[UCI]I804:24011-200000232740

2006年 2月

碩士學位論文

Streptomyces Cs 528 균주로부터 Phospholipase D의 생산, 분리정제 및 특성분석

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

藥 學 科

朴 恩 禎

Streptomyces Cs 528 균주로부터 Phospholipase D의 생산, 분리정제 및 특성분석

Production, Purification and Characterization of Phospholipase D from *Streptomyces* Cs 528

2006年 2月

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

藥 學 科

朴 恩 禎

Streptomyces Cs 528 균주로부터 Phospholipase D의 생산, 분리정제 및 특성분석

指導敎授 柳 鎭 鐵

이 論文을 藥學碩士 學位申請論文으로 提出함

2005年 10月 20日

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

藥 學 科

朴 恩 禎

朴恩禎의 碩士學位論文을 認准함

委員長　朝鮮大學校　敎授　高 玉 鉉　印

委　員　朝鮮大學校　敎授　金 成 俊　印

委　員　朝鮮大學校　敎授　柳 鎭 鐵　印

2005年　12月　02日

朝 鮮 大 學 校　大 學 院

Contents

List of tables

List of figures

Abbreviations

Abstract

Ⅰ. 서 론 ····· 1

Ⅱ. 재료 및 방법 ····· 7

Ⅱ-1. 시약 ····· 7

Ⅱ-2. 분석기기 ····· 7

Ⅱ-3. Phospholipase D를 생산하는 토양방선균의 분리 동정 ····· 7

Ⅱ-3-1. Phospholipase D활성을 가지는 토양 방선균의 분리 ····· 7

Ⅱ-3-2. Phospholipase D활성 측정 ····· 8

Ⅱ-3-3. 16S rDNA의 염기서열 ····· 8

Ⅱ-3-4. *Streptomyces* Cs 528 균주의 배양 ····· 9

Ⅱ-3-5. 단백질 정량 ····· 9

Ⅱ-4. Phospholipase D의 정제 ····· 9

Ⅱ-4-1. 조효소 조제 ····· 9

Ⅱ-4-2. Ammonium sulfate 분획 ····· 10

Ⅱ-4-3. Heat treatment ····· 10

Ⅱ-4-4. Sepharose CL-6B column chromatography ····· 10

Ⅱ-4-5. 최적 효소활성도와 안정성에 대한 온도의 영향 ····· 11

Ⅱ-4-6. 효소활성도와 안정성에 대한 pH의 영향 ····· 11

Ⅱ-4-7. 효소활성도에 대한 계면활성제에 대한 영향 ····· 11

Ⅱ-4-8. 효소활성도에 대한 금속이온에 대한 영향 ····· 12
Ⅲ. 결과 및 고찰 ····· 13
Ⅲ-1. *Streptomyces* Cs 528 균주의 동정 ····· 13
Ⅲ-2. Phospholipase D의 생산 ····· 15
Ⅲ-3. *Streptomyces* Cs 528 이 생산하는 phospholipase D의 분리정제 ····· 15
Ⅲ-4. 효소활성도와 안정성에 대한 온도의 영향 ····· 16
Ⅲ-5. 효소활성도와 안정성에 대한 pH의 영향 ····· 16
Ⅲ-6. 효소활성도에 대한 계면활성제의 영향 ····· 16
Ⅲ-7. 효소활성도에 대한 금속 이온의 영향 ····· 17

Ⅳ. 결론 ····· 18

Ⅴ. 참고문헌 ····· 31

List of tables

Table 1. Similarity of nucleotide sequence of 16S rDNA of *Streptomyces* Cs 528 with related species ····· 21
Table 2. Purification of phospholipase D from *Streptomyces* Cs 528 ····· 23
Table 3. Effect of detergents on the hydrolytic activity of phospholipase D of *Streptomyces* Cs 528 ····· 29
Table 4. Effect of metal ions on the hydrolytic activity of phospholipase D of *Streptomyces* Cs 528 ····· 30

List of figures

Fig 1. Hydrolysis of phosphatidylcholine by phospholipases ····· 5
Fig 2. Schematic representation of phospholipase D reactions ····· 6
Fig 3. Fermentation profiles for production of phospholipase D from *Streptomyces* Cs 528 ····· 20
Fig 4. Elution profiles of phospholipase D on sepharose CL-6B column chromatography ····· 22
Fig 5. Molecular weight determination of phospholipase D by SDS-PAGE ····· 24
Fig 6. Effect of temperature on hydrolytic activity of phospholipase D of *Streptomyces* Cs 528 ····· 25
Fig 7. Thermal stability of phospholipase D of *Streptomyces* Cs 528 ····· 26
Fig 8. Effect of pH on activity of phospholipase D of *Streptomyces* Cs 528 ····· 27
Fig 9. pH stability of phospholipase D of *Streptomyces* Cs 528 ····· 28

List of abbreviations

DAG	Diacylglycerol
PC	Phosphatidylcholine
PA	Phosphatidic acid
sn	Stereochemical numbering
PLA	Phospholipase A
PLC	Phospholipase C
IP_2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
IP_3	Inositol 1,4,5-triphosphate
PKC	Protein kinase C
PLD	Phospholipase D
$CaCO_3$	Calcuim carbonate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis
EDTA	Ethylene deamine tetraacetic acid

ABSTRACT

Production, Purification and Characterization of Phospholipase D from *Streptomyces* Cs 528

Eun-Jung Park
Adviser: Jin-Cheol Yoo, ph.D.
Dept. of Pharmacy,
Graduate School of Chosun University

Soil samples were screened for actinomyces strains that capable of producing phospholipase D, and *Streptomyces* Cs 528 showing a high phosholipase D activity was isolated. *Streptomyces* Cs 528 produced phospholipase D when grown in GCS medium containing glycerol 1.0%, soybean meal 1.0%, $CaCO_3$ 0.1% at 28℃. Analysis of the 16S rDNA showed that the strain Cs 528 was highly homologous to *Streptomyces mirabilis* DSM 40553T and *Streptomyces olivochromogenes* DSM 40451T. One form of extracellular phospholipase D was purified through ammonium sulfate fractionation, heat treatment, ultramembrane (YM10) filtration, sepharose CL-6B column chromatography, DEAE-sepharose CL-6B column chromatography, sephadex G-75 column chromatography, which produced a major band of 56KDa on a 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Biochemical properties of purified phospholipase D were examined. The optimal temperature for hydrolytic activity was 60℃.

About 100% of enzyme activity kept at 60℃without any loss for 30min. The enzyme showed an optimal pH of 8.0 in hydrolytic reaction and was stable between pH 7.5-10. Triton X-100 increased enzyme activity, but activity of enzyme was inhibited by N-laurylsarcosine and SDS. The enzyme activity was enhanced in the presence of 2mM metal ions namely Ca^{2+} and activity also inhibited in the presence of 2mM metal ions, such as Co^{2+}, Zn^{2+}, EDTA.

Ⅰ. 서 론

인지질은 생체막의 구성원이기도 하고 동시에 phospholipase의 활성화로 인해 다양한 종류의 이차전달물질이나 지질성 화학매개물질이 되어 세포내 혹은 세포간의 신호전달에 있어서 중요한 역할을 담당한다.

최근 많은 종류의 호르몬, 생장인자 등의 신경전이 물질에 의해 세포막에 존재하는 인지질인 phosphatidylcholine (PC)의 가수분해에 의한 DAG의 증가가 밝혀지면서 PC 가수분해에 의한 신호전이 기작에 많은 관심이 모아지고 있다. PC는 phosphatidic acid (PA)에 choline이 결합된 것으로 3가지 다른 효소에 의해 가수 분해될 수 있다.[1-5] (Fig. 1)

Phospholipase A_2 (PLA_2)는 세포질에 존재하다가 세포가 자극을 받은 경우 세포막으로 이동하여 인지질의 sn-2 위치에 결합한 arachidonic acid를 유리시킨다.[6,7] Fatty acid의 일종인 arachidonic acid는 arachidonic cascade에 관련한 여러 효소에 의해 생성되는 eicosanoid라 통칭하는 prostaglandin, thromboxane, leukotriene등의 지질성 화학전달물질의 전구체이다. Arachidonic acid를 기질로 하여 cyclooxygenase가 생성시킨 eicosanoid는 낮은 농도에서 혈소판 응집, 혈압조절, 천식 등에 광범위한 작용을 하여 염증, 혈전증, 혈액 순환기계질환 등의 각종 질병의 병리에 중요한 역할을 담당하고 있다. 따라서 PLA_2 저해제 탐색은 새로운 항염증, 항혈전제로 개발이 기대되고 있는데, PLA_2 저해제는 PLA_2활성을 차단하여 eicosanoid류의 생합성 경로인 cyclooxygenease, lipoxygenase 경로를 모두 차단하여 항염증, 항혈전 효과를 가지면서 동시에 cyclooxygenase의 부작용인 위궤양발생을 줄이는 등의 부작용 경감효과를 얻을 수 있다.

Phospholipase C (PLC)는 PC를 phospho-choline과 second messenger 중의 하나인 DAG를 증가시켜 세포를 활성화시킨다.[8]

생물은 외부로부터 오는 자극에 대해 반응을 하기 위해 다양한 기작을

가지고 있는데, 활성화된 phospholipase C는 세포막에 미량으로 존재하는 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (IP_2)를 수용성의 Inositol 1,4,5-triphosphate (IP_3)와 diacylglycerol (DAG)로 분해한다.[6]

IP_3와 DAG는 phospholipase C가 매개하는 신호전달 체계에서 중요한 이차신호전달물질로 알려져 있다. IP_3는 세포 내부의 칼슘을 방출시키는 작용을 하며 DAG는 protein kinase C (PKC)를 활성화시킨다.[6,9-12]

PKC는 다른 효소나 단백질을 계단식으로 인산화시키는 과정을 통해 세포는 외부로부터 오는 자극에 대해 반응하며 결과적으로 생물의 대사, 분비, 수축, neural activity, 세포증식 등의 세포와 성장과 분화를 유도한다.[7, 13-15] 지금까지 phospholipase C의 isozyme들이 포유류의 조직들로부터 cDNA coloning과 단백질 정제에 의해 밝혀져 있다. Phospholipase C는 cDNA에서 유추한 아미노산 서열을 비교하여 크게 PLC-α, PLC-β, PLC-γ로 분류할 수 있고 이 세 가지에서 적어도 16종류의 isoform이 발견되었다.[16] 현재까지 알려진 PLC 저해 물질에는 유기합성 ether lipid analogue인 ET-18-OCH_3[17], phosphoinositol analogue[18], 식물유래 PLC저해물질로써 *Selaginella tamariscina*에서 분리된 amentoflavone[19], *Sophora flavenscens*에서 분리한 prenylated flavones[20] 등이 있으며 미생물에서 유래 PLC저해 물질로는 *penicillium vinaceum*으로부터 분리된 vinaxanthone[21], *Actinomadura sp.* 의 Q12713[22], *Chatetosphaeronema hispidulum*의 hispidospermidin[23], *Caloporusdichrous*의 caloporoside[24]등이 최근에 보고되었다.

PhospholipaseD(E.C.3.1.4.4)는 세포막에 존재하는 인지질인 phosphatidylcholine(PC)을 가수분해하여 phosphatidic acid를 증가시켜 세포를 활성화시키는 기능을 한다. Phospholipase D (PLD) 는 두 가지의 효소 활성을 나타낸다. (Fig. 2) 첫 번째의 활성은 phosphatidyl choline을 phosphatidic acid 와 choline으로 가수분해하는 효소활성이고 (hydrolytic activity), 다른 하나의 활성은 phosphatidyl choline의 polar head group

을 상호 변환시켜 다른 phospholipid를 만드는 transphosphatidylation 효소활성이다.[25-27] 이 두 반응 중 transphosphatidylation은 생물 세포막을 구성하는 인지방질의 결합비율과 깊은 관계가 있는 것으로 연구되어 왔으며 이런 성질을 이용하여 lecithin으로부터 phosphatidylglycerol이나 phosphatidylethanol, phosphatidylserine등을 대량생산할 수 있는 기술개발이 활발히 이루어지고 있다. 한편으로는 인지질 가운데 cardiolipin이 약리적 작용이 있다는 사실 등이 확인됨으로써 lecithin으로부터 transphosphatidylation을 이용한 공업적인 생산방법도 시도되고 있으며 의료계에서는 매독혈청 진단용 등의 병리학적인 연구도 전개되고 있다.

최근 전 세계적으로 겪고 있는 문제 중 하나가 고령화 사회이다. UN인구국은 국가의 전체인구 중 65세 이상 노령인구의 비율이 7% 이상일 때를 고령화사회, 14% 이상일 때를 고령사회(aged society), 20% 이상일 때를 초고령사회로 분류하고 있다. 이 기준에 따르면 일본과 스웨덴은 이미 고령사회를 지나 초고령사회로, 미국의 경우도 고령화사회를 지나 고령사회를 향해 가고 있으며 우리나라의 경우도 2000년 7월 1일을 기점으로 65세 이상 노령인구가 처음으로 총인구의 7.1%를 넘어서는 고령화 사회에 진입하였다. 이러한 고령자가 많은 사회가 안고 있는 중심적 문제로서 뇌기능의 문제나 정신적 장해의 문제가 있다. 현재, 미국에 있어서 85세 이상의 노령자의 약 반수가 무엇인가의 정신적 장해를 갖고 있다고 말하고 있다. 한편, 일본에서도 고령자의 알츠하이머증을 시작으로 하는 치매증이 사회적으로 큰 문제가 되고 있다. 건강한 사람이라도 기억력 등의 뇌 기능 저하는 50세대에서 시작된다고 알려져 있고, 뇌의 기능은 쇠약해져 간다. 이처럼, 사람이 장수를 누리고 있는 지금, 단지 생명을 유지하는 것이 아니라, 어떻게 질이 높은 생활 (Quality of Life)을 유지하는 가가 중요한 과제가 되고 있다. 질이 높은 생활에의 사회적 요구가 높아지는 중, 다양한 뇌 기능성 소재가 발견되고 있다. 그 중에서 phospholipid류는 알츠하이머증을 시작으로 하는 치매증의 개선, 기억력 저하의 완화, 간질, 스트레스

내성, 호르몬 리듬분비의 수복에 있어서 놀라운 효과를 보이고 있다.

고령화 사회를 넘어선 우리나라에서도 노인의료복지의 필요성이 증대함에 따라 노인성 질환 예방 및 치료를 위한 의약품이나 예방목적의 기능성 식품의 수요가 그게 증가할 것으로 예상이 되며 위의 뇌 기능성 소재로써 phospholipid는 노인의료에 큰 비중을 차지할 것으로 본다.

현재 우리나라는 phospholipids 뇌 기능성 소재는 수입에 의존하고 있기 때문에 국내 자체적으로 phospholipid를 생산하여 외국산 제제를 대체할 수 있는 경쟁력의 확보가 필수적이라고 할 수 있다. 현재 국내 생산을 위해 일부 연구소에서 미생물과 양배추에서 유래한 phospholipase D를 이용한 phospholipid의 연구를 하고 있으나 규모가 적기 때문에 국내 자체적으로 대량 생산할 수 있는 기술확보를 위한 연구의 활성화가 필수적이다. Phospholipase D 는 포유류, 식물, 미생물에서 발견되고 있으며, phospholipid를 공업적으로 생산하기 위해 phospholipase D 에 대한 연구가 미생물에서 주로에서 이루어지고 있는데 방선균에서는 *S. hachijoensis, S. lydicus, S. antibioticus, S. choromofuscus, Streptoverticillium cinnamoneum* 등에서 phospholipase D 의 생산이 보고되었으며 활발한 연구가 진행되고 있다.

Phospholipase D는 아직까지 상업적인 생산단계에 와 있지는 않으나, 최근에는 유전자 조작으로 안정된 균주를 확립하려는 연구도 시도되고 있다. 본 연구에서는 우수한 균주의 확보에서부터 새로운 용도의 개발에 이르기까지 독자적인 연구를 서두를 필요가 있어, 전남지역의 토양에서 분리한 방선균을 대상으로 phospholipase D의 분해활성을 가지는 방선균을 수 종 분리하여 이들 중 활성이 뛰어난 *Streptomyces* Cs 528 균주를 선별하였으며 균주의 동정 및 균주가 생산하는 phospholipase D를 분리 정제하고 특성을 조사하였다.

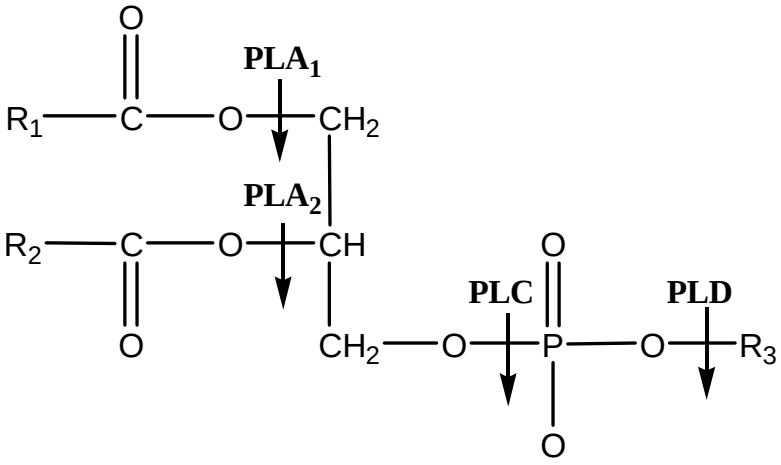

Fig. 1 Hydrolysis of phosphatidylcholine by phospholipases.

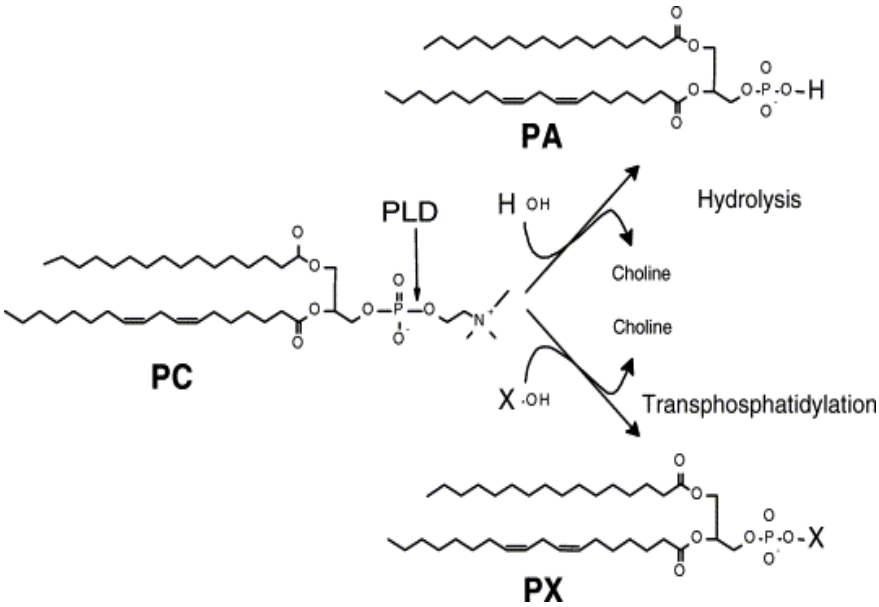

Fig. 2 Schematic representation of phospholipase D reactions The enzyme catalyzes two types of reactions : hydrolysis of phosphatidylcholine (PC), a major substrate of PLD, to phosphatidic acid (PA) and choline (hydrolytic reaction), and transfer of polar head groups to others (transphosphatidylation reaction).

Ⅱ. 재료 및 방법

Ⅱ-1. 시약

방선균의 배양을 위한 배지는 주로 Junsei사의 제품을 사용하였다. 효소 활성에 쓰이는 phosphatidylcholine, EDTA, 4-aminoantipyrine, phenol은 Sigma사의 제품을 사용하였다.

Ⅱ-2. 분석기기

효소정제를 위한 Sepharose CL-6B, DEAE-Sepharose CL-6B, Sephadex G-75 CM-Sepharose C50은 Pharmacia의 제품을 사용하였다. 효소반응에 의해 생성된 구성 인지질의 확인을 위해 High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC, Silicagel 60 F_{254}, Merck) 를 사용하였다.

Ⅱ-3. Phospholipase D활성을 가지는 토양 방선균의 분리 동정

Ⅱ-3-1. Phospholipase D활성을 가지는 토양 방선균의 분리

전남 해안 지역에서 채취한 토양 샘플을 3일정도 건조시킨 후 단계적으로 희석하여 Bennet's agar medium (1% Glucose, 0.1% Yeast extract, 0.2% Peptone, 0.1% Beef extract, pH:7.0) 에 nalidicxic acid (20ul/ml) 을 첨가한 배지에 도말하여 28℃에서 1-3주일간 배양하였다. 나타난 균체집락을 선정하여 다시 egg yolk medium에 도말하여 lipolytic 활성을 가지는 방선균을 선별하였다. 이렇게 선별된 방선균은 ISP2

medium (0.2% Yeast extract, 1% Malt extract, 0.4% Glucose, pH:7.2)에 접종하여 28℃, 200rpm에서 배양하며 lipase활성을 관찰하였다. 분리 및 선별된 균주들은 OSYM (2% Oatmeal, 1% Soybean meal, 1% Dried yeast, 1% Mannitol) agar plate에서 배양 후 4℃의 냉장고에 보관하면서 사용하였다. 균주의 장기 보관은 포자를 20% glycerol로 보관용 vial에 취해 -85℃에 보관하고 6개월마다 계대 보존하였다.

Ⅱ-3-2 Phospholipase D활성 측정

효소활성 측정은 phosphatidylcholine을 기질로 하는 방법을 사용하였다. 효소용액 20ul에 substrate emulsion (phosphatidylcholine 200mg을 증류수 4ml과 0.4ml diethylether과 섞어 1시간동안 sonication시킴) 80ul을 섞어 55℃에서 20분간 반응을 시키고 50mM EDTA (50mM EDTA in 1M Tris/Cl buffer pH 8.0) 으로 효소반응을 정지시키고 5분간 100℃에서 끓였다. 2분간 얼음에 방치 후 12,000rpm에서 10분간 원심분리 후 상등액 100ul을 choline assay solution (choline oxidase 1.7mg, peroxidase 65ug, 4-aminoantipyrine 30mg, phenol 15mg을 10mM Tris/Cl pH 8.0 30ml에 녹임) 150ul과 혼합 후 37℃에서 60분간 반응을 시켰다. 반응 후 용액은 Triton X-100 300ul을 가하여 500nm에서 흡광도를 측정하였다.

Ⅱ-3-3. 16S rDNA의 염기서열

16S rDNA는 capillary rapid cycler (Idaho Technology)로 증폭하였으며 primer로는 27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCT-3) 1492r (5'-AAGGAGGTGWTCCARCC - 3') (Lee *et al.*, 2000)을 사용하였다. 증폭조건은 변성은 94℃에서 1분, annealing은 55℃에서 1분, 신장은 72℃에

서 1분간 총 30회 반복하였다. 증폭된 DNA는 Taq DiDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)와 oligonucleotide primers (Chun and Goodfellow, 1995)를 이용해 직접 서열을 확인하였다. 얻어진 16S rDNA 염기서열은 AL16S program (Chun, 1995)을 이용해 Ribosomal Database project (Maidak *et al.*, 1996)와 EMBL/GenBank database로부터 얻어진 *actinomycetes*의 16S rDNA sequence와 비교 분석하였다.

Ⅱ-3-4. *Streptomyces* Cs 528 균주의 배양

OSYM agar 배지에서 배양한 균주의 균사체 및 포자를 취하여 50ml의 OSYM 액체배지가 들어있는 250ml baffled flask에 접종하여 28℃ 180rpm에서 3일간 전 배양하였다. 이 배양액을 phospholipase D의 생산을 위해 자체 개발한 GSC (1% Glycerol, 1% Soybean meal, 0.1% $CaCO_3$) medium에 2% 수준으로 접종하여 28℃, 180rpm에서 5일간 배양하였다.

Ⅱ-3-5. 단백질 정량

단백질의 농도는 Bradford의 방법[33]을 이용하여 bovine serum albumin (Sigma co.)을 표준시료로 하여 측정하였으며 효소 정제 과정 중 분획내의 상대적 단백질 농도는 280nm 흡광도로 측정하였다.

Ⅱ-4. Phospholipase D의 정제

Ⅱ-4-1. 조효소 조제

OSYM agar 배지에서 배양한 균주의 균사체 및 포자를 취하여 50ml의

OSYM 액체 배지가 들어있는 250ml baffled flask에 접종하여 28℃ 180rpm에서 3일간 전 배양하였다. 이 배양액을 phospholipase D의 생산을 위해 자체 개발한 phospholipase D용 배양배지 GSC (1% Glycerol, 1% Soybean meal, 0.1% $CaCO_3$) medium 1L에 2%수준으로 접종하여 28℃ 180rpm에서 5일간 배양하였다. 배양액은 5000rpm에서 30분간 원심분리 후 상층액을 조효소로 이용하였다.

Ⅱ-4-2. Ammonium sulfate 분획

조효소 용액에 20-90%가 포화되도록 ammonium sulfate를 가하고 원심분리 (7,000rpm, 60분)하여 침전물을 회수하였다. 회수한 침전물에 10mM Tris-HCl (pH 8.0)를 가하여 용해시킨 후 YM10 (M.W 10,000) membrane을 사용하여 농축 및 탈염하고 동일완충액으로 평형화시켰다.

Ⅱ-4-3. Heat treatment

20-90% ammonium sulfate처리 후 탈염 농축한 효소시료는 phospholipase D의 열안정성을 고려하여 효소가 denaturation되지 않는 온도인 60℃에서 1시간 처리하여 열에 약한 protein을 일부 제거하였다.

Ⅱ-4-4. Sepharose CL-6B column chromatography

20-90% ammonium sulfate농축 탈염, 열처리후의 효소시료는 Sepharose CL-6B (2.0*115cm)column에 적하하고 10mM Tris - HCl (pH8.0) buffer를 이용하여 전개시켜 활성을 보이는 분획들을 회수하였다. 회수된 효소용액을 amicon UF 막인 YM10 membrane을 이용하여 농축 후 동일완충액으로 평형화시켰다. 정제된 효소의 확인은 Laemmli의 방법에 따

라 SDS-PAGE로 수행하였다.

Ⅱ-4-5. 최적 효소활성도와 안정성에 대한 온도의 영향

최적 활성 온도는 10-70℃의 범위에서 pH(8.0)조건으로 효소 반응을 수행하여 활성을 측정하였다. 효소의 열에 대한 안정성은 효소 용액을 60℃의 온도에서 30분간 방치한 후 잔존효소 활성을 측정함으로써 효소의 열에 대한 안정성을 측정하였다.

Ⅱ-4-6. 효소활성도와 안정성에 대한 pH의 영향

정제된 효소활성에 대한 최적 pH는 pH 2-7.5는 sodium-citrate buffer, pH 7.5-10는 Tris-HCl buffer를 사용하여 효소활성을 측정하였으며 pH에 대한 안정성은 pH 2-10의 범위에서 4℃, 24시간 방치 후 잔존효소 활성을 측정함으로써 pH 안정성을 측정하였다.

Ⅱ-4-7. 효소활성도에 대한 계면활성제에 대한 영향

효소활성에 미치는 계면활성제의 영향을 조사하기 위해 효소의 활성에 영향을 미치는 계면활성제들(Tween20, Tween80, Deoxycholic acid, N-laurylsarcosine, CHAPS, Polyoxyethylene-4-laurylether, SDS)을 2%(v/v)가 되도록 효소액에 첨가하고 55℃에서 20분간 반응시킨 후 효소의 활성의 변화를 측정하였다.

Ⅱ-4-8. 효소활성도에 대한 금속에 대한 영향

효소 활성에 미치는 금속이온들의 영향을 조사하기 위해 효소반응용액에 금속이온 (Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+}, EDTA)을 2mM 되도록 첨가하고 55℃에서 20분간 반응시킨 후 효소의 활성의 변화를 측정하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

Ⅲ-1. *Streptomyces* Cs 528 균주의 동정

Ⅲ-1-1. 형태학적 특성 분석

전남 해안 지역에서 분리한 600여종의 방선균 중 phospholipase D의 분해활성이 높은 균주인 *Streptomyces* Cs 528 균주를 선별하였다. *Streptomyces* Cs 528 균주를 OSYM agar 배지에 접종한 후 28℃에서 배양하였을 때 3~4일이 경과하면서부터 colony가 관찰되었으며 이 colony들은 단단하였으면 포자들은 substrate mycelium에 달라붙어 쉽게 떨어지지 않았다.

Ⅲ-1-2. 분자생물학적 특성 분석

Streptomyces Cs 528 균주에서 추출한 total DNA를 template를 이용하여 16S rDNA 부분을 PCR 반응으로 증폭하였으며 증폭된 16S rDNA 부분의 9182개의 염기서열은 다음과 같다.

5'->>TGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGT
CGAACGATGAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGT
AACACGTGGGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACG
GGGTCTAATACCGGATAACACCTGCCCGGGCATCTGGGTGGGTTAAA
AGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTG
AGGTAGTGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGC
GACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGG
CAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGAC
GCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAG

GGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACT
ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGA
ATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCACGTCGGGTGT
GAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTCGATACGGGCTAGCT
AGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATG
CGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCC
ATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGA
TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGAACTAGGTGTTGGCGA
CATTCCACGTCGTCGGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCCGCCT
GGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC
CGCACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAA
CCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAAGCATTAGAGATAGTGCCC
CCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTG
TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTTCT
GTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGATGGGGACTCACAGGAGACTG
CCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGC
CCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCAGGTACAATGA
GCTGCGAAGCCGTGAGGCGGAGCGAATCTCAAAAAGCCTGTCTCAGT
TCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAGT
AATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA
CACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTG
GCCCAACCCCTTGTGGGAGGGAGCTGTCGAAGGTGGGACTGGCGATT
GGGACGAAGTCGTA-3'

결정된 16S rDNA의 염기서열을 Blast search program(NCBI)를 이용하여 가장 유사도가 높은 균주들을 검색한 결과, 분석 균주는 *Streptomyces*속에 속하는 세균으로 나타났다. *Streptomyces*속은 495종(2004년 기준)이 존재하며, 16S rDNA sequence 분석 결과, *Streptomyces mirabilis* DSM

40553T와는 99.89%의 similarity를 *Streptomyces olivochromogenes* DSM 40451T 와는 100%의 similarity를 보여 계통수에서도 두 균주와 매우 높은 친화적 유연관계를 보임으로 이 두 균주 중 할 종일 가능성이 높다. (Table 1.)[34-38]

Ⅲ-2. Phospholipase D의 생산

Streptomyces Cs 528균주를 GSC 배지 200ml이 들어있는 1L baffled flask에 2%의 종배양액을 접종하고 28℃, 180rpm에서 배양하면서 배양시간에 따른 phospholipase D의 생산성, 건조 균체량, pH 변화를 조사하였다. 균의 증식은 배양 24시간째부터 증가하기 시작하여 48시간째까지 증가하였으나 그 이후부터 균의 생육이 차츰 감소하였다. Phospholipase D의 생성은 배양 24시간째부터 증가하여 120시간째까지 증가하였다가 이후에는 감소하였다. 배양액 내의 pH는 72시간부터 서서히 증가하였다. (Fig. 3)

Ⅲ-3. *Streptomyces* Cs 528이 생산하는 Phospholipase D의 분리정제

Streptomyces Cs 528에 의해 생산된 phospholipase D의 전반적인 정제과정들은 Table 2.에 요약하여 나타내었다. 조효소액을 ammonium sulfate, heat treatment, Sepharose CL-6B column chromatography (Fig. 4)에 의해 PLD를 정제하였다. *Streptomyces* Cs 528의 배양 여액을 ammonium sulfate (20-90%) 로 분획하고 농축하여 탈염시킨 효소용액을 얻었다. 이 용액을 60℃에서 1시간 처리하고 12,000rpm에서 30분간 원심분리를 하여 열에 약한 단백질들을 제거하였다. 원심분리 후 얻은 상등액은 10mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)으로 평형화시키고 최소로 농축하여

동일 완충액으로 평형화된 Sepharose CL-6B column (1.8*113cm)에 적하하여 동일 완충액으로 9ml/hr의 속도로 용출시켰다. Fig. 4에서와 같이 phospholipase D는 단일 피크로 용출되었다. Sepharose CL-6B column 활성분획의 정제도는 3.46배였으며 수율은 24.73%였고 비활성도는 4.40unit/mg이었다. Sepharose Cl-6B column에서 얻은 활성 분획을 amicon UF막인 YM10 (MW 10,000)을 사용하여 농축한 후 정제된 phospholipase D의 분자량은 SDS-PAGE를 통해 약 56KDa인 것으로 밝혀졌다. (Fig. 5) 이는 Carrea 등[39]이 *Streptomyces* 속에서 분리 정제한 PLD 효소(50KDa)와 비슷한 크기인 것으로 나타났다. 그러나 Shimbo등[40]이 *Streptomyces antibioticus*에서 분리 정제한 PLD의 분자량은 약 64KDa으로 나타나 이것보다는 약간 적은 분자량을 나타내고 있다.

Ⅲ-4. 효소활성도와 안정성에 대한 온도의 영향

온도가 정제된 효소활성과 안정성에 미치는 영향을 조사하였다. 효소반응의 최적 온도는 60℃로 나타났으며 55-65℃사이에서는 상대적으로 높은 활성을 유지하였다. 60℃에서 30분 동안 처리 시 효소의 열안정성은 100% 유지하였다. (Fig. 6,7)

Ⅲ-5. 효소활성도와 안정성에 대한 pH의 영향

pH가 phospholipase D의 활성과 안정성에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과, 효소반응의 최적 pH는 8.0으로 나타났다. 각각의 pH 범위에서 4℃, 24시간동안 처리 후 잔존 활성을 조사한 결과 pH 안정성은 7.5-10 부근으로 알칼리조건에서 안정한 것으로 나타났다. (Fig. 8,9) 이는 Dong-Hwa, Shon 등[41]이 *Actinomycetes* KF 293에서 분리 정제한 PLD 효소의 pH 및 온도에 대해 영향을 본 결과와 비슷한 경향을 보이고 있다.

Ⅲ-6. 효소활성도에 대한 계면활성제의 영향

효소에 영향을 미치는 계면활성제인 Triton X-100, Tween 20, Tween 80, Deoxycholate, CHAPS, N-laurylsarcosine, Polyoxyethylene-4-laurylether, SDS를 2%(v/v)로 하여 효소활성에 대한 영향을 검토하였다.

실험결과 Table 3. 에 나타낸 바와 같이 효소는 Triton X-100에서 최대 활성을 나타내었다. SDS 첨가 시 89.5%의 저해를 나타내었으며 N-laurylsarcosine은 87.5%, CHAPS는 63.2%의 효소활성이 저해되었다.

Ⅲ-7. 효소활성도에 대한 금속이온의 영향

효소 반응용액에 금속이온(Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+}, EDTA)을 2mM 되도록 첨가한 후 효소 활성의 변화를 측정하였다. Table 4. 에 나타낸 바와 같이 효소는 효소활성에 Ca^{2+}이온을 요구하였으며 Zn^{2+}, EDTA에 의하여 효소활성이 저해되었다. 이는 Shimbo등[40]이 *Streptomyces antibioticus*에서 분리 정제한 PLD의 여러 가지 금속이온에 대해 영향을 본 결과에서 큰 차이(99-100%)를 보이지 않았던 것과 다른 경향을 보이고 있다.

Ⅳ. 결　　론

전남 지역에서 채취한 토양 시료로부터 600여종의 방선균주를 분리하였다. 이들 균주의 배양 상등액 중 phospholipase D의 가수분해 활성이 양호한 균주를 탐색한 결과, 3종의 균주를 선발하였으며 이 중 활성이 높은 *Streptomyces* Cs 528 배양액으로 phospholipase D 효소를 분리정제하여 그 특성을 조사하였다. 16S rDNA 염기서열을 유사도가 높은 균주를 검색한 결과 *Streptomyces* Cs 528 균주는 *Streptomyces olivechromogenes* DSM 40451T 와는 100%의 가장 높은 유사도를 나타내었다.

Streptomyces Cs 528 균주는 1% Glycerol, 1% Soybean meal, 0.1% Calcium carbonate의 배양배지에서 28℃, 180rpm에서 배양하였을 때 120시간째 최대 활성을 나타내었으며 그 이후로부터는 점차 효소 활성이 감소하였다. *Streptomyces* Cs 528을 GSC (1% Glycerol, 1% Soybean meal, 0.1% Calcium carbonate) 배지에서 최대 활성을 가지는 120시간째에 얻은 배양액을 ammonium sulfate 분획, Sepharose CL-6B column chromatography를 적용하여 약 56KDa의 phospholipase D효소를 얻었다. Phospholipase D의 최적온도는 60℃였으며 55-65℃에서 상대적으로 높은 활성을 유지하였다. 60℃에서 30분 동안 처리 시 효소의 열안정성은 100% 유지함을 보였다. 정제된 phospholipase D의 최적 pH는 8.0이였으며 pH 7.5-10으로 알칼리조건에서 안정한 것으로 나타났다. 2%(v/v)수준에서 계면활성제가 효소의 활성에 미치는 영향을 조사하였다. SDS, CHAPS, N-laurylsarcosine은 효소활성에 영향을 미치지 않았으며 Triton X-100의 첨가는 효소활성의 증가를 보였다. 그리고 2mM 수준에서의 금속 이온, Co^{2+}. Zn^{2+}. EDTA는 효소활성에 영향을 미치지 않았으며 Ca^{2+}의 존재 시 효소활성의 증가를 보여 금속 이온의 요구성이 있는 것으로 나타났다.

전이활성에 의한 생성물의 정량에 관한 실험이 추가 수행되어야 하며 효소활성의 수치의 정량화 및 전이활성의 개량이 이루어진다면 *Streptomyces* Cs 528균주가 생산한 phospholipase D는 산업화에 충분히 활용 가능하다고 생각된다.

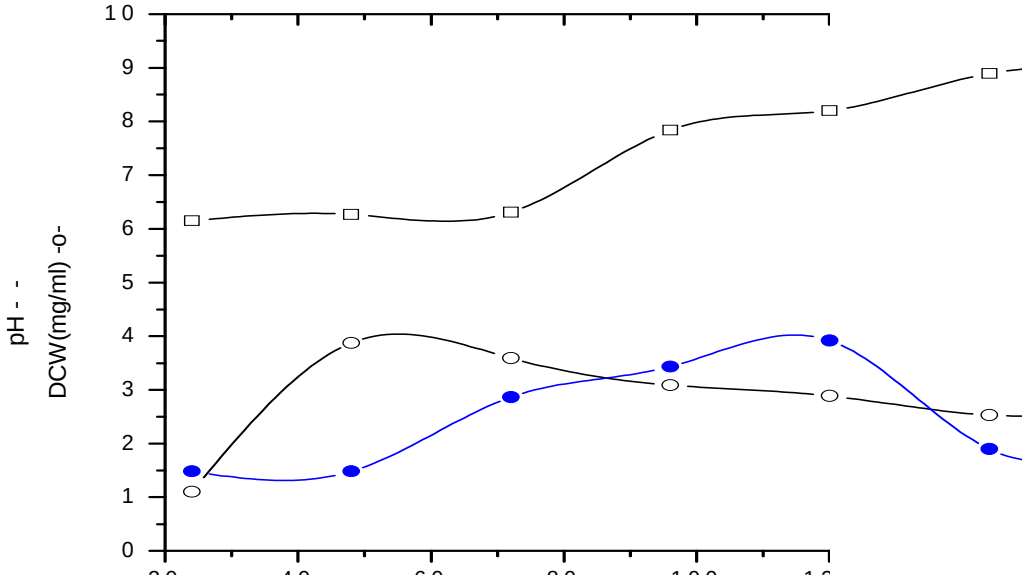

Fig. 3 Fermentation profiles for production of phospholipase D from *Streptomyces* Cs 528

Table 1. Similarity of nucleotide sequence of 16S rDNA of *Streptomyces* Cs 528 with related species

Strain	Accession No	Similarity	nt differences /compared
Streptomyces olivochromogenes DSM 40451T	AY094370	100.00	0/880
Streptomyces mirabilis DSM 40553T	AY999730	99.89	1/880
Streptomyces avermitilis NCIBM 12804T	AF145223	98.91	10/918
Streptomyces lipmanii JCM 4711	AB045861	98.58	13/916
Streptomyces cinnabarinus ISP 5467T	AJ399487	98.52	13/879
Streptomyces fimbriatus JCM 4910T	AB045868	98.47	14/916
Streptomyces lincolnensis NRRL 2936T	X79854	98.47	14/918
Streptomyces viridobrunneus LMG 20317T	AJ781372	98.46	14/910
Streptomyces cyaneus ISP 5107T	AJ399471	98.29	15/878
Streptomyces galbus DSM 40089T	X79852	98.26	16/918
Streptomyces longisporus ISP 5166T	AJ399475	97.61	21/880
Streptomyces lanatus ISP 5090T	AJ399469	97.27	24/880
Streptomyces griseochromogenes ISP 5499T	AJ399491	95.90	36/877

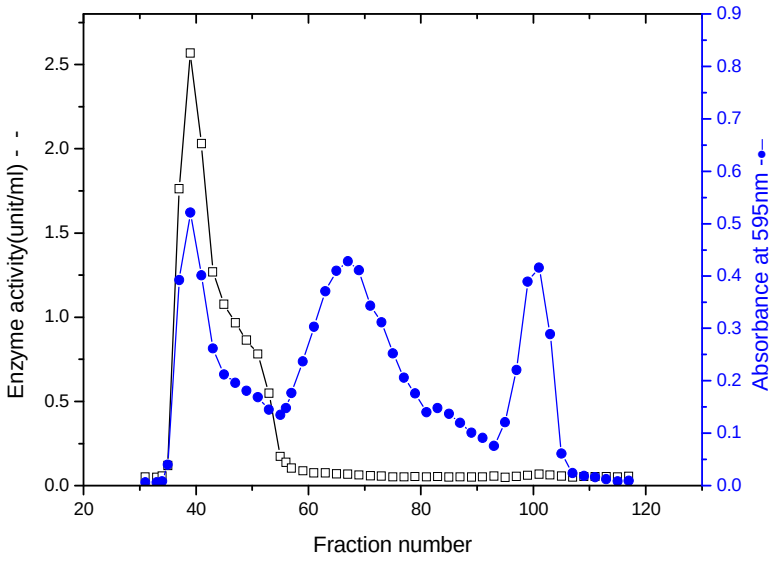

Fig. 4 Elution profile of phospholipase D on Sepharose CL-6B column chromatography

Table. 2. Purification of phospholipase D from *Streptomyces* Cs 528

Step	Total Protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Fold	Yield (%)
Crude supernatnat	82.42	111.05	1.27	1	100
Ammonium sulfate	46.25	87.15	1.88	1.48	78.48
Sepharose CL-6B	6.24	27.46	4.40	3.46	24.73

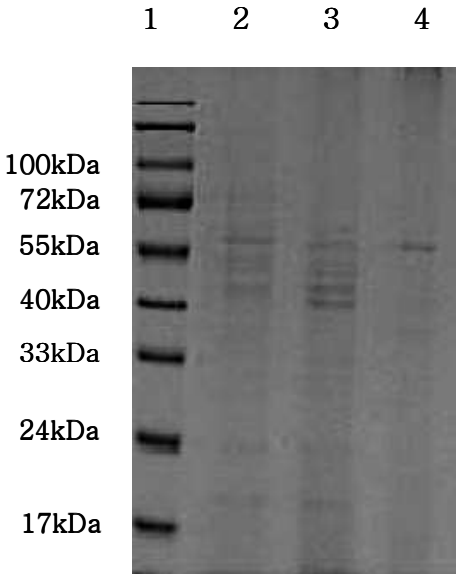

Fig. 5 Molecular weight determination of phospholipase D by SDS-PAGE

Lane 1 : Size marker (MBI Fermantase Co.)

Lane 2 : Crude extract of *Streptomyces* CS 528

Lane 3 : Supernatant of ammonium sulfate treatment

Lane 4 : Sepharose CL-6B

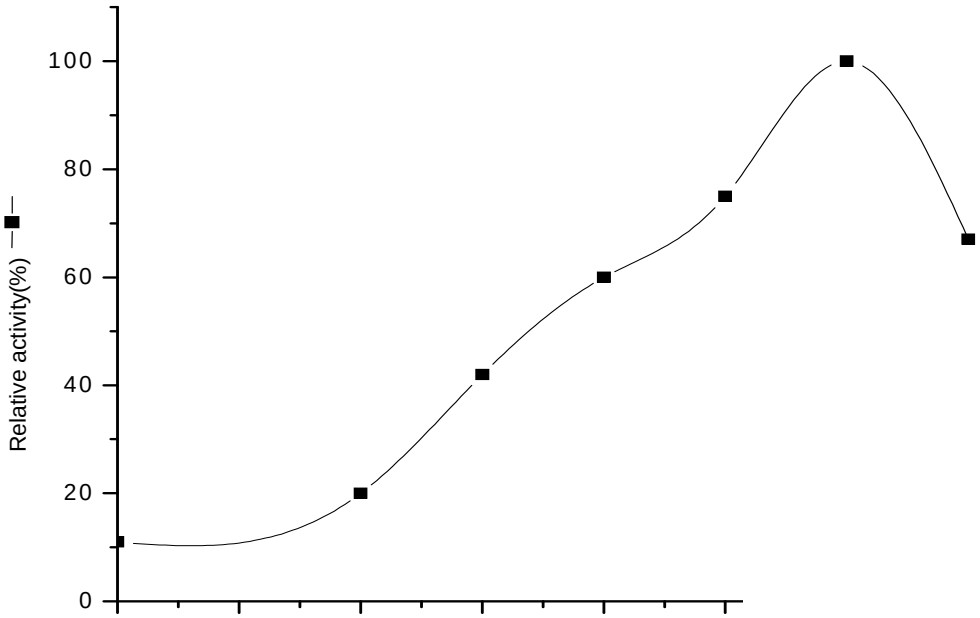

Fig. 6 Effect of temperature on hydrolytic activity of phospholipase D of *Streptomyces* Cs 528

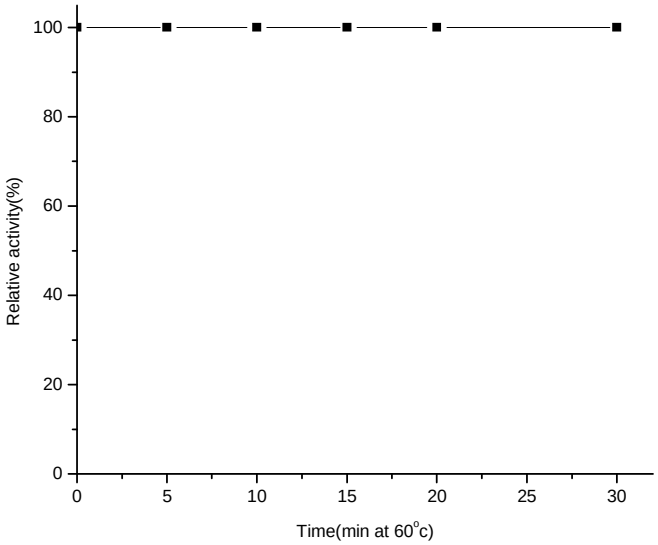

Fig. 7 Thermal stability of phospholipase D of *Streptomyces* Cs 528

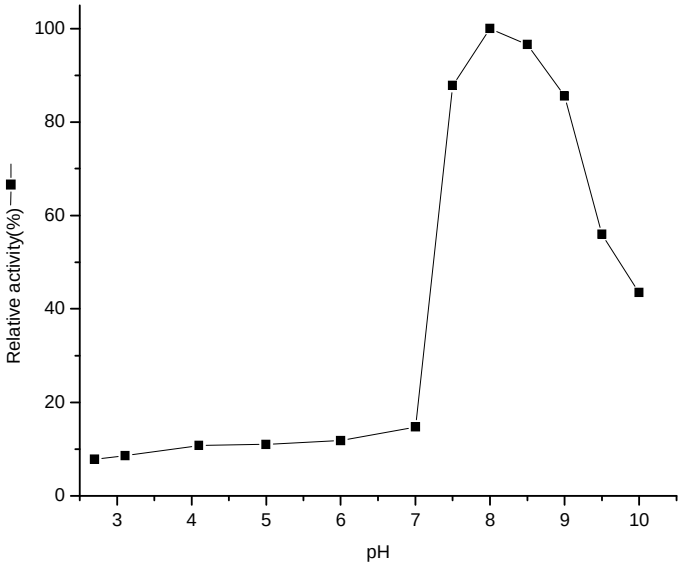

Fig. 8 Effect of pH on activity of phospholipase D of *Streptomyces* Cs 528

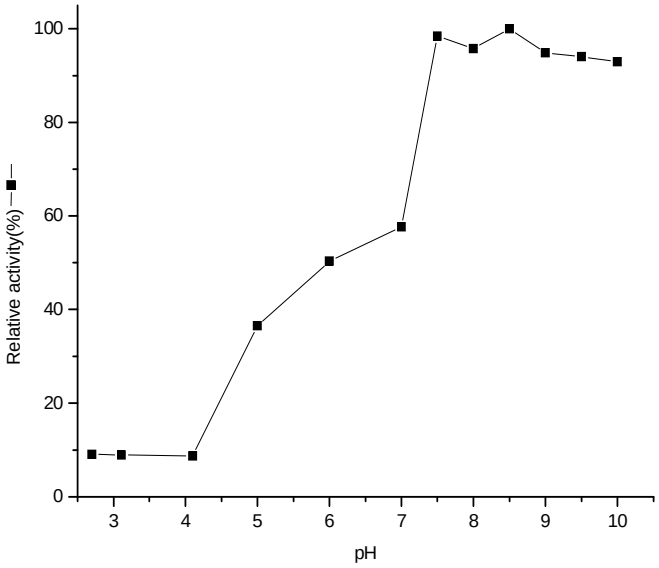

Fig. 9 pH stability of phospholipase D of *Streptomyces* Cs 528

Table 3. Effect of detergents on the hydrolytic activity of phospholipase D of *Streptomyces* Cs 528

Biological detergents	Ionic	Relative activity(%)
None		20.9
Triton X-100	Non-Ionic	100
Tween 20	Non-Ionic	37.4
Tween 80	Non-Ionic	68.5
Polyoxyethylene-4-laurylether	Non-Ionic	18.5
Deoxycholic acid	Anionic	27.7
N-laurylsarcosine	Anionic	12.5
CHAPS	Zwitter-Ionic	36.8
SDS	Anionic	14.1

Table 4. Effect of metal ions on the hydrolytic activity of phospholipase D of *Streptomyces* Cs 528

Metal ions	Relative activity(%)
None	100
Ca^{++}	119
Mg^{++}	61
Mn^{++}	24
Co^{++}	14
Zn^{++}	12
EDTA	13

V. 참 고 문 헌

1. Exton, J.H. (1990) J. Biol. chem. 265, 1-4.
2. Guillemain, I., and Rossignol, B. (1992) FEBS Lett. 314, 489-492.
3. Ha, K.-S., amd Thompson, G. A., Jr. (1992) Biochem. 31, 576-603.
4. Cook, S. J., and Wakelam, M. J. O. (1992) Biochem. J. 285, 247-253.
5. Mangoura, D., and Dawson, G. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S,A. 90, 2915-2919.
6. Nishizuka, Y. (1992) Science 258, 607-614.
7. Nishizuka, Y. (1984) Nature 308, 693-698.
8. Fu, T., Okano, Y., and Nozawa, Y. (1992) Biochem. J. 283, 347-354.
9. Berridge, M. J. (1987) Ann. Rev. Biochem. 56, 159-193.
10. Berridge, M. J., and Irvine, R. F. (1989) Nature 341, 197-205.
11. Bell, R. M., and Burns, D. J. (1991) J, Biol. chem. 266, 4661-4664.
12. Zidovetzki, R., and Lester, D. S. (1992) Biochem. Biophys. Acta. 1134, 261-272.
13. Farese, R. V., Standaert, M. L., Arnold, T., Yu, B., Ishizuka, T., Hoffman, J., Vila, M., and Cooper, D. R. (1992) Cell. Signalling 4, 133-143.
14. Hocevar, B. A., Burns, D. J., and Fields, A. P. (1993) J. Biol. chem. 268, 7545-7552.
15. Herget, T., Brooks, S. F., Broad, S., and Rozengurt, E. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 2945-2949.

16. Rhee SG, Choi KD. (1992) Regulation of inositol phospholipidspecific phospholipase C isozymes. J. Biol. chem. Jun 25;267(18): 12393-6.
17. Powis G, Seewald MJ, Gratas C, Melder D, Riebow J, Modest EJ. (1992) Selective inhibition of phosphatidylinositol phospholipase C by cytotoxic ether lipid analogues. Cancer Res. May 15;52(10):2835-40.
18. Potter, B. V. L. (1990) Recent advancesin the chemistry and biochemistry of inositol phosphates of biological interest. Nature, Prod. Rep. 1:1-24.
19. Lee HS, Oh WK, Kim BY, Ahn SC, Kang DO, Shin DI, Kim J, Mheen TI, Ahn JS. (1996) Inhibition of phospholipase C gamma 1 activity by amentoflavone isolated from Selaginella tamariscina. Plant Med. Aug;62(4):293-6.
20. Lee HS, Ko HR, Ryu SY, Oh WK, Kim BY, Ahn SC, Mheen TI, Ahn JS. (1997) Inhibition of phospholipaase C gamma 1 by the prenylated flavonoids from Sophora flavescens. Plant Med. Jun;63(3):266-8.
21. Aoki, M., Itezono, Y., Shirai, H., Nakayama, N., SaKai, A. and Tanaka, Y. (1991) Structure of a novel phospholipase C inhibitor, vanaxanthone(R009-1450), produced by penicillium vanaceum, Tetrahed. Lett. 32: 4737-4740.
22. Ogawara H, Higashi K, Manita S, Hidaka M, Kato H, Takenawa T. 1993. An inhibitor of inositol-phospholipid-specific phospholipase C. Biochim Biophys Acta. 1993 Feb 17;1175(3):289-92
23. Yanagisawa M, Sakai A, Adachi K, Sano T, Watanabe K, Tanaka

Y, Okuda T. (1994) Hispidospermidin, a novel phospholipase C inhibitor produced by Chaetosphaeroneama hispidulum(Cda) Moesz NR 7127. I. Screening, taxonomy, and fermentation. J Antibiot (Tokyo). Jan;47(1):1-5.

24. Larone, D. H. (1995) Medically important fungi: a guide to identification. Pp. 132-133. ASM press. Washington, D. C.
25. Eibl, H and Kovachev, S. (1981) Methods Enzymol. 72, 632-639.
26. Juneja, L. R., Hibi, N., Yamane, T. and Shimizu, S. (1987) Enzyme Microb. Technol. 9, 350-354.
27. Nishzuka, Y. (1992) Science 258, 607-614.
28. Tsuchido, T. 1994. Induction of cell autolysis of Bacillus subtilis with lysophosphatidylcholine. Appl, Microbiol. Biotechnol 16: 171-174
29. Dufour JP, Goffeau A. 1973Solubilization by lysolecithin and purification of the plasma membrane ATPase of the yeast Schizosaccharomyces pombe. J Biol Chem. 1978. Oct 10; 253(19): 7026-32
30. Shier WT. 1977. Inhibition of prostaglandin synthesis by lysolecithin.Biochem Biophys Res Commun. 1977 Oct 24;78(4) :1168-74
31. Dennis, E. A. 1983. in The enzymes (Boyer,P.D., ed) 3rd Ed., Vol.16, pp.307-353, Academic press, New York.
32. Fujita, S. and K. Suzuki. 1990. Surface activity of the lipid products hydrolyzed with lipase and phospholipase A2. JOCS.67:1008-1014
33. 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: 248-251

34. Goodfellow, M., Manfio, G. P. & Chun, J. (1997).Towards a practical species concept for cultivable bacteria. In The Units of Biodiversity - Species in Practice, pp. 25-59. Edited by M. F. Claridge, H. A. Dawah & M. R. Wilson. London: Chapman and Hall.
35. Stackebrandt, E. & Goebel, B. M. (1994).A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. Int J Syst Bacteriol 44, 846-849.
36. Kim, S.B., and Goodfellow, M. *Streptomyces avermitilis* sp. nov., nom. rev., a taxonomic home for the avermectin-producing *streptomycetes.* Int. J. Syst. Evol. Microbiol. (2002) 52:2011-2014.
37. Ruschmann, G. "*Streptomyces mirabilis* und das Miramycin (I)." Pharmazie (1952) 5:542-550. (German).
38. Peter H. A. Sneath, Nicholas S. Mair, M. Elisabeth Sharpe, John G. Holt. (1986). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. vol. 4. Willians and Wilkins.
39. Carrea, G., P. D'Arrigo, F.Secundo, and S. Servi. 1997. Purification and applications of a phospholipase D from a new strain of *Streptomyces. Biotechnol. Lett.* 19:1083-1085
40. Shimbo, K., Y. Iwasaki, T. Yamane, and K. Ina. 1993. Purification and properties of phospholipase D from *Streptomyces antibioticus. Biosci. Biotechnol. Biochem*. 57: 1946-1948
41. Shon, D. H., Y. Shim, and S. H. Yoon. 1994. Screening of phospholipase D producing *Actinomycetes. Kor. J Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22:333-339