

## *Streptomyces* sp. J-350P가 생산하는 세포의 Adenine Deaminase의 부분정제 및 성질

박정혜·전흥기\*

부산대학교 자연과학대학 미생물학과

### Purification and Characterization of Extracellular Adenosine Deaminase from *Streptomyces* sp. J-350P

Park, Jeong-Hae and Hong-Ki Jun\*

Department of Microbiology, College of Natural Sciences,  
Pusan National University, Pusan 607, Korea

After series of purification by means of ammonium sulfate fractionation, the 1st and 2nd DEAE-Cellulose, DEAE-Sephadex A-50, and Sephacryl S-200 superfine gel filtration, the activity of extracellular adenine deaminase from *Streptomyces* sp. J-350P increased 1764 fold and the yield was 0.3% of original activity. The enzyme was stable at the pH range 6.5 to 8.5 and at up to 50°C. The optimum pH and temperature of the enzyme were around 6.5 and 35°C. The molecular weight of the enzyme was estimated as 36,000 by calibrated Sephacryl S-200 superfine column chromatography.

생물계에 널리 분포되어 있는 purine은 핵산 및 조효소의 구성성분이며, 생명체의 복제과정에서는 유전정보의 전달물질로서 작용하는 등 생체내 대사계에서 중요하고 광범위한 역할을 수행한다. 특히 purine nucleotide의 *de novo* 합성과 salvage pathway에서 중요한 역할을 하는 adenine은 과량 존재할 때에는 미생물에 대한 생육저해(1~6)와 동물조직에 미치는 영향(7, 8) 및 분해산물의 생체내 축적 등으로 인한 독성효과(9) 등에 관하여 많은 연구가 이루어져 왔다.

저자는 전보(10)에서 세포의 adenine deaminase 생산균주로서 *Streptomyces* sp. J-350P를 보고한 바 있다. 본 연구에서는 *Streptomyces* sp. J-350P가 생산하는 세포의 adenine deaminase를 부분정제한 결과 등에 관해서 보고하고자 한다.

#### 재료 및 방법

Adenine과 hypoxanthine은 Sigma Chemical Co. 제품을 사용하였으며, DEAE-Cellulose, DEAE-Sephadex, Sephacryl S-200 Superfine 등은 Pharmacia 제품을 사용하였다.

#### 균주 및 배양

*Streptomyces* sp. J-350P(10)를 본 실험에 사용하였다(Photo 1).

균주의 보관 배지는 glucose 0.5%, meat extract 0.1%, peptone 0.1%, yeast extract 0.2%, agar 1.7%로 조성되고 pH 7.5로 맞춘 배지를 사용하였다.

본배양에는 dextrin 0.5%, peptone 0.5%,

**Key words:** Extracellular adenine deaminase, purification

\* Corresponding author



**Photo. 1.** (A) Electron micrograph of aerial mycelium of *Streptomyces* sp. J-350P. Oatmeal agar. Seven days. (B) Electron micrograph of spore chain of *Streptomyces* sp. J-350P. Oatmeal agar. Seven days.

yeast extract 1.0%, meat extract 0.5%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1%가 포함된 pH 7.0~7.5의 배지를 사용하였다. 500 ml용 진탕 flask에 위의 본배양용 배지 100 ml를 분주하고, 같은 배지 3 ml씩이 든 시험관 (12×200 mm)에서 40시간 진탕배양한 전배양액을 접종하여 30°C에서 40시간 진탕 (120 Rev.×6 cm Stroke) 배양하였다.

**조효소액의 조제**

상기의 방법과 같이 배양한 본배양액을 원심분리 (10,000g×20분)하여 상등액을 모아 조효소액으로 사용하였다.

**효소의 활성 측정**

효소의 활성은 5 μmole의 adenine, 적당량의 효소, 0.05M potassium phosphate buffer로 최종 volume을 1 ml로 맞춘 반응 system에서 측정하였다. 이 반응 혼합물을 37°C에서 30분간 반응시킨 후 중탕남비에서 3분간 가열하여 반응을 종료시켰다. 반응생산물인 hypoxanthine의 양은 265 nm에서의 흡광도로써 측정하였다.

1 unit의 활성은 1시간에 1 μM의 hypoxanthine을 생산하는 데 필요한 활성을 나타내며, 비활성 (specific activity)은 단백질 1mg에 대한 효소의 활성으로 나타내었다.

**결 과**

균체를 제거한 배양액 20리터를 모아 세포의

adenine deaminase의 정제를 위한 실험에 사용하였다.

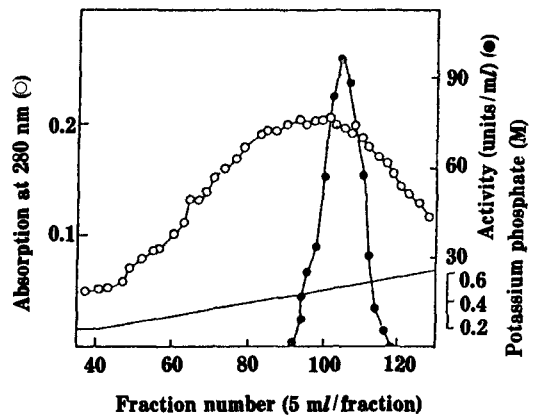
**효소의 정제**

균체를 제거한 배양액에 황산암모늄을 넣어 90%로 포화시킨 후 원심분리 (10,000g×20분)하여 상등액을 버리고 침전물을 0.05M potassium phosphate buffer (pH 7.5)에 녹여 50배량의 같은 완충액에 하룻밤 투석하였다. 투석한 효소액에 황산암모늄을 가하여 20~70% 사이로 재분획하였다. 앞에서와 같은 방법으로 침전물을 투석하였다.

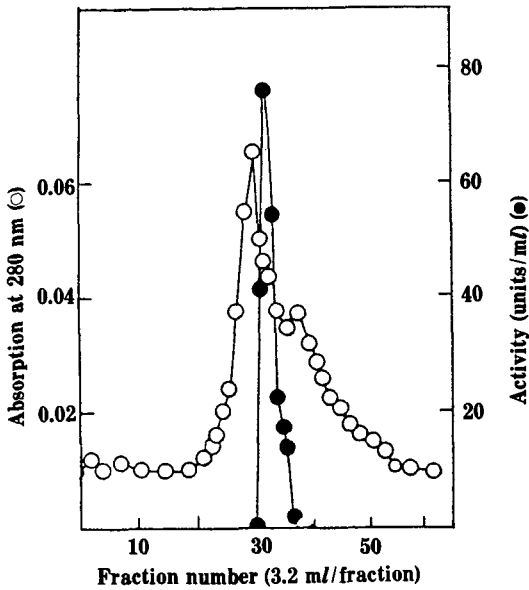
0.05M potassium phosphate buffer (pH 7.5)로 평형시킨 DEAE-Cellulose column (2.1×16 cm)에 앞에서 투석한 효소액을 흡착시켰다. 상기와 같은 완충액 200 ml로 column을 씻어준 후 0.1M potassium phosphate buffer (pH 7.5)로 비흡착 단백질을 용출시켰다.

다음으로 0.1M 완충액과 0.6M 완충액을 사용하여 점진적으로 완충액의 농도를 높여 주면서 흡착 단백질을 용출시켰다. 본 효소는 0.2M 이상에서 용출되었으며, 활성이 있는 fraction을 모아 황산암모늄을 넣어 80%로 포화시켰다. 원심분리하여 생긴 침전물을 0.05M potassium phosphate buffer (pH 7.5)에 녹인 후 같은 완충액에 하룻밤 투석하였다.

투석한 효소액을 제 2차 DEAE-Cellulose column (2×16 cm)에 흡착시켰다. Column을 0.05M의 상기 완충액 (pH 7.5) 200 ml로 씻은 후 0.1M의 완충액 400 ml로 비흡착 단백질을 용출시켰다. 다음에



**Fig. 1.** DEAE-Sephadex A-50 column chromatography of adenine deaminase for *Streptomyces* sp. J-350P. Details are given in the text.



**Fig. 2. Sephacryl S-200 superfine column chromatography of adenine deaminase from *Streptomyces* sp. J-350P**

Details are given in the text.

0.1 M과 0.6 M의 같은 완충액으로 점진적으로 완충액 농도를 높여주면서 흡착된 단백질을 용출시킨 결과 본 효소는 0.2 M 이후에 용출되었다. 활성이 있는 fraction을 모아 황산암모늄을 넣어 80%로 포화시킨 후 침전물을 0.1 M의 완충액에 녹인 다음 투석하였다.

투석한 효소액을 0.1 M의 상기 완충액으로 평형시킨 DEAE-Sephadex A-50 column(1.3×10 cm)에

흡착시켰다. Fig. 1에서와 같이 본 효소는 0.4 M 이후에 용출되었다. 효소활성이 있는 96~112번 사이의 fraction을 모아 황산암모늄 80%로 포화시켜 앞에서와 같은 방법으로 침전물을 모아 투석하였다.

마지막으로 효소를 0.05 M potassium phosphate buffer(pH 7.0)으로 평형시킨 Sephacryl S-200 superfine column(1.4×47 cm)에서 gel filtration하였으며 단백질의 용출 양식은 Fig. 2에 나타내었다.

Table 1에서와 같은 순서로 정제한 결과 *Streptomyces* sp. J-350P의 세포의 adenine deaminase는 0.3%의 수율로서 약 1764배 정제되었다.

**분자량의 측정**

Sephacryl S-200 superfine gel로 gel filtration하여 효소의 분자량을 측정하였다.

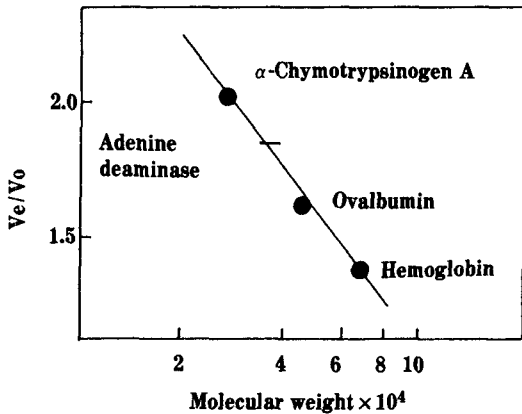
0.05 M potassium phosphate buffer(pH 7.0)로 평형시킨 Sephacryl S-200 superfine column(1.4×47 cm)에 표준단백질로서  $\alpha$ -chymotrypsinogen A (M. W. 25,700), ovalbumin (M. W. 43,000), hemoglobin (M. W. 68,000)을 사용하였다. Void volume( $V_0$ )에 대한 elution volume( $V_e$ )의 비( $V_e/V_0$ )를 단백질 분자량의 대수값에 대하여 plot하였다. Void volume은 blue dextran의 elution volume 으로서 결정하였다. 실험 결과 본 효소의 분자량은 약 36,000으로 측정되었다(Fig. 3).

**효소의 안정성**

앞에서와 같은 과정에 의해 부분 정제된 세포의 adenine deaminase를 사용하여 효소의 안정성을 검

**Table 1. The purification scheme of extracellular adenine deaminase from *Streptomyces* sp. J-350P**

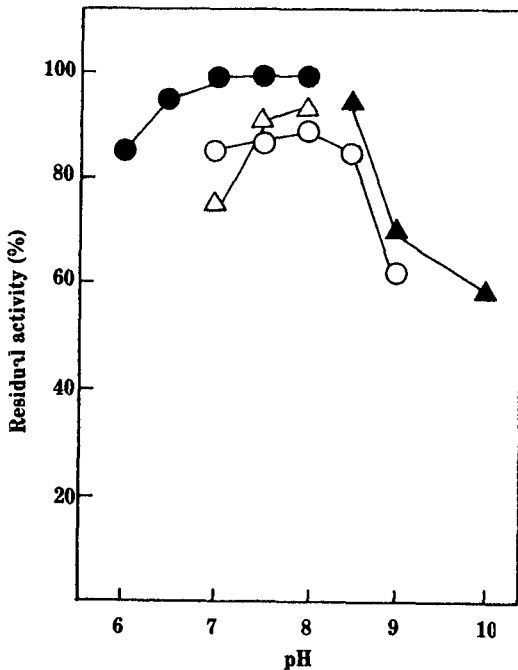
Step	Total activity (units)	Total protein (mg)	Specific activity (units/ml)	Relative purification	Yield (%)
Broth	42857.1	54947.4	1.28	1	100
Ammonium sulfate saturation (0-90%)	39821.4	2863.2	13.9	10.9	92.9
2nd Ammonium sulfate (20-70%)	34639.3	1188.3	29.1	22.7	80.8
1st DEAE- Cellulose	19338.3	181.6	106.5	83.2	45.1
2nd DEAE-Cellulose	6754.2	40.1	168.4	131.6	15.8
DEAE-Sephadex A-50	2387.5	2.74	871.4	680.8	5.6
Sephacryl S-200	128.7	0.057	2257.9	1764.0	0.3



**Fig. 3.** Determination of molecular weight of adenine deaminase by Sephacry S-200 superfine gel filtration. Details are given in the text.

트하였다.

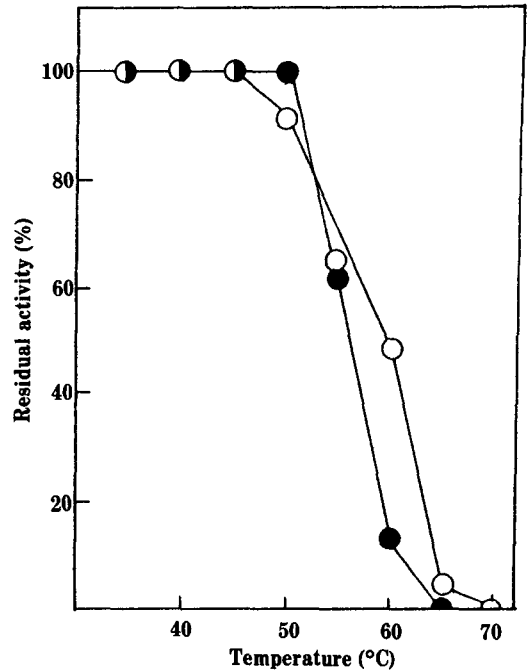
효소의 pH 안정성을 검토하기 위하여 0.05 M의 각종 완충액에 효소를 넣어 4°C에서 30시간 유지시킨 후 잔존활성을 측정하였다. Fig. 4에 나타낸 바와



**Fig. 4.** Effect of pH on stability of adenine deaminase from *Streptomyces* sp. J-350P

After the enzyme solutions in 0.05M of various buffer were treated at 4°C for 30 hr, the residual activity was assayed by standard assay method.

●, sodium phosphate buffer; ○, Tris-HCl buffer; ▲, glycine-NaOH buffer; △, potassium phosphate buffer.



**Fig. 5.** Effect of temperature on stability of adenine deaminase from *Streptomyces* sp. J-350P

After the enzyme solutions in 0.05M potassium phosphate buffer (○) and sodium phosphate buffer (●), pH 7.0, were incubated for 10 minutes, the residual activity was measured by standard assay method.

같이 본 효소는 pH 6.5와 pH 8.5사이에서 대체로 안정하였으며 sodium phosphate buffer에서 특히 안정한 것으로 나타났다.

다음으로 0.05 M의 potassium phosphate buffer (pH 7.0)와 sodium phosphate buffer (pH 7.0)에 효소를 넣어 35°C에서 70°C까지의 각 온도에서 10분간 유지시킨 후 효소의 잔존 활성을 측정하였다.

실험 결과 본 효소는 50°C부근까지는 대체로 안정하였으나 55°C 이상에서는 급격하게 실활되었다 (Fig. 5).

**효소 활성의 최적 pH 및 최적 온도**

효소의 활성에 미치는 pH의 영향은 Fig. 6의 A에 나타낸 결과와 같다. 효소반응계의 potassium phosphate 완충액 대신 pH 4.5에서 pH 10사이의 각 pH의 완충액을 사용하여 효소 반응을 진행시켜 활성을 측정하였다. 실험 결과 본 효소는 0.05 M sodium phosphate buffer에서는 pH 6.5부근에서, 0.05 M potassium phosphate buffer와 Tris-HCl

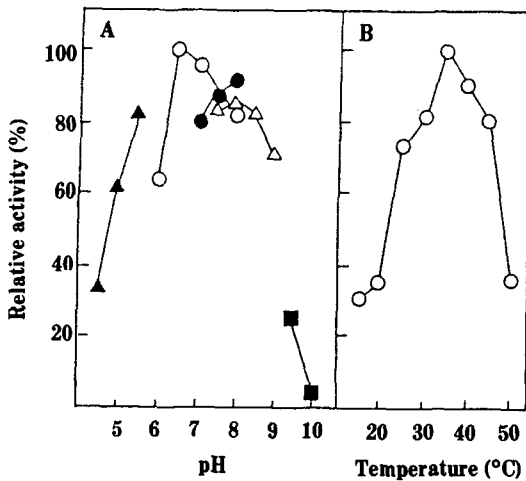


Fig. 6. Effect of pH (A) and temperature (B) on activity of adenine deaminase from *Streptomyces* sp. J-350P

The activity was assayed by standard assay method except that pH and temperature were varied.

(A) ○, sodium phosphate buffer; ▲, sodium acetate buffer; ●, potassium phosphate buffer; △, Tris-HCl buffer; ■, sodium carbonate buffer.

buffer에서는 pH 8.0 부근에서 가장 효소활성이 크게 나타났다.

효소활성의 최적 온도를 검토한 결과는 Fig. 6의 B에 나타내었다. 15°C에서 50°C 사이의 각 온도에서 효소의 반응을 진행시킨 결과 35°C 부근까지는 온도 상승에 따라 효소의 활성도 증가하였으나 그 이상의 온도에서는 감소하여 40°C 이상에서는 효소활성이 급격히 실패되었다.

## 고 찰

지금까지 연구된 adenine deaminase의 경우 *Azotobacter vinelandii*의 효소(11)는 34배, *Saccharomyces cerevisiae*의 효소(12)는 40배로 정제되었으며, *S. cerevisiae*의 효소는 비활성이 80 units/mg으로 보고되어 있어 그 정제율이 아주 낮은 반면, 본 실험에서 *Streptomyces* sp. J-350P의 세포외 효소는 2257.9 units/mg의 비활성으로 부분정제되어 단일 정제된 *P. synxantha* A3의 효소(13)를 제외한 다른 세포내 효소(12, 14)에 비한다면 비교적 높은 정제도로써 정제되었다. 지금까지 보고된 adenine deaminase중 효모에서 분리된 효소의 분자량은 측정되어 있지 않으며(12, 15), 세균에서는 *P. synxantha* A3(13)에서 효소의 분자량이 보고되어

있을 뿐이다. 본 효소의 분자량은 36,000 부근으로서 *P. synxantha* A3의 세포내 효소의 분자량인 37,000과 비슷한 값을 나타내었으나, 원생동물 기원의 세포내 효소에 비한다면 2배 이상 큰 것으로 평가되었다(16).

효소의 pH 안정성의 경우, *Torulopsis utilis*(15)는 pH 7.0 부근에서, *S. cerevisiae*(12)는 pH 6.5 부근에서 안정한 것으로 보고되어 있으나, 본 효소에서는 pH 6.5에서 8.5사이에서 대체로 안정하였다.

*P. synxantha* A3의 효소(13)는 Tris-HCl buffer를 사용하였을 때 효소의 안정성과 활성에 효과적인 반면 본 효소는 sodium phosphate 완충액이 더욱 효과적이었다. phosphate에 의한 효소의 안정화는 무기인산이 단백질에 결합하여 효소의 실패 또는 unfolding을 방지하거나 구조적으로 안정화 시키기 때문이라고 설명되고 있다(17).

이상에서 살펴 본 바에 의하면 본 효소의 분자량은 *P. synxantha* A3의 세포내 효소(13)와 크게 다르지 않았으나 원생동물 기원의 세포내 효소(16)와는 크게 차이를 나타내었으며, 효소의 안정성에 있어서도 다른 미생물 기원의 세포내 효소(12~15)와 약간의 차이를 나타내었다.

## 요 약

황산암모늄 분획, 2차례의 DEAE-Cellulose, DEAE-Sephadex A-50 및 Sephacryl S-200 superfine gel filtration으로 정제한 결과 *Streptomyces* sp. J-350P의 세포외 adenine deaminase는 0.3%의 수율로서 1764배로 정제되었다.

*Streptomyces* sp. J-350P의 세포외 adenine deaminase는 pH 6.5~8.5 사이에서 안정하였고, pH 7.0에서 10분간 열처리하였을 때 50°C까지는 안정하였다. 효소 활성 최적 pH와 온도는 pH 6.5와 35°C였다. Sephacryl S-200 superfine gel filtration에 의한 분자량의 측정 결과 본 효소의 분자량은 약 36,000이었다.

## 사 사

본 연구는 '86년도 농원문화재단 연구비로 수행되었음.

## 참고문헌

1. Mosteller, R.D. and R.V. Goldstein: *J. Bacteriol.* **123**, 750 (1975).
2. Dalal, F.R., R.E. Gots, and J.S. Gots: *J. Bacteriol.* **91**, 507 (1966).
3. De Repentigny, J., L.G. Mathieu, S. Turgeon, and S. Sonea: *Canadian J. Microbiol.*, **14**, 39 (1968).
4. Hosono, R. and S. Kuno: *J. Biochem.*, **75**, 215 (1974).
5. Newell, P.C. and R.G. Tucker: *Nature*, **215**, 1384 (1967).
6. Newell, P.C. and R.G. Tucker: *Biochem. J.*, **106**, 279 (1963).
7. Moyed, H.S.: *J. Bacteriol.*, **88**, 1024 (1964).
8. Nguyen, B.T., Y.M.E. Sayed, and W. Sadee: *Cancer Research*, **44**, 2272 (1984).
9. Edozien, J.C., U.U. Udo, V.R. Young, N.S. Scrimshaw: *Nature*, **228**, 180 (1979).
10. Jun, H.K. and J.H. Park: *J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **12**, 31 (1984).
11. Hartenstein, R.C. and I. Fridovich: *J. Biol. Chem.*, **242**, 740 (1967).
12. Medahat, P.: Illinois Institute of Tech. Diss. Abster., B27(6), 1785 (1966).
13. Sakai, T. and H.K. Jun: *J. Ferment. Technol.*, **56**, 257 (1978).
14. Heppel, L.A., J. Hurwits and B.L. Horecker: *J. Amer. Chem. Soc.*, **79**, 630 (1957).
15. Roush, A.H.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **50**, 510 (1954).
16. Kidder, G.W., V.C. Dewey, and L.L. Nolan: *Arch. Biochem. Biophys.*, **183**, 7 (1977).
17. Rippa, M., M. Signorini and T. Bellini: *Biochem. J.* **197**, 747 (1981).

(Received July 28, 1987)