포벽 구성에 필요한 물질임을 감안하여 bacteria의 살균제 제조를 위한 성장저해제 제조용 목적을 위해서도 바로 이 효소가 연구되어 왔다. Peptidoglycan의 형성을 저해하는 물질로서 지금까지 D-cysteine, D-cycloserine(4-amino-3-isoxazolidinone), 및 D-carbamyl-D-serine 등이 알려지고 있으

*Corresponding author
Phone:+82-31-299-1694; Fax:+82-31-299-1672
E-mail:hckang09@korea.kr

며 이들 물질들은 바로 alanine racemase의 활성을 저해한다 [Preston 등, 1984; Hoffmann 등, 1994; Noda 등, 2004]. D-cycloserine은 자연계에 존재하는 물질로서 alanine racemase뿐만 아니고 PLP 의존성 효소들을 저해시킨다. 한편 D-cysteine이 *E. coli*의 alanine racemase에 대하여는 저해를 시키지 않는다는 상반된 보고[Lambert 등, 1972]가 있고 sulfhydryl 화합물의 일종인 glutathione이 *Lactobacillus*로 부터 분리된 alanine racemase의 효소 활성을 증가시킨다는 보고[Johnston 등, 1969]도 있다. 이렇게 서로 다른 결과 등이 존재하는 점으로 미루어 cysteine 계통의 화합물에 의한 효소활성의 영향에 대하여 지속적인 연구가 필요하다. L-alanine과 유사체인 L-fluoroalanine을 투여함으로써 alanine racemase의 효소작용을 방해시켜 항박테리아 제제로 사용하는 방법도 연구되고 있다[Bjelakovic 등, 2002]. *Bacillus stearothermophilus*로부터 분리한 alanine racemase의 3차 구조가 연구되었으며 L-alanine과 유사체인 N-(5'-phospho-pyridoxyl) alanine에 의해 이 효소의 활성이 억제되는 것으로 알려졌다[Watanabe 등, 2002]. 또한 alanine racemase는 bacteria의 세포벽 생산에도 필요하지만 *Bacillus*의 spore 발아를 저해하는데도 중요한 역할을 하는 것으로 알려지고 있다[Yan 등, 2006]. *B. cereus* 포자의 경우 L-alanine은 발아를 촉진시키는데 반하여 D-alanine은 L-alanine에 의해 유도되는 발아의 저해제로 작용하고 있다[Preston 등, 1984]. 한편 항균제 개발의 목표 단백질 이외의 목적으로 alanine racemase는 각종 천연 농약, 의약품 원료 등의 생산에 사용되는 D-amino acid의 생산에 사용될 수도 있어 이에 대한 연구도 활발히 진행되고 있다[Kiuniki 등, 2007].

Alanine racemase의 특성에 근거한 항균물질을 개발하기 위하여서는 이 효소에 대한 기질 특이성 및 활성 저해 등의 생화학적 특성이 지속적으로 연구되어야 한다. 따라서 본 연구에서는 *B. pseudomycooides*에서 alanine racemase 유전자를 분리한 다음 *E. coli*에서 발현 정제하여 생화학 특성을 연구한 내용을 보고하고자 한다.

재료 및 방법

균주 및 배양조건. 본 실험에서 사용된 *B. pseudomycooides* (KACC 12098)는 Korean Agricultural Culture Collection (KACC)에서 분양을 받았으며 beef extract 1.0 g/L, yeast extract 2.0 g/L, peptone 5.0 g/L 및 NaCl 5.0 g/L로 제조된 배지에서 배양하였다. *E. coli*는 기본배지로서 tryptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L 및 NaCl 10 g/L로 조성된 배지에 적당한 농도의 항생제를 투여하여 배양하였다. *E. coli* DH5 α 는 *B. pseudomycooides*로 부터 분리한 alanine racemase 후보 유전자의 클로닝에 이용되었으며 T7 RNA polymerase 유전자를 보유하고 있는 *E. coli* BL21(DE3)는 분리된 유전자의 발현에 이용되었다.

Alanine racemase 유전자의 클로닝. *Bacillus* 균주는 30°C에서 150 rpm의 속도로 24시간 동안 진탕 배양한 후 원심분리에 의해 회수하였다. 전체의 genomic DNA는 유전자 분리 kit (Bioneer, Daejon, Korea)를 사용하여 분리하였으며 -20°C에 보

존하면서 실험에 사용하였다. *Bacillus*로 부터의 alanine racemase 후보 유전자는 NCBI 유전자은행(NCBI accession number, ZP004151017NC, GI228991111)을 참조하여 선정하였다. Alanine racemase 유전자를 polymerase chain reaction (PCR) 방법으로 분리하기 위하여 sense primer로서 5'-atgagttcggatgatggaaga-3'를 그리고 antisense primer로서 5'-ttt gttcttaatatattcacacac-3'를 이용하였다. 증폭되는 유전자는 발현벡터에서 6xHistidine 재조합 단백질을 만들기 위하여 stop codon을 제거하여 primer를 구성하였다. PCR 반응조건은 94°C에서 3분 동안 denaturation, 55°C에서 1분 동안 annealing, 72°C에서 1분 30초 동안 amplification의 과정을 30회 반복하여 수행하였다. 증폭된 유전자를 pET-21(a) 발현 벡터에 삽입시키기 위하여 N-terminal의 시작 부위에 *Nde*I를 부착하기 위한 2차 PCR을 시도하였으며 이때 sense primer로서 5'-catatgagttcggatgatgga-3'를 이용하였고 antisense primer는 1차 PCR에서의 같은 primer를 사용하였으며 PCR 조건도 같았다. 이렇게 얻어진 PCR 산물은 분리하여 pGEM-T Easy vector(Promega, CA, USA)에 결합시킨 다음에 *E. coli* DH5 α 세포에 형질전환 시켰다. 형질전환된 대장균은 ampicillin(100 μ g/mL), isopropyl β -D-thiogalacto-pyranoside(IPTG, 0.5 mM) 및 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galacto-pyranoside(75 μ g/mL)를 함유하는 agar 함유 고체 배지에서 37°C의 조건으로 24시간 동안 배양하였다. Alanine racemase 유전자를 함유하는 벡터는 plasmid 분리 kit (DyneBio, Daejon, Korea)를 사용하여 분리한 후 DNA sequence 분석에 의하여 목적 유전자의 삽입을 확인하였다. 목적하는 유전자가 삽입된 pGEM-Teasy vector는 *Nde*I 및 *Sal*I으로 분해를 시켜 삽입 유전자를 추출한 후 역시 같은 제한효소들로 분해시킨 pET-21(a)에 결합시켰다. 이렇게 만들어진 발현벡터는 pET-21-alr 로 명명하였다.

Alanine racemase 유전자의 발현 및 조단백질 추출. pET-21-alr는 *E. coli* BL21(DE3) 세포에 형질전환 시킨 후 ampicillin 함유 LB-agar 배지에서 배양하였다. 선별된 colony는 같은 액체 배지에서 A_{600nm}가 0.5가량 될 때까지 배양한 후 충분한 량의 단백질을 얻기 위해 200 mL의 배지에 다시 접종하였다. 두 시간의 추가 배양 이후 1 mM의 IPTG를 첨가하고 27°C에서 50 rpm의 조건으로 배양하였다. 배양된 균체는 원심분리에 의해 회수한 후 완충용액 A(20 mM Tris-Cl pH 7.9, 500 mM NaCl 및 5 mM imidazole)로 씻어냈다. 세포들은 같은 완충액으로 현탁시킨 후 초음파의 방법으로 파쇄시키고 원심분리(10,000 g 10분)의 방법에 의해 상등액을 회수하였다.

Alanine racemase의 친화 크로마토그래피 분리. 50 mL의 완충액 A에 녹인 조단백질은 Ni(II)이온으로 charge시키고 같은 완충액으로 충전시킨 His-Bind Resin column(1 \times 10 cm)에 통과시켰다. 컬럼은 완충용액 B(20 mM Tris-Cl pH 7.9, 500 mM NaCl, 및 80 mM imidazole)로 씻어냈고 이어서 resin에 결합된 단백질은 추출용 완충용액(50 mM Tris-Cl (pH 7.9), 500 mM NaCl, 및 50-1000 mM imidazole linear gradient)을 이용하여 0.5 mL/min의 비교적 느린 속도로 용출시키며 단백질 분획을 회수하였다. Alanine racemase를 함유하는 단백질 분획은 효소 활성도를 측정하여 추적하였다. 효소 활성도를 갖는 단백질 분

획들은 완충용액 C(20 mM Tris-HCl(pH 7.5), 200 mM NaCl, 20% glycerol, 및 2 mM EDTA)를 이용하여 4°C에서 12시간 동안 투석시켰다. 이중에서 효소 활성도가 가장 높은 분획을 이용하여 전기영동 분석 및 각종 생화학 실험을 수행하였다.

Alanine racemase의 효소활성 측정. 알라닌 라세미제의 효소 반응은 50 mM Tris-Cl(pH 9.0), 25 mM의 L 또는 D-alanine, 20 μ M의 PLP 수용액을 이용하였다. 효소 반응은 기질과 효소를 첨가하며 시작하였고 37°C에서 30분간 반응시킨 후 열처리에 의하여 효소반응을 중단시켰다. 이어 얼음에 채워서 냉각시킨 후 생성된 D형의 아미노산은 D-amino acid oxidase와 lactate dehydrogenase를 이용하고 L형의 아미노산은 L-alanine dehydrogenase를 이용하여 정량 하였다[Ju 등 2005]. 기질 특이성 실험에서는 여러 종류의 L형 또는 D형의 아미노산을 기질로 사용하여 pH 9.0의 조건에서 효소 반응을 시켰으며 나머지 효소 반응 조건은 상기의 표준 효소활성 측정법과 동일하였다. Alanine racemase의 효소 활성도에 미치는 온도효과에는 15°C에서 50°C의 범위의 서로 다른 온도에서 효소 반응을 시킨 후 표준 효소활성도 측정법으로 활성도를 측정하였다. 효소 활성도 1 unit는 1분 동안에 1 μ mol의 D 또는 L alanine을 racemization시키는 효소의 양으로 정의하였다.

효소의 활성도 및 안정화도에 미치는 pH의 영향. 효소 반응에 미치는 pH 효과에 있어서 pH 5.0-7.0은 potassium phosphate를 그리고 pH 7.0-11.0은 Tris-Cl 완충용액을 사용하였다. 이와 같이 완충용액만 다르게 한 후 나머지 조건은 상기와 같이 표준 효소반응 측정법으로 활성도를 측정하였다. pH 변화가 효소의 안정성에 미치는 영향을 실험하기 위하여 분리된 효소 분획 100 μ L를 서로 다른 완충액에 녹였으며 이때 사용된 완충액은 pH 4.0에서 5.0까지는 citrate phosphat를 pH 6.0에서 7.0까지는 potassium 완충액을 그리고 pH 8.0에서 11.0까지는 Tris-Cl 완충액을 사용하였다. 이렇게 서로 다른 pH 조건으로 실내온도(약 25°C)에서 4시간 동안 보존한 후 50 μ L를 회수하여 pH 9.0에서 표준 효소활성 측정 방법에 의해 활성도를 측정하였다.

기타 분석 방법. 단백질 농도는 Bradford[1976]의 방법에 준했으며 표준 단백질로 bovine serum albumin을 사용하였다. 전기영동(SDS-PAGE)은 Laemmli [1970]의 방법에 따라서 5%의 stacking gel과 12.5%의 resolving gel을 사용하였고 Coomassie Brilliant Blue R-250으로 단백질을 염색하였다.

결과 및 고찰

Alanine racemase의 E. coli 내에서의 발현 및 단백질 분리. 발현 벡터에 삽입된 alanine racemase 유전자로부터 보다 충분한 양의 단백질을 발현시키기 위하여 E. coli BL21(DE3)를 200 rpm, 37°C에서 배양하고 IPTG를 첨가하여 단백질을 과량으로 발현시켰다. 그러나 이 조건에서 발현시킨 alanine racemase는 응집체가 생성되는 것으로 판단되었다. 따라서 균체는 27°C의 조건에서 50 rpm의 속도로 배양하였으며 이러한 조건에서 용해성 단백질을 얻어냈다. 단백질이 발현되는 균체는 2시간의 간격으로 16시간 까지 표본을 채취하고 효소 활성

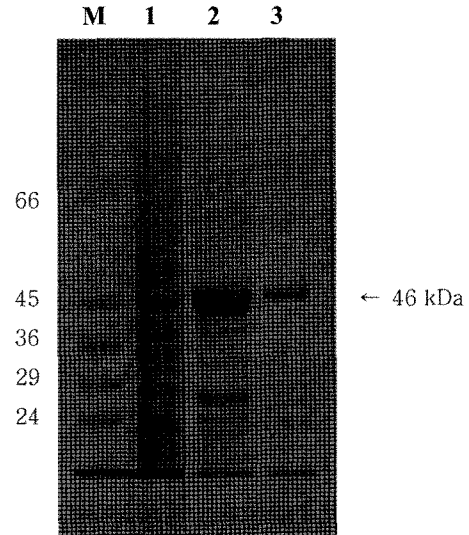


Fig. 1. SDS-PAGE analysis of a purified alanine racemase which was cloned from *B. pseudomycoloides* and expressed in *E. coli*. Lane M, molecular mass markers; lane 1, crude extract from *E. coli* BL21(DE3) without insert gene (*i.e.*, vector control); lane 2, crude extract from *E. coli* BL21(DE3) transformed with pET-21-alc; lane 3, an alanine racemase purified by affinity chromatography using nickel charged His-bind resin.

도를 측정할 결과 8시간 가장 발현시킬 때 4.3 unit/mL(균주배양액)을 보여 이 조건에서 가장 많은 alanine racemase가 축적되는 것으로 판단 되었다. 따라서 이러한 조건으로 발현시킬 경우 alanine racemase의 비율이 다른 단백질들보다 세포내에 상당히 높은 비율로 축적된 상태이기 때문에 친화크로마토그래피로 비교적 쉽게 분리된 것으로 추측된다(Fig. 1). 분리된 단백질을 분획중에서 효소 활성도가 가장 높은 분획을 환원제인 β -mercaptoethanol로 처리하여 전기영동을 시도하였으며 약 46 kDa의 단일 밴드를 나타내고 있다. 분리된 단백질은 약 14.7 unit/mg protein의 specific activity를 나타내었다.

한편 다른 미생물들에서 분리된 alanine racemase의 분자량은 *Bifidobacterium bifidum*의 50 kDa(Yamashita 등, 2003), *Acetobacter acetii*의 45 kDa(Francois 등, 2007) 및 *Penaeus monodon*의 41 kDa(Uo 등, 2001) 등으로 본 실험에서 분리한 효소와 비슷한 범위내의 분자량을 보이고 있다. 그러나 *Corynebacterium glutamicum*의 78 kDa(Oikawa 등, 2006) 및 *Chlamydomonas reinhardtii*의 72 kDa(Nishimura 등, 2007)과는 큰 차이를 보이고 있다.

기질 특이성 실험. 분리된 단백질을 서로 다른 아미노산을 기질로 하여 효소 반응을 시킨 후 효소 활성도를 비교하여 보았다(Table 1). 최대의 효소 활성도는 L-alanine을 사용하였을 때 나타났으며 표준 효소활성도 측정의 방법에서 12.4 unit/mg protein를 나타내었다. 한편 D-alanine에 대하여는 L-alanine 대비 84.5%의 효소 활성도를 나타내었다. 이러한 효소 활성도는 다른 아미노산보다 차이가 크게 나타나고 있어 본 실험에서 분리한 효소가 alanine racemase임을 확인할 수 있었다. 한편 L 및 D-serine에 대하여는 L-alanine 대비 각각 2.7 및 1.9% 가량의 효소 활성도를 나타내었다. 다른 아미노산인 L-lysine, L-

Table 1. Substrate specificity of an alanine racemase from *B. pseudomycoloides*

Amino acids	Relative activity (%)
L-alanine	100.0
D-alanine	84.5
L-serine	2.7
D-serine	1.9

Other amino acids of L or D form, lysine, arginine, leucine, asparagine, methionine, glutamine, cysteine, valine, glutamic acid, proline, tyrosine, tryptophan, phenylalanine, histidine, and isoleucine, showed no detectable activity of racemase. One hundred percent activity was equivalent to 12.4 unit/mg protein.

arginine, L-leucine, L-asparagine, L-methionine, L-glutamine, L-serine, L-cysteine, L-valine, L-glutamic acid, L-proline, L-tyrosine, L-tryptophan, L-phenylalanine, L-histidine, L-isoleucine 등에 대하여는 측정 가능한 효소 활성도가 나타나지 않았다.

한편 *Penaeus monodon*[Uo 등, 2001] 또는 *Bifidobacterium bifidum* 에서 분리한 alanine racemase[Yamashita 등, 2003]의 경우에서도 L-serine 에 대하여 약간의 효소 활성도를 나타낸 바가 있어 본 실험과 비슷한 결과를 보이고 있다. 그러나 *Corynebacterium glutamicum*에서 분리한 alanine racemase [Oikawa 등, 2006] 등은 L-serine에 대하여 전혀 효소 활성도를 나타내지 않는 것으로 보고 되었다. 본 실험에서 분리한 효소는 상당히 높은 기질 특이성을 보이고 있기 때문에 D형의 alanine 제조 등에서 유용하게 활용될 수 있을 것으로 추측된다. 한편 미생물의 peptidoglycan의 구성 아미노산중에서 D-serine이 존재한다는 보고가 있다[Yamashita 등, 2003; Grohs 등, 2000]. 이러한 결과 등을 종합하면 alanine racemase가 D-serine의 생합성에 관여하는지 여부에 대하여서는 앞으로 보다 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

효소 활성에 미치는 PLP의 효과. Alanine racemase의 보호소로 알려진 PLP의 첨가가 alanine racemase의 효소 활성도에 미치는 영향을 실험한 결과가 Fig. 2와 같다. PLP를 첨가하지 않았을 경우에도 11.2 unit/mg protein의 효소활성도를 보이며 대조구에 대비하여 0.2 또는 0.3 mM을 첨가하였을 경우에는 각각 152% 및 173%의 효소 활성도를 보이고 있다.

지금까지 연구된 대부분의 alanine racemase는 보호소로서 PLP가 필요한 것으로 보고되어 왔다[Francois 등, 2007]. 그러나 일부 alanine racemase의 경우 이러한 보호소가 없이도 상당한 효소 활성도를 보이고 있으며 보호소를 첨가할 경우 활성도가 어느 정도 올라가는 것으로 보고 되고 있다[Kanodia 등, 2008]. 본 실험에서 사용한 alanine racemase의 경우도 보호소를 공급해주지 않은 상태에서 상당한 효소활성도가 나오고 있으며 보호소를 첨가할 경우 효소 활성도가 더 올라가고 있다. 이러한 특성을 종합하면 보호소가 효소에 비교적 약한 비공유 결합의 형태로 결합되어 있는 것으로 추정된다. 이러한 결과는 *Bacillus anthracis*의 alanine racemase와 비슷한 특성을 나타내고 있다[Kanodia 등, 2008]. 본 실험에서 분리한 alanine racemase가 보호소가 없이도 상당한 효소 활성도를 나타내는 특성으로 미루어 산업용으로 이용할 경우 경제적 측면에서 보다 유리할 것으로 추측된다.

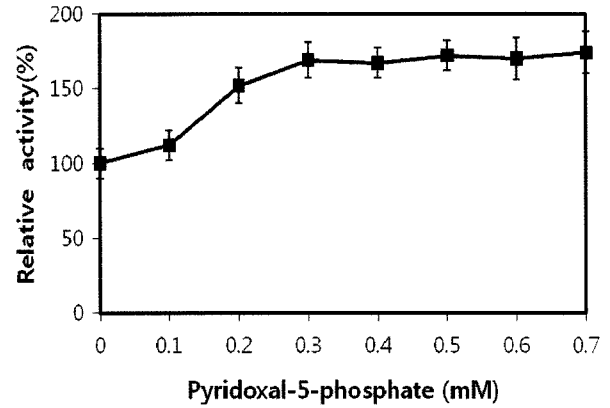


Fig. 2. Effect of PLP on the alanine racemase activity from *B. pseudomycoloides*. The purified alanine racemase was assayed in the presence of PLP. The activity without PLP was considered as 100% activity which was equivalent to 11.2 unit/mg protein.

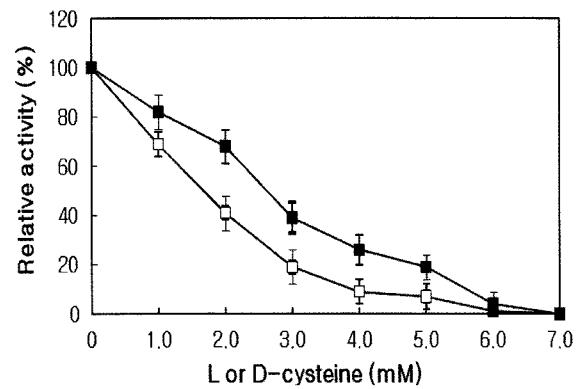


Fig. 3. Effect of L or D-cysteine on the alanine racemase activity from *B. pseudomycoloides*. The purified alanine racemase was assayed in the presence of L or D-cysteine (■-, L-cysteine; □-, D-cysteine). The alanine racemase activity (L→D reaction) without cysteine was considered as 100% which was equivalent to 13.5 unit/mg protein.

Sulfhydryl 화합물이 효소 활성에 미치는 영향. L 또는 D형의 cysteine이 alanine racemase의 효소활성도에 미치는 영향을 조사하였다. L형의 cysteine을 2.0 mM 첨가하였을 때 이 효소는 대조구 대비 75%의 효소활성도를 보여 약 25%가량 저해됨을 알 수 있었다. 그러나 D-cysteine을 같은 농도로 첨가하였을 때 효소활성도는 약 41%를 나타냈고 3.0 mM을 투여하였을 경우에는 18%의 활성도를 나타내어 결국 82%의 저해효과를 나타내었다.

본 실험에 사용된 alanine racemase가 D-cysteine에 의해 저해되는 결과는 *Bacillus cereus* [Preston 등, 1984], *Lactobacillus fermenti* [Johnston 등, 1969] 및 fungus의 일종인 *Tolypocladium niveum* [Hoffmann 등, 1994] 등에서 분리된 alanine racemase 등의 결과와는 일치하고 있다. 그러나 *E. coli*에서 분리된 효소가 D-cysteine에 의해 저해가 되지 않는다는 보고[Lambert 등, 1972]와는 다른 결과를 보이고 있다. 결론적으로 D-cysteine 또는 유도체 등을 이용한 alanine racemase의 저해에 의한 천연 항균제 개발 연구를 지속할 필요가 있다고 생각된다. 또한 D-cysteine 등을 이용하여 직접적으로 미생물의 생장억제 실험 등을 수행하여 볼 필요가 있을 것으로 판단된다.

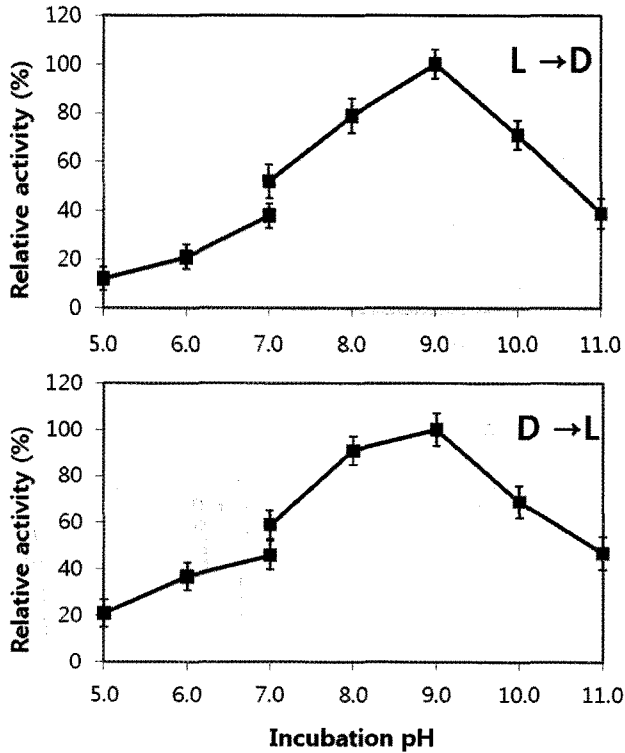


Fig. 4. pH effect on the alanine racemase activity of *B. pseudomycolides*. The reaction mixture consisted of potassium phosphate for pH 5.0-7.0 and Tris-Cl for pH 7.0-11.0. Maximum activities were considered as 100%, equivalent to 11.4 and 10.7 unit/mg protein (for L→D and D→L reaction, respectively).

최적 pH 및 pH 안정성. Alanine racemase의 최적 pH를 실험하기 위하여 L형의 alanine을 D형으로 전환시키는 반응과 그 반대 방향으로 전환시키는 반응을 여러 pH 범위에서 실험하였다(Fig. 4). 그 결과 양쪽 반응 모두 최적 pH는 약 9.0 근처에서 이루어짐을 알 수 있었다. 같은 pH 9.0에서 D형으로 전환시키는 반응은 11.4 unit/mg protein의 활성도를 나타내는데 비하여 L형으로 전환시키는 반응은 10.7 unit/mg protein의 활성도를 보이고 있다. 양쪽 반응 모두 pH 9.0 이상 또는 산성의 pH 조건에서는 효소 활성도가 떨어지고 있다. Alanine racemase의 pH 안정성을 실험하기 위하여 pH 4.0에서 11.0까지의 범위에서 일정시간 보존시킨 후 잔여 효소 활성도를 측정된 결과 Fig. 5와 같은 결과를 얻었다. 이 효소를 pH 9.0으로 보존하였을 때 가장 높은 잔여 활성도를 보이고 있다. 그러나 pH 9.0의 범위를 벗어나면 효소의 안정성이 점점 떨어지며 특히 pH 8.0 이하의 조건에서는 안정성이 급격히 떨어지고 있다. pH 11.0의 조건에서는 최적 활성도의 67%를 나타내지만 pH 6.0에서는 37%의 잔여 활성도를 나타내고 있는 바와 같이 산성보다는 알칼리의 조건에서 효소가 안정하다고 볼 수 있다.

이러한 최적 pH는 *E. coli*, *B. bifidum*, *A. aceti*, 및 *B. pseudofirmus* OF4 등에서 분리한 alanine racemase와 비슷한 특성을 나타내고 있다[Lambert 등, 1972; Yamashita 등, 2003; Ju 등 2005; Francois 등, 2007].

최적 온도. 분리된 alanine racemase의 최적 온도를 시험하기 위하여 여러 온도에서 효소 활성을 측정된 결과가 Fig. 6과 같

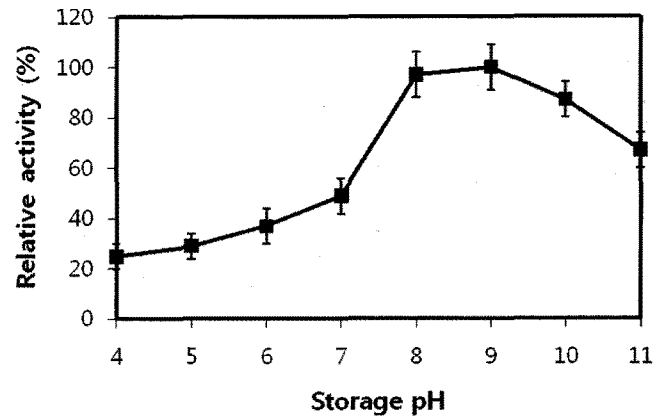


Fig. 5. pH stability of the alanine racemase activity from *B. pseudomycolides*. The alanine racemase was suspended in different buffers showing pH ranges from 4.0 to 11.0; 50 mM citrate phosphate buffer for pH 4.0-5.0, potassium phosphate buffer for pH 6.0-7.0, and Tris-Cl buffer for pH 8.0-11.0. After 4h incubation, an aliquot was withdrawn and the alanine racemase activity was measured under standard assay condition. Maximum activity at pH 9.0 was considered as 100% activity equivalent to 10.8 unit/mg protein. Each point represents the average of three experiments.

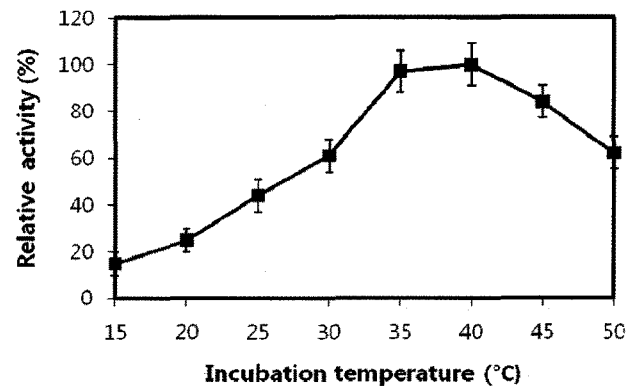


Fig. 6. Effect of temperature on the alanine racemase activity of *B. pseudomycolides*. The alanine racemase activity was measured at different temperatures under the standard assay condition. The maximum activity was observed around 40°C, thus this activity was considered as 100% activity, which was equivalent to 12.9 unit/mg protein. Each point represents the average of three experiments.

다. L형의 alanine을 D형으로 전환시키는 과정에 대하여 효소 활성도를 측정하였을 경우 최적 온도는 35°C에서 40°C 사이를 나타내었다. 한편 D형의 alanine을 L형으로 전환시키는 과정에 대한 실험에서도 비슷한 최적 온도를 나타내었다(자료 미제시). 이러한 최적 온도는 다른 *Bacillus* 로 부터 분리된 alanine racemase 등과 비슷한 결과를 보이고 있다[Ju 등 2009].

초 록

*B. pseudomycolides*로 부터 alanine racemase로 추정되는 유전자를 분리한 다음 6xHistidine 이 결합된 pET-21 운반체를 이용하여 *E. coli* BL21(DE3)에서 발현시키고 생화학 특성을 조사하였다. 재조합된 alanine racemase는 affinity chromatography를 이용하여 분리하였으며 SDS-PAGE 분석에서 약 46 kDa의 단

일밴드를 나타내었다. 분리된 효소는 여러 아미노산 중에서 L-alanine에 대하여 가장 높은 활성도를 보이고 D-alanine에 대하여 두번째로 높은 활성도를 보였다. 따라서 분리된 효소는 alanine racemase로 판단되었다. 분리된 효소는 D-cysteine에 의하여 상당히 저해가 되었다. 효소의 최적 활성도는 pH 9.0 근처에서 관찰되었고 산성의 조건보다는 알칼리의 조건에서 보다 안정하였다. 보조소인 PLP 0.3 mM의 첨가에 의해 효소의 활성도는 약 70% 가량 증대되었다.

Acknowledgments

This work was supported by Rural Development Administration (Number of Research item, PJ006643) for a regular scientific support.

참고문헌

- Bjelakovic G, Stojanovic I, Bjelakovic GB, Pavlovic D, Kocic G, and Millic AD (2002) Competitive inhibitors of enzymes and their therapeutic application. *Facta universitatis Series: Med Biol* **9**, 201-206.
- Bradford MM (1976) A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Francois JA and Kappock TJ (2007) Alanine racemase from the acidophile *Acetobacter acetii*. *Prot Exp Purif* **51**, 39-48.
- Grohs P, Gutmann L, Legrand R, Schoot B, and Mainardi J (2000) Vancomycin resistance is associated with serine containing peptidoglycan in *Enterococcus gallinarum*. *J Bacteriol* **182**, 6228-6232.
- Hoffmann K, Schneider-Scherzer E, Kleinkauf H, and Zocher R. (1994) Purification and characterization of eukaryotic alanine racemase acting as key enzyme in cyclosporine biosynthesis. *J Biol Chem* **269**, 12710-12714.
- Hols P, Defrenne C, Ferain T, Derzelle S, Delplace B, and Delcour J (1997) The alanine racemase gene is essential for growth of *Lactobacillus plantarum*. *J Bacteriol* **179**, 3804-3807.
- Johnston M (1969) Studies on amino acid racemases. *J Biol Chem* **244**, 5414-5420.
- Ju J, Yokoigawa K, Misono H, and Ohnishi K (2005) Cloning of alanine racemase genes from *Pseudomonas fluorescens* strains and oligomerization states of gene products expressed in *Escherichia coli*. *J Biosci Bioeng* **100**, 409-417.
- Ju J, Xu S, Wen J, Li G, Ohnishi K, Xue Y, and Ma Y (2009) Characterization of endogenous pyridoxal 5'-phosphate dependent alanine racemase from *Bacillus pseudofirmus* OF4 J. *Biosci Bioeng* **107**(3), 225-229.
- Kanodia S, Agarwall S, Singh P, Singh P, and Bhatnagar R (2008) Biochemical characterization of alanine racemase; a spore protein produced by *Bacillus anthracis* *Biochem Mol Biol Rep* **42**, 47-52.
- Kuniki K, Masaru S, and Yoneyama M (2007) Synthesis of DL-tryptophan by modified broad specificity amino acid racemase from *Pseudomonas putida* IFO 12996. *Appl Microbiol. Biotechnol* **73**, 1299-1305.
- Lambert MP and Neuhaus FC (1972) Mechanism of D-cycloserine action: alanine racemase from *Escherichia coli* W. *J Bacteriol* **110**, 978-987.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lobocka M, Hennig J, Wild J, and Klopotoski T (1994) Organization and expression of the *Escherichia coli* K-12 *dad* operon encoding the smaller subunit of D-amino acid dehydrogenase and the catabolic alanine racemase. *J Bacteriol* **176**, 1500-1510.
- Nishimura K, Tomoda Y, Nakamoto Y, Ishii Y, and Nagata Y (2007) Alanine racemase from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Amino acids* **32**, 59-62.
- Noda M, Matoba Y, Kumagai T, and Sugiyama M (2004) Structural evidence that alanine racemase from a D-cycloserine-producing microorganism exhibits resistance to its own product. *J Biol Chem* **279**, 46153-46161
- Oikawa T, Tauch A, Schaffer S, and Fujioka T (2006) Expression of *alr* gene from *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 in *Escherichia coli* and molecular characterization of the recombinant alanine racemase. *J Biotechnol* **125**, 503-512.
- Ono K, Yanagida K, Oikawa T, and Soda K (2006) Alanine racemase of alfalfa seedlings (*Medicago sativa* L.): first evidence for the presence of an amino acid racemase in plants. *Phytochem* **67**(9), 856-860.
- Preston RA and Douthit HA (1984) Germination of *Bacillus cereus* spores: Critical control by DL-alanine racemase. *J Gen Microbiol* **130**, 3123-3133.
- Saito M, Nishimura K, Hasegawa Y, Shinohara T, Wakabayashi S, Kurihara T, Ishizuka M, and Nagata Y (2007) Alanine racemase from *Helicobacter pylori* NCTC11637. *Life Sci* **80**, 788-794.
- Strych U, Huang HC, Krause KL, and Benedik MJ (2000) Characterization of the alanine racemase from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Curr Microbiol* **41**, 290-294.
- Tauch A, Gotker S, Puhler A, Kalinowski, and Thierbach G (2002) The alanine racemase gene *alr* is an attractive to antibiotic resistance genes in cloning systems for industrial *Corynebacterium glutamicum* strains. *J Biotechnol* **99**, 79-91.
- Strych U, Penland RL, Jimenez M, Krause KL, and Benedik MJ (2001) Characterization of the alanine racemases from two *mycobacteria*. *FEMS Microbiol Lett* **196**, 93-98.
- Uo T, Yoshimura T, Tanaka N, Takegawa K, and Esaki N (2001) Functional characterization of alanine racemase from *Schizosaccharomyces pombe*: a eukaryotic counterpart to bacterial alanine racemase. *J Bacteriol* **183**, 2226-2233.
- Uo T, Ueda M, Nishiyama T, Yoshimura T, and Esaki N (2001) Purification and characterization of alanine racemase from hepatopancreas of black-tiger prawn, *Penaeus monodon*. *J Mol Cat (B)*, 137-144.
- Wasserman SA, Walsh CT, and Botstein D (1983) Two alanine racemase genes in *Salmonella typhimurium* that differ in structure and function. *J Bacteriol* **153**(3), 1439-1450.
- Watanabe A, Kurokawa Y, Yoshimura T, Kurihara T, Soda K, and Esaki N (1999) Role of lysine39 of alanine racemase from *Bacillus stearothermophilus* that binds pyridoxal 5'-phosphate:

- chemical rescue studies of Lys39 Ala mutant. *J Biol Chem* **274**, 4189-4194.
- Watanabe A, Yoshimura T, Mikami B, Hayashi H, Kagamiyama H, and Esaki N. (2002) Reaction mechanism of alanine racemase from *Bacillus stearothermophilus*. *J Biol Chem* **277**, 19166-19172.
- Yamashita T, Ashiuchi M, Ohnishi K, Kato S, Nagata S, and Misono H (2003) Molecular characterization of alanine racemase from *Bifidobacterium bifidum*. *J Mol Cat B* **23**, 213-222.
- Zhang X, Jantama K, Moore JC, Shanmugam KT, and Ingram LO (2007) Production of L-alanine by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* **77**, 355-366.