

## PBSA 분해효소 유전자의 분석

주 현 진 · 김 말 남\*

상명대학교 생물학과

### Analysis of Gene Encoding the PBSA Degradation Enzyme

Hyun Jin Joo and Mal Nam Kim\*

Department of Life Science, Sangmyung University, Seoul 110-743, Korea

**Abstract** – *Burkholderia cepacia* PBSA-7, *Bacillus licheniformis* PBSA-8 and *Burkholderia* sp. PBSA-9 previously collected from Korea soil (Joo and Kim, 2009) were analyzed for the presence of genes encoding proteins operative in the degradation of poly(butylene succinate-co-butylene adipate; PBSA). Polymerase chain reaction analyses revealed a 1.5 kb fragment of the lipase gene (*lip A*) in *B. cepacia* PBSA-7 and *Burkholderia* sp. PBSA-9, while *B. licheniformis* PBSA-8 harbored the same gene fragment at 600 bp. The three strains possessed “Gly-X1-Ser-X2-Gly” and “Ala-X1-Ser-X2-Gly” lipase sequence regions. *Burkholderia* sp. PBSA-7 *lip A* displayed 36~40% homology with the family 1-1 lipases and 82~92% homology with the family 1-5. *Burkholderia* sp. PBSA-8 *lip A* was 64~65% homologous with the subfamily 1-4 lipases, but displayed no homology with the subfamily 1-5 lipases. *Burkholderia* sp. PBSA-9 *lip A* displayed 35~37% homology with the family II lipases and 83~94% homology with the family I2 lipases, similar to *Burkholderia* sp. PBSA-7.

**Key words** : PBSA, degradation enzyme, *Burkholderia cepacia*, *Bacillus licheniformis*, *Burkholderia* sp., Lipase, *lip A*, genetic homology

## 서 론

Poly (butylene succinate-co-butylene adipate; PBSA)는 1,4-butanediol, succinic acid 및 adipic acid를 원료물질로 하여 생산된 지방족 폴리에스테르로서 토양 매립 시 자연에서 분해되는 생분해성 플라스틱이다 (Zhao *et al.* 2005). 이러한 PBSA를 포함한 생분해성 플라스틱을 분해하는 균주의 분리에 대한 연구는 많이 보고되어 왔으나, 아직 이들에 대한 PBSA 분해효소 및 유전자에 대한

정보는 매우 제한적이다.

PBSA를 포함하는 지방족 폴리에스테르는 미생물이 분비하는 효소에 의하여 가수분해되며, 중간대사 산물은 다시 미생물에 의해 흡수되고, 세포 내 효소에 의해 최종적으로 물과 이산화탄소로 대사된다. 미생물 효소에 의한 플라스틱의 분해는 주로 고분자 물질 내 연쇄상 고리의 화학결합을 절단하여 이루어지므로 지방족 폴리에스테르의 분해에는 lipase의 역할이 매우 중요하다고 보고된 바 있다 (Tokiwa and Jarerat 2003).

Lipase (EC 3.1.1.3)는 triacylglycerol을 diacylglycerol, monoacylglycerol, glycerol 및 지방산으로 분해하는 효소로서 자연에 널리 존재하며, 동물, 식물, 곰팡이 및 세균

\* Corresponding author: Mal Nam Kim, Tel. 02-2287-5150, Fax. 02-2287-0070, E-mail. mnkim@smu.ac.kr

이 생산한다(Park *et al.* 2007). Lipases는 생화학적, 분자생물학적 특성에 의거하여 8개의 families로 분류되며, 그 중 family I은 다시 아미노산 서열분석에 의해 6개의 subfamilies로 세분화된다(Jaeger and Arpigny 1999). 이는 serine(Ser), histidine(His) 및 aspartic acid(Asp)잔기로 형성된 catalytic triad 및 disulphide bonds의 유무와 같은  $\alpha/\beta$ -hydrolases 구조, 분비 기작, lipase-specific foldases 요구성 및 다른 효소 그룹과의 연관성에 기초하여 분류된 것이며, 이들 아미노산의 서열 내에는 대부분 lipase box (Gly-X1-Ser-X2-Gly)가 존재한다. 그러나 subfamily I-4와 I-5에 *Bacillus* lipases의 lipase box는 첫 glycine(Gly)의 위치에 alanine(Ala) 잔기가 존재하여 Ala-X1-Ser-X2-Gly이 된다.

현재까지 보고된 생분해성 플라스틱 분해효소 유전자에 대한 연구로는 *Marinobacter* sp. NK-1 (Kasuya *et al.* 2003), *Ralstonia eutropha* H16 (Kobayashi and Saito 2003), *Penicillium funiculosum* (Hisano *et al.* 2006), *Ralstonia pickettii* T1 (Numata *et al.* 2007) 및 *Paucimonas lemoignei* (Papageorgiou *et al.* 2008)로부터 Poly(3-Hydroxybutyrate, PHB)를 분해하는 분해효소 유전자(*PhaZ*)를 클로닝하여 이들의 구조가 *B. subtilis* lipase A와 유사하며 lipase family의 특징 중 하나인 catalytic triad (Ser-His-Asp)를 나타내었다고 보고한 것과 Akutsu-Shigeno *et al.* (2003)이 *Paenibacillus amylolyticus* TB-13에서 Poly(Lactic acid) (PLA) 분해효소 유전자(*PlaA*)를 분석하여 아미노산 서열 내 lipase box로써 Gly-X1-Ser-X2-Gly 서열이 존재한다고 보고하였으며 Nakamura *et al.* (2001)과 Matsuda *et al.* (2005)은 Poly(L-lactide)(PLA) 분해균 *Amycolatopsis* sp.로부터 PLA 분해효소를 클로닝하여 유전적 특성을 분석한 바 있으나, PBSA 분해균으로부터 생성되는 분해효소에 있어서 이러한 유전적 특성을 연구한 논문은 매우 미미한 편으로서 Uchida *et al.* (2002)이 *Acidovorax delafieldii*의 PBSA 분해효소 유전자(*PbsA*)를 클로닝하고 염기서열을 분석하여 *Streptomyces*와 *Mollaxella*의 lipase box (Gly-X1-Ser-X2-Gly)와 45.2% 및 40.6%의 상동성을 나타내었음을 보고한 정도이다.

이에 본 연구에서는 본 연구실에서 우리나라 토양에서 분리한 PBSA 분해균 *Burkholderia cepacia* PBSA-7, *Bacillus licheniformis* PBSA-8 및 *Burkholderia* sp. PBSA-9(주와 김 2009)로부터 PBSA 분해효소 lipase를 암호화하는 유전자(*lip A*)를 검출하여 염기서열을 분석하고, 다른 세균들의 lipase 유전자들과의 유전적 상동성을 비교 분석함으로써 우리나라 토양 세균의 PBSA 분해효소 유전자에 대한 정보를 제공하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. PBSA 시료와 미생물

PBSA의 수평균분자량(Mn)은  $60,000 \text{ g mol}^{-1}$ , 중량평균분자량(Mw)은  $130,000 \text{ g mol}^{-1}$ 이며, altodans은 PBSA 분해균 *Burkholderia cepacia* PBSA-7, *Bacillus licheniformis* PBSA-8 및 *Burkholderia* sp. PBSA-9를 사용하였다.

### 2. 증균 배양과 genomic DNA 추출

유전자 분석을 위한 재조합 *E. coli*의 배양은 ampicillin ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ )이 포함된 Luria Broth (LB)배지에서 증균하였다. 증균 배양액 1 mL를 1.5 mL microtube에 넣고 원심분리 (13,000 rpm, 10분)하여 상층액을 제거한 후 남은 pellet을 수거하여 DNeasy & tissue kit (Qiagen, USA)로 PBSA 분해균의 genomic DNA를 추출하였다.

### 3. PCR을 통한 유전자 증폭

추출한 genomic DNA로부터 PBSA 분해효소 유전자(*lip A*)의 증폭에 사용한 PCR primer는 PDG-FF (5'-TTA CAC GCC CGC CAG CTT CAG-3'), PDG-MR (5'-GTC GAC AAC GTG CTG AAC AAG GC-3'), Blip-F (5'-ATG CGT CGT CAT TCA TTT TT-3') 및 Blip-R (5'-TTA TTT CCC GCT GAA GGT CA-3')으로 lipase gene을 타겟으로 하였다. 반응액은 genomic DNA 100 ng, primer (25 pmol) 0.2  $\mu\text{L}$ , dNTP mixture 2.0  $\mu\text{L}$ , 10X PCR buffer 2.5  $\mu\text{L}$ , DMSO 0.5  $\mu\text{L}$  및 Viva taq DNA polymerase (Vivagen, Korea)에 멸균증류수로 최종부피 25  $\mu\text{L}$ 를 만들어 사용하였다.

GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystem, USA)에서 pre-denaturation, ( $95^\circ\text{C}$ , 5분), denaturation ( $95^\circ\text{C}$ , 45초), annealing ( $62^\circ\text{C}$ , 45초), extension ( $72^\circ\text{C}$ , 2분)을 35회 실시한 후 extension ( $72^\circ\text{C}$ , 10분)함으로써 PCR을 수행하였다. *Bacillus*의 PBSA 분해효소 유전자는  $55^\circ\text{C}$ 에서 30초 동안 annealing시켰다. 증폭된 DNA는 1% agarose gel (Takara, Japan)에서 전기영동 (100 V, 50 min)을 하였다.

### 4. PBSA 분해효소 암호화 유전자의 분석 및 유전적 상동성 조사

증폭된 PBSA 분해효소를 암호화하는 유전자(*lip A*)는 gel extraction kit (Qiagen)로 정제한 후 TOPO TA cloning kit (Invitrogen)로 *E. coli* DH5 $\alpha$ 에 형질전환하였다. 유전자의 삽입 여부는 ampicillin ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ , Sigma), X-gal

(40 mg mL<sup>-1</sup>, Bioneer) 및 IPTG (100 mg mL<sup>-1</sup>, Bioneer)가 포함된 LB 평판배지에서 성장한 흰색 콜로니를 선별하여 Miniprep kit (Qiagen)로 분리된 plasmid DNA를 통해 확인하였다. 정제된 DNA를 제한효소 *EcoR* I로 37°C에서 4시간 처리하여 전기영동 상에서 최종 확인하여 (주)마크로젠에서 염기서열을 분석한 후 GenBank의 *Pseudomonas*와 *Bacillus* lipases를 암호화하는 유전자들과 비교·분석하였다. T-Coffee program (Poirot *et al.* 2003)을 사용하여 본 연구에서 증폭한 lipases 유전자 및 *Pseudomonas*와 *Bacillus* lipases 유전자들과의 염기서열을 아미노산으로 치환·정렬하고 NCBI의 BLAST 2 SEQUENCES를 통해 유전자들 간의 유전적 상동성을 조사하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. PBSA 분해효소 유전자의 증폭

PBSA를 포함한 지방족 폴리에스테르의 분해는 미생물이 분비하는 분해효소에 의한 생분해 또는 화학적 가수분해에 의하여 이루어진다. 이에 본 연구에서는 본 실험실에서 선별한 (주와 김 2009) PBSA 분해균의 genomic DNA를 주형으로 하여 PBSA 분해효소를 암호화하는 유전자로 보고된 (Tokiwa and Jarerat 2003) lipase 유전자 (*lip A*)를 암호화하는 부위를 증폭하기 위해 PCR을 수행하였다.

Fig. 1은 PCR로 증폭된 lipase 유전자 (*lip A*) 절편을 agarose gel에 전기영동하여 생성 산물의 크기를 측정할 결과, 분리균주 *B. cepacia* PBSA-7과 *Burkholderia* sp. PBSA-9의 lipase 유전자 (*lip A*)는 약 1.5 kb, *B. licheniformis* PBSA-8은 약 600 bp의 크기를 가지는 절편이었다. 이로부터 본 연구에 사용된 세 균주는 모두 PBSA 분해효소로서 lipase를 보유하는 것이 확인되었다.

PBSA 분해균에서 분해효소를 암호화하는 유전자에 대한 연구는 미미한 편으로 지금까지 보고된 연구로는 Park and Lee (2005)이 미생물로부터 생산된 lipase로 지방족 폴리에스테르의 가수분해 거동을 연구하고, Ando *et al.* (1998)은 시판되고 있는 미생물 유래 lipase인 lipase type XII (*Chromobacterium vixcosum*, Sigma), lipase type XIII (*Pseudomonas* sp., Sigma) 및 lipase B (*Pseudomonas fragi*, Sapporo Beer)에 대한 PBSA의 가수분해 정도를 HPLC로 측정할 바 있다.

### 2. 유전자의 염기서열 분석 및 유전적 상동성 조사

*B. cepacia* PBSA-7, *B. licheniformis* PBSA-8 및 *Burkhol-*

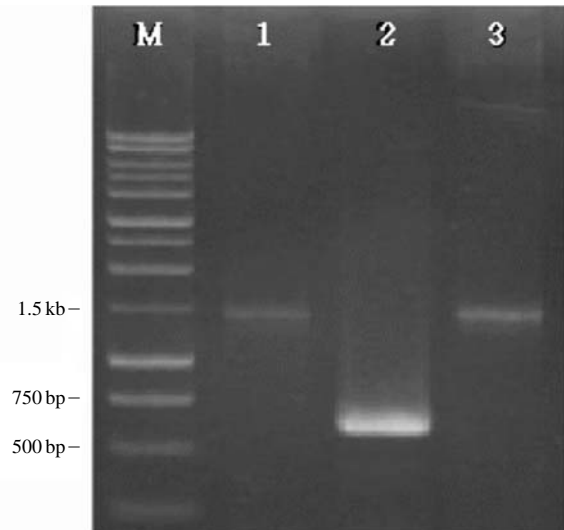


Fig. 1. Lipase (*lip A*) region fragment amplification. M. 1 Kb DNA ladder (Promega), Lane 1 *Burkholderia cepacia* PBSA-7, Lane 2. *Bacillus licheniformis* PBSA-8, Lane 3 *Burkholderia* sp. PBSA-9.

*deria* sp. PBSA-9의 PBSA 분해효소를 암호화하는 유전자의 염기서열 및 아미노산 서열의 분석 결과를 Figs. 2, 3 및 4에 제시하였다. 본 연구에서 PCR로 증폭한 PBSA 분해효소 유전자를 기초로 분석된 아미노산 서열 내에서 Chihara-Siomi *et al.* (1992)이 보고하였던 *Pseudomonas* lipases의 lipase box인 Gly-X1-Ser-X2-Gly를 확인하였다.

Uchida *et al.* (2002)은 일본 토양에서 분리한 *Acidovorax delafieldii* BS-3으로부터 PBSA와 화학적 구조가 유사한 poly (butylene succinate) (PBS) 분해효소 유전자 *PbsA*를 분석하여 아미노산 서열 내에 lipase box인 Gly-X1-Ser-X2-Gly의 존재를 밝히고, Shinohe *et al.* (1996)도 PHB 분해효소 유전자의 연구에서 *Pseudomonas lemoignei*의 PHB depolymerase A 및 *Alcaligenes faecalis*의 depolymerase A와 PHB depolymerase는 Gly-X1-Ser-X2-Gly의 lipase box를 가진다고 보고하였다. 그러나 본 연구 결과 PBSA 분해효소 유전자는 이들과 달리 lipase box의 X1 위치에 tryptophan 대신 histidine이 존재하였다.

대부분의 *Bacillus* lipases는 보통 lipase box의 첫 번째 아미노산인 glycine이 alanine 잔기로 변형된 Ala-X1-Ser-X2-Gly를 가진다고 알려져 있는데 (Jaeger and Arpigny, 1999), 본 연구에서 *B. licheniformis* PBSA-8의 분해효소 유전자의 아미노산 서열 내에도 이러한 *Bacillus* lipase box가 존재하였다.

본 연구에서는 *Burkholderia*와 *Bacillus* lipase box 사이에 다소 차이를 나타내어 *Pseudomonas*와 *Bacillus* lipases

```

TGGGTGCGTGTGAGCGCGAAAGCTGTAGCGCGCGACGCGCATGTCCGATCGACGATCGCGG 60
CGCACGAAACCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG 120
TAGTCAGGGCGCAAAAGCTGCGCGCGTCTGCTTCACTCCCGCATTCGACGCACACGATGC 180
CTGCGAGGGTTCGCGACGTCGCGTGGCGCGTCCGATCCGATTCATTGCGACCGCGGACGACG 240
ATAATCAGGAGAACATGCATGGCCAGATCGATGCGCTCCAGGGTGGTGGCAAGGGCGAGTG 300
GCATGGCGGATGAGCGTGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG 360
- A S R R S R G R P R - - R S R R
ACGCAGGCGCGGATGGCGCGCAACCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG 420
R R R R W R Q P A P A D N Y A A T R Y P
GATCATCCTCGTGCACGGGCTCACCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG 480
I I L V H G L T G T D K Y A G V L E Y W
GTACGGCATCCAGGAGGACCTGCGACGACGCGGTGCGGCGGTCTACGTGCGGCAACTTGTCT 540
Y G I Q E D L Q Q H G A T V Y V A N L S
GGGATTCAGAGCGGACGCGGTCCGAAACCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG 600
G F Q S D D G P N G R G E Q L L A Y V K
GACGTCGCTCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG 660
T V L A A T G A T K V N L I [ G H S Q G ] G
CCTCAGCTCGCGCATGTGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG 720
L T S R Y V A A V A P D L V A S V T T I
CGGCACCGCATCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG 780
G T P P H R G S E F A D F V Q S V L A Y D
TCCGACCGCGCGTGTGCTGCGCGGTGATGCGCGCATTCGCAATGTTGTCGGCATCCGTCGAC 840
P T G L S S S V I A A F V N V F G I L T
GAGCAGCAACAACAAACGAAACGAGGACGCGGTGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG 900
S S N N N T N Q D A L A A L K T L T T A
GCAGCGCGCGCGTACAGCAGCACTATCCGAGTGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG 960
Q A A A Y N Q N Y P S A G L G A P G S C
CCAGCGGGTGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG 1020
Q T G A P T E T V G G N T H L L Y S W A
CGCCAGCGCGCATCCAGCGCGCATCTCGCGCATTCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG 1080
G T A I Q P T I S A F G V T G A A D T S
CAGCATCCCGCTGATCGATCCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG 1140
CAGCGCGCGCGTGTGATGATCAATCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG 1200
CAGCGCGTGTGATGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG 1260
CAACCGTGTGCTCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG 1320

```

Fig. 2. Nucleotide sequence and amino acid sequence of the lip A region on Burkholderia cepacia PBSA-7. The box indicates the common sequence of lipase, Gly-X1-Ser-X2-Gly.

```

ATCGGTCGTCATTTTTATCTATTCTAATGATTGGCATGCTGCTGCTGCTGCGGTATT 60
TTCGTTCCAGCGCTGCTACAGCTTCCGCGCGTCCCGAAATCCGGTCTGATCGTTCACGGC 120
ATCGCGGAGCGCGATTAACCTTTATCGCGCATTAATCGTATTTACAATCTCAAGGCTGG 180
ACAAGCAGTGAAGCTTACGCCATCAACTTTATCTATAAAACAGGAAATAAATAAATCAAT 240
T S S E L Y A I N F I Y K T G N N K I N
GGCGGACACTATCCGAAATACATCAAGCATGCTGTAATCAACAGGAGCGTCAAAAGTC 300
A P T L S E Y I K H V L N Q T G A S K V
GATATTGTCGCTCAGCATGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG 360
D I V [ A H S M G ] G A N T L Y I K N L D
GGCGCACATAAAGTCGGAATGCTGCTTACCGTTGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG 420
G A H K V G H V T L G G A N R L V T N
ACGGCGCGTCCAGGAAAGCGAAATCTCATACACTTGGATTTACAGCACAAGCGACTATATC 480
T A P Q G S E I S Y T S I Y S T S D Y I
GTCTAAACAGCGCTCTCCAAACTGATGGTGCAGCAAAATGTGCAAAATCTCAGGCGTAAAG 540
CATGTGCGCGCTTTGTTGTCAGCAGCAAAAGTGAATGCCCTGATTAAAAACCGCTGACCTTCA 600
CGGGAAATAA

```

Fig. 3. Nucleotide sequence and amino acid sequence of the lip A region on Bacillus licheniformis PBSA-8. The box indicates the common sequence of lipase, Ala-X1-Ser-X2-Gly.

를 암호화하는 유전자 정보를 NCBI GenBank에서 확보하여 이들과 본 연구에서 증폭한 PBSA 분해균 B. cepacia PBSA-7, B. licheniformis PBSA-8 및 Burkholderia sp. PBSA-9의 PBSA 분해효소 유전자와의 유전적 상동성을 조사하여 Table 1과 2에 수록하였다.

B. cepacia PBSA-7의 PBSA 분해효소 유전자는 Jaeger와 Arpigny (1999)에 의해 분류된 lipase subfamily I-1에 속하는 lipases와 36~40%, subfamily I-2 lipases와는 82~92%의 높은 상동성을 나타내었다. 특히 Burkholderia

```

CGACGCTGTGGCGCTTGGATCGAGCAGACCGAGGGGGCCAAAGTTCTGGATGGGGTGGT 60
GAACACCGTGAAGCTGGCGGGCGGTAAAGTTGCAAGATCGCGCGCATGAATCGGGCCC 120
CGCCCGAACGGCGGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG 180
GTTCGCGACTCGTGTACTCCTCGCATTCGACGCACACGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG 240
TGGCGATCGGATCTCATCTGTAACCGCGCGCACAAATAACAGGAGAACTTCATGGCCAGA 300
G
TCGATGCGTTCAGGGTAATGGCAGGGCGAGTGGCATGGCGGATGAGCGTGGCGCGT 360
I D A F Q G N G R G S G M R D E R R A V
GGGGGACCGCGCGCTGATGACGCTTGGCGACGACCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG 420
C G D H G A D D A C D D A R G N G G D R
CCCCCGGACGACTACGGCAGCGCGTATTCGATCATCTCTGTCGACGGCGTACCGCG 480
A P P T T T R R R V I R S S S C T A - P
CACCGCACAAATACCGGGCGGTGCTCGAGTACTGGTACGGCATCCAGGAGGACCTGCAGC 540
A P D K Y A G V L E Y W Y G I Q E D L Q
AGCATGGCGCGAGCTGTACTGTCGCGAACCTGTGCGCGTTCAGAGCGACGCGCGCGCG 600
Q H G A S V Y V A N L S G F Q S D D G P
ACGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG 660
N G R G E Q L L A Y V K T V L A A T G A
CCAAGGTCATCTGCTCGCCACAGCGCGGGCGCGCGTGAAGTGGCGTATGTCGGGCGG 720
T K V N L V [ G H S Q G ] G L T S R Y V A A
TGGCACCGGATCTGCTGCGCGTGGTACGACGATCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG 780
V A P D L V A S V T T I G T P H R G S E
TCGCGCGACTTCGTCAGCGCGCGTCTGCGCTACGATCCGACGGCGTTCCTCGTGGTGB 840
F A D F V Q G V L A Y D P T G L S S V
TCGGCGCATTCGTCATGTTGTCGGGATCTGACGAGCAGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG 900
I A A F V N V F G I L T S S H N T N Q
ACGCACTCGCGCGCGTGAAGCGTGAAGCGCTCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG 960
D A L A A L K T L T T S Q A A T Y X R N
ATCCGAGTGGGGCGCTTGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG 1020
Y P S A G L G A P G S C Q T G A P T T I
TCGGCGCGCAACCCATCTGCTATTCATGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG 1080
S V F G V T G A A D T S T I P L V D P A
CGGTGTCGCGCGTCAAGCGTGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG 1140
ACGCGCTGACCCGCTGACGCGTCCGCGTGTTCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG 1200
GCTCGGGCGAGAACGCGCGCGTCTGTGCAAGTGCAGCTGTGCAGAACGCTGCTGAACAAG 1260
CGGATCTACCTGGCGCTGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG 1320
ATCGAGC

```

Fig. 4. Nucleotide sequence and amino acid sequence of the lip A region on Burkholderia sp. PBSA-9. The box indicates the common sequence of lipase, Gly-X1-Ser-X2-Gly.

cepacia lipase와는 92%로 가장 높은 유전적 상동성을 나타내었으나 subfamily I-1 lipases에 속하는 Pseudomonas fluorescens lipase와는 상동성을 거의 보이지 않는 것으로 나타났다.

B. licheniformis PBSA-8의 PBSA 분해효소 유전자의 경우에는 subfamily I-4 lipases와 64~65%의 비교적 높은 유전적 상동성을 보였으나, subfamily I-5에 속하는 lipases와는 상동성이 거의 없는 것으로 나타났다. 이번 연구에서 분석한 B. licheniformis PBSA-8의 PBSA 분해효소 유전자는 subfamily 1-4 lipases와 매우 밀접한 관련이 있는 것으로 나타났다.

Burkholderia sp. PBSA-9의 PBSA 분해효소 유전자도 subfamily I-1 lipases와 35~37%, subfamily I-2 lipases와는 83~94%의 높은 상동성을 보였다. 그러나 subfamily I-1 lipases에 속하는 lipase 중 Pseudomonas fluorescens lipase와는 유전적 상동성을 보이지 않았으며, 이는 B. cepacia PBSA-7의 PBSA 분해효소 유전자와 매우 유사한 결과이다. 이에 B. cepacia PBSA-7과 Burkholderia sp. PBSA-9 PBSA 분해효소 유전자 사이의 유전적 상동성을 비교하여 둘 사이에도 73%의 높은 유전적 상동성이 있음을 확인하였다.

**Table 1.** Genetic homology analysis with various lipases of *Burkholderia* spp.

Source of enzyme	Sequence adjacent to lipase box <sup>a</sup>	Identity (%)		GenBank accession number	References
		7	9		
<i>Burkholderia cepacia</i> PBSA-7	VNLV[GHSQG]GL		73		This study
<i>Burkholderia</i> sp. PBSA-9	VNLV[GHSQG]GL	73			This study
Family I-1 lipases					
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	VNLI[GHSHG]GP	40	37	AB008452	Chihara-Siomi <i>et al.</i> 1992.
<i>Pseudomonas fragi</i>	VNLI[GHSQG]AL	36	35	X14033	Aoyama <i>et al.</i> 1988.
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	VNLF[GHSQG]SL	— <sup>b</sup>	— <sup>b</sup>	S77830	Chung <i>et al.</i> 1991.
<i>Proteus vulgaris</i>	VNLI[GHSQG]PL	37	35	U33845	Kim <i>et al.</i> 1996.
Family I-2 lipases					
<i>Burkholderia cepacia</i>	VNLV[GHSQG]GL	92	94	M58494	Jorgensen <i>et al.</i> 1991.
<i>Burkholderia glumae</i>	VNLI[GHSQG]GL	82	83	X70354	Frenken <i>et al.</i> 1992.
<i>Chromobacterium viscosum</i>	VNLI[GHSQG]GL	82	83	AJ295616	Traub <i>et al.</i> 2001.
<i>Pseudomonas luteola</i>	VNLV[GHSQG]GL	91	92	AF050153	Litthauer <i>et al.</i> 2002.

<sup>a</sup>The lipase box is shown in box.

<sup>b</sup>No significant similarity was found.

**Table 2.** Genetic homology analysis with various lipases of *Bacillus* spp.

Source of enzyme	Sequence adjacent to lipase box <sup>a</sup>	Identity (%)	GenBank accession number	References
Family I-4 lipases				
<i>Bacillus pumilus</i>	DIV[AHSMG]GANT	64	AAR84668	Rasool <i>et al.</i> 2005.
<i>Bacillus subtilis</i> LipA	DIV[AHSMG]GANT	65	M74010	Dartois <i>et al.</i> 1992.
<i>Geotrichum candidum</i>	DIV[AHSMG]GANT	64	A02813	Yukie <i>et al.</i> 2003.
Family I-5 lipases				
<i>Bacillus thermoleovorans</i>	HII[AHSQG]GQTA	— <sup>b</sup>	AF134840	Rahman <i>et al.</i> 2007.
<i>Bacillus thermocatenuatus</i>	HII[AHSQG]GQTA	— <sup>b</sup>	X95309	Yukie <i>et al.</i> 2003.
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	HII[AHSQG]GQTA	— <sup>b</sup>	U78785	Kim <i>et al.</i> 1998.

<sup>a</sup>The lipase box is shown in box.

<sup>b</sup>No significant similarity was found.

이로부터 우리나라 토양에서 분리된 PBSA 분해균 *Burkholderia cepacia*, *Bacillus licheniformis*와 *Burkholderia* sp.는 PBSA 분해효소 암호화 유전자로써 염기서열 내에 lipase box를 보유하고 있는 lip A 유전자를 가지고 있으며, 이들 유전자는 기존에 알려진 lipases와 64% 이상의 높은 유전적 상동성을 보이며, 높게는 80% 이상의 유전적 상동성을 보이는 것으로 분석되었다.

## 적 요

우리나라 토양으로부터 분리된 (주와 김 2009) poly (butylene succinate-co-butylene adipate; PBSA) 분해균 *Burkholderia cepacia* PBSA-7, *Bacillus licheniformis* PBSA-8 및 *Burkholderia* sp. PBSA-9에서 PBSA 분해효소를 암호화하는 유전자를 분석하였다. PCR을 수행하여 *B.*

*cepacia* PBSA-7과 *Burkholderia* sp. PBSA-9는 약 1.5 Kb, *B. licheniformis* PBSA-8은 약 600 bp의 lipase 유전자 (*lip A*) 절편을 가지는 것을 확인하였다. 세 균주 모두에서 유전자의 염기서열 내 lipase box인 Gly-X1-Ser-X2-Gly와 Ala-X1-Ser-X2-Gly가 존재하였다. *B. cepacia* PBSA-7의 PBSA 분해효소 유전자는 family I-1 lipases와 36~40%, family I-2 lipases와는 82~92%의 높은 유전적 상동성을 보였다. 또한 *B. licheniformis* PBSA-8의 PBSA 분해효소 유전자는 subfamily 1-4 lipases와 64~65%의 유전적 상동성을 나타내었으나, subfamily 1-5에 속하는 lipase들과는 거의 유전적 상동성이 없는 것으로 나타났다. *Burkholderia* sp. PBSA-9의 PBSA 분해효소 유전자도 family I-1 lipases와 35~37%, family I-2 lipases와는 83~94%로 높은 유전적 상동성을 보여 *B. cepacia* PBSA-7의 PBSA 분해효소 유전자와 유사한 결과를 보였다.

## 참 고 문 헌

- 주현진, 김말남. 2009. 토양에서 분리한 Poly (butylenes succinate-co-butylene adipate) 분해균의 분해활성 증진. 환경생물. 27:198-204.
- Ando Y, K Yoshikawa, T Yoshikawa, M Nishioka, R Ishioka and Y Yakabe. 1998. Biodegradability of poly (tetramethylene succinate-co-tetramethylene adipate): I. Enzymatic hydrolysis. *Polymer Degrad. Stabil.* 61:129-137.
- Akutsu-Shigeno Y, T Teeraphatpornchai, K Teamtisong, N Nomura, H Uchiyama, T Nakahara and T Nakajima-Kambe. 2003. Cloning and Sequencing of a Poly (DL-Lactic Acid) Depolymerase Gene from *Paenibacillus amylolyticus* Strain TB-13 and Its Functional Expression in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:2498-2504.
- Chihara-Siomi M, K Yoshikawa, N Oshima-Hirayama, K Yamamoto, Y Sogabe, T Nakatani, T Nishioka and J Oda. 1992. Purification, molecular cloning, and expression of lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch. Biochem. Biophys.* 296:505-513.
- Hisano T, K Kasuya, Y Tezuka, N Ishii, T Kobayashi, M Shiraki, E Oroudjev, H Hansma, T Iwata, Y Doi, T Saito and K Miki. 2006. The Crystal Structure of Polyhydroxybutyrate Depolymerase from *Penicillium funiculosum* Provides Insights into the Recognition and Degradation of Biopolyesters. *J. Mol. Biol.* 356:993-1004.
- Jaeger KE and JL Arpigny. 1999. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem. J.* 343:177-183.
- Kasuya K, T Takano, Y Tezuka, WC Hsieh, H Mitomoa and Y Doi. 2003. Cloning, expression and characterization of a poly (3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Marinobacter* sp. NK-1. *Int. J. Biol. Macromol.* 33:221-226.
- Kobayashi T and T Saito. 2003. Catalytic triad of intracellular poly (3-hydroxybutyrate) depolymerase (PhaZ1) in *Ralstonia eutropha* H16. *J. Biosci. Bioeng.* 96:487-492.
- Matsuda E, N Abe, H Tamakawa, J Kaneko and Y Kamio. 2005. Gene Cloning and Molecular Characterization of an Extracellular Poly (L-Lactic Acid) Depolymerase from *Amycolatopsis* sp. Strain K104-1. *J. Biotechnol.* 187:7333-7340.
- Nakamura K, T Tomita, N Abe and Y Kamio. 2001. Purification and characterization of an extracellular poly (L-lactic acid) depolymerase from a soil isolate, *Amycolatopsis* sp. strain K104-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:345-353.
- Numata K, S Sato, M Fujita, T Tsuge, T Iwata, Y Doi and H Abe. 2007. Adsorption effects of poly (hydroxybutyric acid) depolymerase on chain-folding surface of polyester single crystals revealed by mutant enzyme and frictional force microscopy. *Polymer Degrad. Stabil.* 92:176-183.
- Papageorgiou CA, S Hermawan, CB Singh and D Jendrossek. 2008. Structural Basis of Poly (3-Hydroxybutyrate) Hydrolysis by PhaZ7 Depolymerase from *Paucimonas lemoignei*. *J. Mol. Biol.* 382:1184-1194.
- Park OJ and SH Lee. 2005. Stereoselective lipases from *Burkholderia* sp., cloning and their application to preparation of methyl(R)-N-(2,6-dimethylphenyl)alaninate, a key intermediate for (R)-Metalaxyl. *J. Biotechnol.* 20:174-182.
- Park DS, HW Oh, SY Heo, WJ Jeong, DH Shin, KS Bae and HY Park. 2007. Characterization of an Extracellular Lipase in *Burkholderia* sp. HY-10 Isolated from a Longicorn Beetle. *The Journal of Microbiology* 45:409-417.
- Poirot O, E O'Toole and C Notredame. 2003. Tcoffee@igs: a web server for computing, evaluating and combining multiple sequence alignments. *Nucleic Acids Research.* 2003. 31:3503-3506.
- Shinohe T, M Nojiri, T Saito, T Stanislawski and D Jendrossek. 1996. Determination of the active sites serine of the poly (3-hydroxybutyrate) depolymerase of *Pseudomonas lemoignei* (PhaZ5) and of *Alcaligenes faecalis*. *FEMS Microbiology letters* 141:103-109.
- Tokiwa Y and A Jarerat. 2005. Accelerated microbial degradation of poly (L-lactide). *Macromolecular Symposia* 224:367-376.
- Uchida H, YSA Yukie, N Nobuhiko, N Tadaatsu and NK Toshiaki. 2002. Cloning and Sequence Analysis of Poly (tetramethylene succinate) Depolymerase from *Acidovorax delatfieldii* Strain BS-3. *J. Biosci. Bioeng.* 93:245-247.
- Zhao JH, XQ Wang, J Zeng, G Yang, FH Shi and Q Yan. 2005. Biodegradation of poly (butylene succinate-co-butylene adipate) by *Aspergillus versicolor*. *Polymer Degrad. Stabil.* 90:173-179.

Manuscript Received: March 31, 2010

Revision Accepted: May 22, 2010

Responsible Editor: Hak Young Lee