

초호열성균이 생성하는 phospholipase A₂에 관한 연구

조용계 · 우효경 · 김연심

동아대학교 식품영양학과
(1999년 5월 18일 접수 ; 1999년 9월 6일 채택)

Phospholipase A₂ excreted from the cells of hyperthermophilic microbes

Yong-Goe Joh, Hyo-Kyeng Woo, Yeon-Sim Kim,

Dept. of Food Science & Nutrition, Dong-A University, Pusan 604-714, Korea
(Received May 18, 1999 ; Accepted September 6, 1999)

1. 서론

인지질은 세포막, 원형질막 그리고 핵막과 같은 생체막을 구성하는 주요한 지질로 글리세로-인지질 (glycero-phospholipids)과 스펜고-인지질 (sphingo-phospholipids)으로 대별되는데, 대표적인 글리세로-인지질로서는 포스파티딜 콜린 (phosphatidylcholine), 포스파티딜 에탄올아민 (phosphatidylethanolamine), 포스파티딜 세린 (phosphatidylserine), 포스파티딜 이노시톨 (phosphatidylinositol)과 포스파티딜 글리세롤 (phosphatidylglycerol) 등을 들 수 있고, 스펜고-인지질로서 스펜고마이엘린 (sphingomyelin)이 대표적인 것이다.¹⁾ 일반적으로 포스포리파제는 인지질을 가수분해하는 효소를 총칭하나, 여기서 언급하는 포스포리파제는 글리세로-인지질을 가수분해하는 글리세로-포스포리파제 (glycero-phospholipase) (이하 포스포리파제)를 지칭하는 것으로, 그 작용부위에 따라 A₁, A₂, C 및 D로 분류된다.²⁾ 포스포리파제 A₁은 각종 생물에 널리 분포하는 막결합형 (membrane-bound) 효소이나, 포스포리파제 A₂는 막결합형 또는 분비형으로 뱀독(蛇毒), 벌의 독, 또는 포유동물의 췌장액에 존재하고 있음이 알려져 있다. 각종 포스포리파제에 의한 인지질의 가수분해 위치는 Fig. 1에 나타낸 바와 같으며, 여기서 R₁, R₂는 지방산 잔기의 알킬기를 의미하며, X는 콜린(choline), 에탄올아민(ethanolamine), 세린(serine), 이노시톨(inositol) 등의 잔기(residue)를 의미 한다.³⁾ 포스포리파제 A₂는 고 콜레스테롤증 치료제로서⁴⁾, 또 포스포리파제 A₁과 A₂는 계면활성제의 일종인 리조 (lyso)형 인지질 제조에 이용되어 왔다.⁷⁾ 이와 같이 포스포리파제는 다방면에 걸쳐 사용되고 있으며, 최근에는 포스포리파제를 유지의 정제과정의 필수적인 단계인 탈검

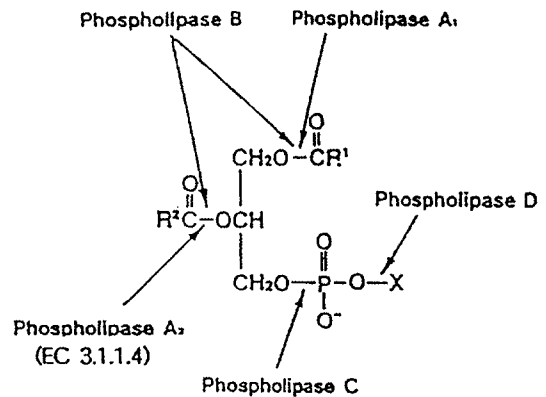


Fig. 1. Sites of action of phospholipases on phospholipid.

(degumming)공정에 도입하여 유지중의 인지질을 리조형-인지질로 변화시켜 물에 쉽게 녹게하므로써, 종래의 화학적 정제법으로 인지질을 제거하는 것에 비교하여 물의 소비량과 수증기의 소비를 줄일 수 있어 유지의 정제비용을 절반 정도로 낮출 수 있다고 한다.³⁻⁵⁾

현재 포스포리파제는 모두 고등동물에서 얻고 있어 그 생산량에 한계가 있고, 또 열안정성에도 문제가 있다. 특히 정유공정 중 탈검시에는 고온의 조건이 절대적으로 필요하므로 여기에 필요한 효소는 내열성이여야하나, 현재까지 이런 조건을 충족시킬 수 있는 포스포리파제는 보고된 바 없다.

초호열성균은 60℃ 이하에서는 거의 증식하지 않으나 120℃의 고온에서도 잘 자라는 세균을 지칭하는 것이다. 현재 많이 연구가 되고 있는 초호열성균은 대개 산소 대신에 유황을 이용하는 호열고세균(好熱古細菌)으로, *proccoccus*속, *pyro-dictium*속, 그리고 *thermoproteus*속 등이 있고⁸⁻¹²⁾, 이 중

*pyrococcus*속의 연구가 최근 활발히 진행되고 있다. 이 연구결과에 의하면 *pyrococcus*는 편성협기성 균으로, 원소유황을 요구하며 수소를 발생하면서 생육한다고 한다. *Pyrococcus*속인 *Pyrococcus horikoshii*는 생육온도의 범위가 75~104°C이고, genome size가 2,000 kb, GC함량이 41%이고, *Pyrococcus furiosus*는 생육온도가 75~105°C이고, genome size가 1,800 kb, GC함량이 38%이라고 알려져 있다. 반면에 *Sulfolobus acidocaldarius*는 강산성 하에 60°C~90°C의 범위에서 자라는 호기성 호열고세균으로 알려져 있다.

내열성 포스포리파제 A₂를 생산하는 미생물의 검색의 일환으로, 고온에서 인지질의 가수분해도를 정량적으로 측정할 수 있는 형광물질인 (N-7-nitro-benz-2-oxa-1, 3-diazol)aminohexanoyl을 표시시킨 인지질인 1-hexadecanoyl-2-[(N-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol)aminohexanoyl]-sn-glycero-3-phospho-choline을 기질로 사용하여²⁾, 초호열성균인 *Pyrococcus horikoshii*와 *Sulfolobus acidocaldarius*에 phospholipase A₂의 존재를 확인하고자 본 연구를 시작하였다.

2. 실험방법

a) 재료 및 시약

재료: 초호열성균인 *Pyrococcus horikoshii* (JCM 9974)와 *Sulfolobus acidocaldarius* (JCM 8929)의 균주는 일본이학연구소(日本理化學研究所) (리젠-理研-, The Institute of Physical and Chemical Research, 일본 사이타마현 (日本 埼玉縣) 와코(和光市) 소재)에서 1998년 1월 29일에 분양받아 사용하였다.

시약: 형광기질인 1-hexadecanoyl-2-((N-7-nitrobenz-2-oxa-1, 3-diazol) aminohexanoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine는 Sigma사에서 구입하였고, UV-흡수기를 가진 기질인 1-decanoyl-2-(p-nitrophenylglutaryl) phosphatidylcholine은 다음과 같이 합성하여 사용하였다. 즉 Wako Chemical제의 L- α -lysophosphatidylcholine - γ - decanoyl (LPC)의 72 mg, glutaric anhydride 320 mg, 트리에틸아민 0.43 mL과 소량의 디클로로메탄을 마개달린 시험관에 옮기고, 이것을 40°C의 block heater에서 하룻밤 반응시켰다. 반응생성물을 silicic column (내경: 1.6 cm, silicic acid: 25 g)에 흡착시켜 디클로로메탄으로 불순물을 완전히 제거하고, 클로로포름/메탄올/물/아세트산 (65 : 30 : 12 : 3, 부피비)의

전개용매 (150 mL)로 순수한 1-decanoyl-2-(p-nitrophenylglutaryl) phosphatidylcholine를 순수정제하여 사용하였다. 에스테르형 기질로서는 Sigma사의 L- α -phosphatidylcholine-dipalmitoleoyl, L- α -phosphatidylcholine- β -palmitoyl- γ -oleoyl, L- α -phosphatidylcholine-dihexadecanoyl, L- α -phosphatidylcholine-distearoyl, L- α -phosphatidylcholine- β -oleoyl- γ -myristoyl, L- α -phosphatidylcholine- β -oleoyl- γ -palmitoyl, L- α -phosphatidylcholine- β -linoleoyl- γ -palmitoyl, L- α -phosphatidylcholine- β -arachidonoyl- γ -palmitoyl과 L- γ -phosphatidyl ethanolamine- β -oleoyl- γ -palmitoyl의 인지질을 사용하였고, 에테르형 기질로서는 DL- α -phosphatidylcholine- β -palmitoyl- γ -O-hexadecyl, DL- α -phosphatidylcholine- β -oleoyl- γ -O-hexadecyl, DL-phosphatidylcholine-dihexadecyl의 인지질 (Biomol사, Plymouth Meeting, PA, USA)을 사용하였다. 미생물용 배지는 Difco사의 제품을, 일반 무기시약은 시판용 특급시약으로 하였다. 그리고 HPLC용 용매는 Merck사의 것을 사용하였다.

b) 실험

1) *Pyrococcus horikoshii*의 균체배양¹⁰⁾: 식염 13.5 g, Na₂SO₄ 4 g, KCl 0.7 g, NaHCO₃ 0.2 g, KBr 0.1 g, H₃BO₃ 30 mg, MgCl₂·6H₂O 10 g, CaCl₂ 1.5 g과 SrCl₂ 25 mg을 증류수 1 L에 녹이고 여기에 resazurin 수용액 (0.2 g/L, Sigma사) 1.0 mL, yeast extract (Difco사) 1.0 g와 bactopectone (Difco사) 5 g을 가하여 완전히 녹여 pH 6.8로 조정 한 후, 120°C에서 15분간 가압멸균하였다. 다음에 100°C에서 3회에 걸쳐 건열 멸균한 유황분말을 0.2 %되게 가하고 고순도의 질소가스로 배지를 혐기성 상태로 만들고, resazurin색깔이 핑크색에서 무색이 될 때까지 Na₂S·9H₂O 수용액 (0.2 g/L)을 한방울 씩 가하면서 잔존하는 미량의 산소를 완전히 제거 하였다. 여기에 균주를 접종하여 95°C에서 5일간 배양한 후, 배양액을 3,000 rpm의 원심분리기에서 집균하였다 (Table 1-a).

2) *Sulfolobus acidocaldarius*의 균체배양¹⁵⁾: 배지 조성은 증류수 5 L에 CaCl₂ (0.4 g), MgSO₄ (1.25 g), KH₂PO₄ (1.4 g)와 (NH₄)₂SO₄, 6.5 g을 녹이고 여기에 yeast extract (5 g)와 sucrose (10 g)을 가하여 완전히 녹여 pH 2.5로 조절한 후, 120°C에서 15분간 가압멸균하였다. 균주를 접종하여 75°C에서 3일간 호기적으로 배양하고 배양액을 3,000 rpm의 원심분리기에서 집균하였다 (Table 1-b).

3) 리파제 및 포스포리파제 A의 검색 : 트리글리세리드인 트리올레인과 인지질인 레시틴

Table 1-a. Ingredients of the Medium for Culturing *P. horikoshii*

NaCl	13.5 g	MgCl ₂ · 6H ₂ O	10 g
CaCl ₂	1.5 g	KCl	0.7 g
NaHCO ₃	0.2 g	H ₂ BO ₃	30 mg
SrCl ₂	25 mg	Yeast extract	1.0 g
Bactopeptone(Difco)	5 g		
Resazurin aq. solution(0.2 g/L, Sigma)	1.0 mL	Water	1L

The medium was adjusted to pH 6.8 and sterilized at 120°C for 15 min, followed with addition of 0.2% of sulphur powder (dry-sterilized 3 times at 100°C) under a stream of N₂. Na₂S₂O₈ · 9H₂O aq. solution (0.2 g/L) was added to the medium until the medium color disappeared. The medium was cultured at 95 °C for 5 days.

Table 1-b. Ingredients of the Medium for Culturing *S. acidocaldarius*

CaCl ₂	0.4 g	MgSO ₄	1.25 g
KH ₂ PO ₄	1.4 g	(NH ₄) ₂ SO ₄	6.5 g
Yeast extract	5.0 g	Sucrose	10 g
Water	5 L.		

The medium was adjusted to pH 2.5 and sterilized at 120°C for 15 min. The medium was aerobically cultured at 75°C for 3 days.

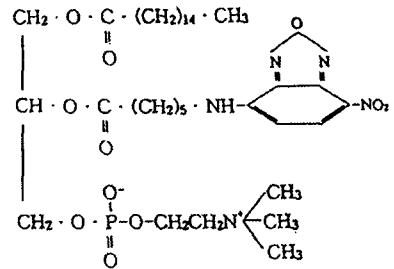
(lecithin)을 기질로 사용하여 상기 2 균주에서 리파제와 포스포리파제 A의 분비여부를 조사하였다. 우선 트리올레인과 레시틴을 각각 약 3~4 mg를 마개달린 시험관에 옮기고, 100 mM Na-choleate 용액 1mL와 20 mM CaCl₂ 용액 1 mL를 가하여 잘 혼합하였다. 다시 *P. horikoshii*와 *S. acidocaldarius*의 균체를 10배로 희석 현탁한 용액 2~10 mL를 가하여 75°C에서 12시간 반응시켰다. 반응생성물을 클로로포름으로 회수하여 TLC에 점적하여 클로로포름 : 메탄올 : 물 (65 : 25 : 4, 부피비)의 혼합용매로 전개하여 레시틴의 가수분해를 조사하였다. 또 트리올레인의 가수분해물을 점적한 TLC판을 전개용매인 클로로포름 : 아세톤 : 메탄올 (94 : 5.5 : 0.5, 부피비)으로 전개하여 중성지질의 가수분해 여부를 확인하였다.

다음으로 지방산의 조성 및 결합위치가 확실한 인지질을 사용하여 2 균주의 포스포리파제 A의 생산 여부를 조사하였다. 즉, L- α -phosphatidylcholine- β -oleoyl- γ -palmitoyl, L- α -phosphatidylcholine- β -oleoyl- γ -stearoyl, L- α -phosphatidylcholine- β -palmitoyl- γ -oleoyl과 L- α -phosphatidylcholine- β -linoleoyl- γ -stearoyl를 각각 2 mg씩 취하여 2 mL용 Eppendorf vial에 옮기고 여기에 100 mM Na-choleate 40 μ L, 20 mM CaCl₂ 100 μ L를 가하여 잘 혼합하였다. 다시 *P. horikoshii*와 *S. acidocaldarius*의

균체를 10배로 희석 현탁한 용액 0.5 mL를 가하여 75°C에서 12시간 반응시켰다. 반응생성물에서 이소옥탄으로 회수한 유리지방산을 메칠에스테르화하여 그 조성을 GC로 분석하였다.

4) 형광물질과 UV-흡수물질이 표지된 기질에 의한 포스포리파제 A₂의 확인실험²⁾ ; 반응시 가열에 의한 acyl기의 전위를 최소화하기 위하여, 기질로서 형광물질인 NBD (NBD ; N-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol)을 표지시킨 L- α -phosphatidylcholine- β -[NBD-aminohexanoyl]- γ -hexadecanoyl (Fig. 2)과 UV 흡광도를 가진 p-nitrophenyl을 표지시킨 1-decanoyl-2-(p-nitrophenylglutaryl) phosphatidylcholine을 기질로 사용하였다. L- α -phosphatidylcholine- β -[NBD-aminohexanoyl]- γ -hexadecanoyl의 기질과 1-decanoyl-2-(p-nitrophenylglutaryl) phosphatidylcholine의 기질을 사용하였다.

NBD-PC ; 1-hexadecanoyl-2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)aminohexanoyl]-sn-glycero-3-phosphocholine



NBD-acid ; N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)aminohexanoic acid



Fig. 2. Structure of fluorescent substance-labelled substrate.

5) HPLC에 의한 형광표지 생성물의 분석¹⁸⁾ ; HPLC의 장치는 Hewlett-Packard model 1050이였으며, 칼럼은 ChromSpher™C₁₈ (100×4.6 mm, 3 μ

m, ChromPack, Boerhaaveplein, the Netherland)를 사용하였다. 검출기는 Hewlett-Packard model 1046A의 programmable 형광검출기로, 여기파장과 검출파장을 각각 450 nm과 510 nm에 조정하였다. 전개용매로는 클로로포름/메탄올/물/아세트산 (500 : 250 : 45 : 45, 부피비) 혼합액을 사용하였으며, 이때 유속은 1.0 mL/min이었으며, 1회에 시료의 주입량은 1~5 μ L이었다.

6) Ca^{2+} 에 의한 활성화 실험¹⁷⁾: 기질인 20 μ g의 L- α -Phosphatidylcholine- β -[NBD-aminohexanoyl]- γ -hexadecanoyl, 100 mM의 Na-cholate 40 μ L과 20 mM의 $CaCl_2$ 40 μ L을 각각 2 mL용 Eppendorff vial에 옮기고, 여기에 100배 희석한 균체현탁액 0.5 mL과 20 mM의 $CaCl_2$ 를 일정한 양 (0, 10, 20, 30 및 40 μ L)가하여 Ca^{2+} 에 의하여 이 효소의 활성화 여부를 조사하였다.

7) 지방산 분석¹⁸⁾: 지방산 분석은 BF_3 -메탄올 방법에 따라 실시하였다. 즉 각 반응 혼합액에서 유리지방산 분획을 이소옥탄으로 회수하여, TLC로 유리지방산을 순수히 분리하였다. TLC의 유리지방산 분획을 면도날로 긁어 모아 25 mL용 3각 플라스크에 옮긴 다음 헥산-디에틸에테르 (50 : 50, 부피비)으로 지방산을 추출하여 10 mL 마개 달린 시험관에 옮기고, 여기에 0.05% BHT-헥산 (100 μ L)를 가한 후 질소기류하에서 농축하였다. 이 건조물에 14% BF_3 -메탄올 3 mL를 가하여 70°C에서 5분간 반응시켰다. 여기에 헥산 (3 mL)과 증류수 (3 mL)를 가하여 vortex mixer로 잘 섞은 뒤 지방산 메틸에스테르를 헥산층으로 이행시키고, 물층에 다시 헥산 (3 mL)을 가하여 잔존하는 지방산 메틸에스테르를 완전히 헥산층으로 회수하였다. 모든 헥산층에서 지방산 메틸에스테르를 회수하고 이것을 FlorisilTM 칼럼에 흡착시켜 헥산 : 아세톤 (99 : 1, 부피비)으로 지방산 메틸에스테르를 순수히 분리하였다. 분석기는 Hewlett Packard 5890 II capillary gas chromatograph이었으며, 이 때 사용한 칼럼은 Carbowax 20M가 도말된 fused silica 컬럼 (25 m \times 0.02 mm, i.d., thickness 25 μ m, Hewlett-Packard, Orlando, FL, USA)이었다. 칼럼 온도를 175°C에 3분간 유지한 후 205°C까지 4°C/min로 승온시켰고, 205°C에서 30분간 더 유지하도록 설정하였다. 주입구 (injection port)와 검출기 (detector)의 온도는 230°C였으며, 사용하는 검출기는 flame ionization detector (FID)이었고 이동상인 운반가스 (carrier gas)로는 H_2 를 사용하였다.

8) 최적온도 조사¹⁷⁾: 기질로서 20 μ g의 L- α -phosphatidylcholine- β -[NBD-aminohexanoyl]- γ -hexadecanoyl, 100 mM의 Na-cholate 40 μ L과 20 mM의 $CaCl_2$ 40 μ L을 혼합하고, 여기에 *Pyrococcus horikoshii* 또는 *Sulfolobus acidocaldarius*의 균체 회석액 (1 mg/mL) 400 μ L를 첨가하였다. 이 혼합액을 일정한 배양온도 (*S. acidocaldarius*의 경우에는 75°C, *Pyrococcus horikoshii*의 경우에는 75°C, 85°C, 95°C 및 100°C)에서 각각 30분간 반응시킨 후 얼음으로 냉각시켰다. 냉각된 반응액에 클로로포름/메탄올/아세트산 (10 : 20 : 0.6, 부피비)의 혼합액을 가하고, 다시 0.9% 식염수 (pH 2.0으로 조절) 1.25 mL과 디클로로메탄 1.25 mL을 가하여 혼합하였다. 이 반응 생성물을 5,000 \times g에서 5분간 원심분리한 후 물층인 상층을 버리고, 하층(유기용매층)을 질소기류하에서 건조시킨 후, 잔사를 200 μ L의 에탄올에 녹여 그 5 μ L를 HPLC의 1회 분석시료로 사용하였다.

9) 최적 pH 조사¹⁷⁾: L- α -phosphatidylcholine- β -[NBD-aminohexanoyl]- γ -hexadecanoyl 20 μ g에 100 mM의 Na-cholate 40 μ L과 20 mM의 $CaCl_2$ 용액 40 μ L을 가하여 잘 혼합한 후, 여기에 *Pyrococcus horikoshii* 또는 *Sulfolobus acidocaldarius*의 균체 회석액 (1 mg/mL) 400 μ L를 첨가하였다. 이 혼합액에 Tris buffer용액을 가하여 배지의 pH를 6.0, 6.6, 7.2, 7.6 및 8.2로 조절하여 (*S. acidocaldarius*의 경우에는 pH 1.2, 1.8, 2.5과 3.5) 95°C에서 (*S. acidocaldarius*의 경우에는 75°C) 각각 30분간 반응시킨 후 얼음으로 냉각시켰다. 위의 "최적온도 조사"에서와 같은 방법으로 냉각된 반응액에서 유리된 생성물을 회수하여 HPLC로 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

*Pyrococcus horikoshii*와 *Sulfolobus acidocaldarius*의 균체배양, *Pyrococcus horikoshii*의 경우에는 상기 언급한 배지에 100°C에서 3회에 걸쳐 건열멸균한 유황분말을 0.2 %되게 가한 후 고순도의 질소가스로 배지를 혐기성 상태로 만들고, $Na_2S \cdot 9H_2O$ 수용액 (0.2 g/L)으로 잔존하는 미량의 산소를 완전히 제거하였다 (지시약인 resazurin 색깔이 핑크색에서 무색이 될 때까지 한방울씩 가하면서). 여기에 *Pyrococcus horikoshii* 균주를 접종하여 95°C의 배양기에서 5일간 배양하였다. 이 균주는 유황분말을 에너지원으로 이용하고 유화수소가스를 배출함으로써, 배양중 심한 유화수소의 냄새를 느낄

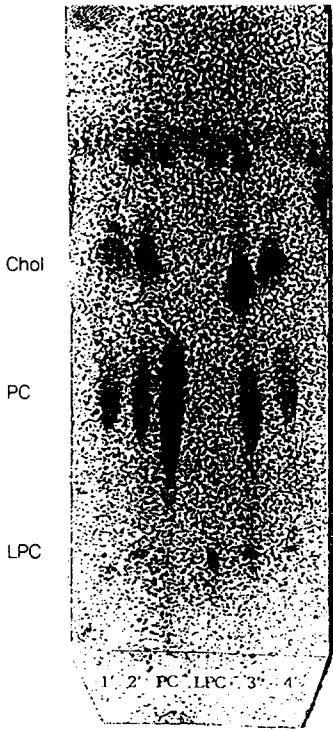


Fig. 3. TCL Chromatogram of the Hydrolysates Derived from Lecithin by Lipolytic Enzymes Excreted from *P. horikoshii* and *S. acidocaldarius* Cell.

Culturing conditions were described in Experimental
Adsorbent: Kieselgel 60F

Developing solvent: CHCl₃ : methanol : H₂O (65 : 25 : 4, by vol) Spots on TLC strip were visualized by spraying of 50% sulfuric acid and charring

1' : hydrolysates from *S. acidocaldarius* cell suspension (10 mL)

2' and 4' : hydrolysates from *P. horikoshii* cell suspension (5 mL)

3' : hydrolysates from *P. horikoshii* cell suspension (10 mL)

PC : lecithin, LPC: lysolecithin, Chol: Na-cholelate

수 있었으며, 배양액 전체가 짙은 갈색을 띠다가 배양이 끝날 무렵에는 맑은 상정액과 검은색 침전으로 분리되었다. 이 배양액을 3,000 rpm의 원심분리기에서 집균하였다. 한편 *S. acidocaldarius*는 75°C에서 호기적 상태에서 잘 자랐으며 성장중에 유황 원소를 요구하지 않았다.

내열성 포스포리파제의 검색, 3 mg의 포스파티딜콜린 (L- α -phosphatidylcholine- β -oleoyl- γ -palmitoyl)과 100 mM Na-cholelate 40 μ L를 포함한 용액에, *P. horikoshii*와 *S. acidocaldarius*의 균체현탁액을 각각 0.5 mL을 가하여 75°C에서 12시간 반응시켰다. 이 반응액을 TLC에 spot하여 클로로포름/

메탄올/물(65 : 25 : 0.5, 부피비)로 전개하여 *P. horikoshii*의 균체 현탁액을 첨가한 경우에는 리조-포스파티딜콜린의 생성을 확인할 수 있었으나, *S. acidocaldarius*의 균체 현탁액을 가한 실험에서는 확인할 수 없었다 (Fig. 4). 트리글리세리드인 트리올레인을 기질로 하여 상기 2 균주의 현탁액을 넣어 상기와 같은 조건으로 리파제의 분비 여부를 조사하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 *S. acidocaldarius*의 균체를 넣은 실험군에서 유리지방산이 존재함으로 이 균체에서는 리파제가 분비되고 있음을 알 수 있었으나, 그러나 *P. horikoshii*균체 현탁액을 첨가한 실험군에서는 균체현탁액량을 증가시켜도 분해산물에서 유리지방산의 존재를 확인할 수 없었다. 즉, *P. horikoshii*는 포스포리파제 A를 분비하나 리파제는 분비하지 못하는 것 같았으며, 반면에 *S. acidocaldarius*의 균체에서는 트리올레인을 분해하는 리파제의 존재가 인정되었으나, 포스포리파제 A의 활성은 적어도 pH 1.5~3.5의 범위에서는 인정되지 않았다.

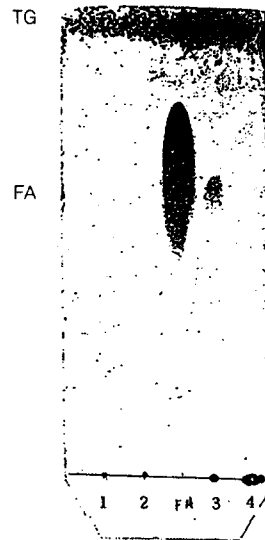


Fig. 4. TCL Chromatogram of the Hydrolysates of Triolein by Lipolytic Enzymes Excreted from *P. horikoshii* and *S. acidocaldarius* Cell.

Culturing conditions were described in Experimental
Adsorbent: Kieselgel 60F

Developing solvent: CHCl₃ : acetone : methanol (94 : 5.5 : 0.5, by vol)

Spots on TLC strip were visualized by spraying of 50% sulfuric acid and charring

1,2 & 4 : hydrolysates from *P. horikoshii* cell suspension (2, 5 & 10 mL)

3 : *S. acidocaldarius* cell suspension (5 mL)

FA: free fatty acid, TG: triacylglycerol (triolein)

반응생성물의 검토, ① L- α -phosphatidylcholine- β -oleoyl- γ -palmitoyl, ② L- α -phosphatidylcholine- β -oleoyl- γ -stearoyl, ③ L- α -phosphatidylcholine- β -palmitoyl- γ -oleoyl과 ④ L- α -phosphatidylcholine- β -linoleoyl- γ -stearoyl의 4 기질에서 각각의 2 mg씩 취하고, 여기에 100 mM Na-cholate용액 40 μ L, 20 mM CaCl₂ 100 μ L와 *P. horikoshii*와 *S. acidocaldarius*의 균체 회석액 0.5 mL를 가하여, 75 °C에서 12시간 반응시켰다. 이때 유리된 지방산의 조성을 가스 크로마토그래피로 분석한 결과를 보면 Table 2과 같다. 즉, *P. horikoshii*의 균체를 넣은 실험군에서는 유리지방산이 검출되었으나, *S. acidocaldarius*의 경우에는 유리지방산이 검출되지 않았다. 또 *P. horikoshii*의 균체를 넣어 실험한 결과를 보면, 기질 ①과 ③에서 팔미트산 (palmitic acid)과 올레산 (oleic acid)이, 기질 ②에서 스테아르산 (stearic acid)과 올레산이, 그리고 기질 ④에서

리파제 A₁와 포스포리파제 A₂가 공존하고 있는지, 아니면 아셀기의 이동이 일어나 위의 2 효소중 어느 한 효소에 의하여 가수분해되는 것인 가를 알 수 없었다.

형광물질 및 UV-흡수물질로 표지된 기질의 이용, 기질로서 형광물질인 NBD (NBD : N-7-nitrobenz-2-oxa-1, 3-diazol)을 표지시킨 L- α -phosphatidylcholine- β -[NBD-aminohexanoyl]- γ -hexadecanoyl 및 UV 흡광도를 가진 *p*-nitrophenyl을 표지시킨 1-decanoyl-2-(*p*-nitrophenylglutaryl) phosphatidylcholine을 기질로 사용하였다. L- α -Phosphatidylcholine- β -[NBD-aminohexanoyl]- γ -hexadecanoyl을 기질로 사용한 경우에는 Kleuser 등의 방법²⁾에 따라 실시하였고, 1-decanoyl-2-(*p*-nitrophenylglutaryl)phosphatidylcholine을 기질로 사용한 경우에는 Washburn²⁰⁾의 방법에 따라 실시하였다. 어느 방법에서나 효소의 가용화 내지는 기질과

Table 2. The Composition of Free Fatty Acid Liberated from The Substrates by Hydrolysis of Phospholipase A in *P. horikoshii* and *S. acidocaldarius* Cell (wt.%)

Substrate	Fatty acid	
	<i>P. horikoshii</i>	<i>S. acidocaldarius</i>
L- α -Phosphatidylcholine- β -oleoyl- γ -palmitoyl	C _{16:0} 48% C _{18:1} 50% others 2%	not detectable
L- α -Phosphatidylcholine- β -oleoyl- γ -stearoyl C18:1	C _{18:1} 47% C _{18:1} 49% others 4%	"
L- α -Phosphatidylcholine- β -palmitoyl- γ -oleoyl	C _{16:0} 50% C _{18:1} 47% others 3%	"
L- α -Phosphatidylcholine- β -linoleoyl- γ -stearoyl	C _{18:0} 49% C _{18:2} 47% others 4%	"

Each of cell suspension (0.5 mL), substrate (2 mg), 100 mM Na-cholate (40 μ L) and 20 mM CaCl₂ (100 μ L) were transferred into a 2-mL Eppendorf vial and then vortexed. The mixture was kept at 75°C for 12 hrs.

C_{16:0} : palmitic acid, C_{18:0} : stearic acid, C_{18:1} : oleic acid, C_{18:2} : linoleic acid

스테아르산과 리놀산 (linoleic acid)이 각각 거의 같은 비율로 생성되었음을 알 수 있었다 (Table 2).

*S. acidocaldarius*의 경우에서 알 수 있는 바와 같이 75°C에서 장시간 반응중에서도 인지질의 아셀 (acyl)기가 비효소적으로 유리되지 않는다는 것을 알 수 있었다. 그러나 *P. horikoshii* cell에는 포스포

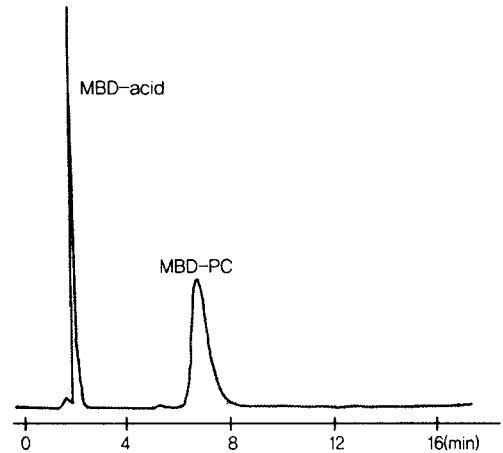


Fig. 5. HPLC Chromatograms of (N-7-nitrobenz-2-oxa-1, 3-diazol) amino-hexanoic acid (NBD acid) Liberated from L- α -Phosphatidylcholine [NBD-aminohexanoyl]- γ -hexadecanoyl, a Fluorescent Substrate, by the Reaction of PLA₂ in the Each Fraction of *P. horikoshii* Cell.

Column : ChromSpher™C₁₈ (4.6mm × 100mm, Chrompack, Netherland)

Solvent : CHCl₃/MeOH/H₂O/acetic acid (500 : 250 : 45 : 45, by vol)

Flow rate : 1.5 mL/min

Detector : fluorescence detector (ex. 450nm, em. 510 nm, Hewlett-Packard 1046A)

Injection vol : 5 μ L

NBD-acid : (N-7-nitrobenz-2-oxa-1, 3-diazol) amino-hexanoic acid

NBD-PC : L- α -Phosphatidylcholine- β -[NBD-aminohexanoyl]- γ -hexadecanoyl

의 친화력을 높이기 위하여 Na-cholate를 첨가하였다. Kleuser 등의 방법은 HPLC에 의하여 상기의 형광기질과 그 가수분해산물을 그 형광에 따라 검출하는 방법이다. 이 형광기질은 95~105°C에서 30분간 반응시켜도 비효소적 열분해가 일어나지 않음이 형광측정으로 확인되었으므로, 내열성 포스포리파제의 활성측정에 적합함을 알 수 있었다 (Fig. 5). 반면에, Washburn법에서는 100 mM의 Na-cholate 100 μ L을 반응용액 (600 μ L)에 가하면 쉽게 기질이 비효소적으로 분해되므로 (아마 Na-cholate의 첨가에 의한 반응액의 알칼리화와 고온 때문으로 여겨짐), 1-decanoyl-2-(p-nitrophenylglutaryl) phosphatidylcholine은 내열성 포스포리파제 A₂의 활성 측정에는 부적당하다고 판단되었다 (data 생략).

포스포리파제 A₂의 최적온도, 최적 pH와 Ca²⁺에 의한 활성화, 조효소액의 최적온도를 L- α -phosphatidylcholine- β -[NBD-aminohexanoyl]- γ -hexadecanoyl 20 μ g를 기질로 하여 조사한 결과 *Pyrococcus horikoshii*는 Fig. 6에서 보는 바와 같이 95°C에서 효소활성이 제일 높았으며, 이 온도에서 효소활성을 100%로 하면 75°C에서 29%, 85°C에서 48% 그리고 105°C에서 67%의 효소활성을 보였다. 또 *Pyrococcus horikoshii*에서 생성된 포스포리파제 A₂의 최적 pH는 6.7~7.2 이었다 (Fig. 7). 반면에 *Sulfolobus acidocaldarius*는 75°C에서 배지의 탁도가 제일 높았으나 상기의 기질을 가수분해하지 못하였

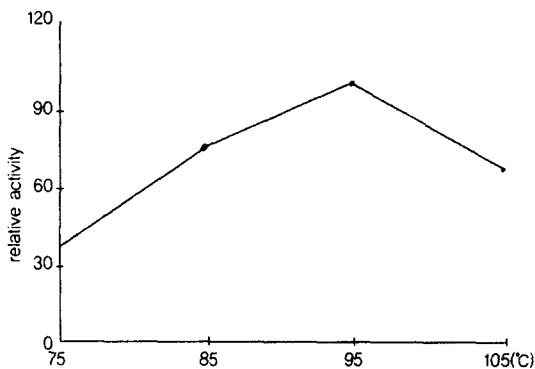


Fig. 6. Optimum Temperature of Phospholipase A₂ in the *P. horikoshii* Cell.

Enzyme source : 400 μ L (1mg/mL) of diluted cell solution (1 mg/mL) of *P. horikoshii*
 Substratr : 20 μ g of L- α -Phosphatidylcholine- β -[NBD-aminohexanoyl]- γ -hexadecanoyl
 100 mM Na-cholate : 40 μ L, 20mM CaCl₂ : 100 μ L
 The mixture was vortexed before adjusting to pH 7.2 and 15°C then kept at 75°C, 85°C, 95°C, and 105°C for 30 min.

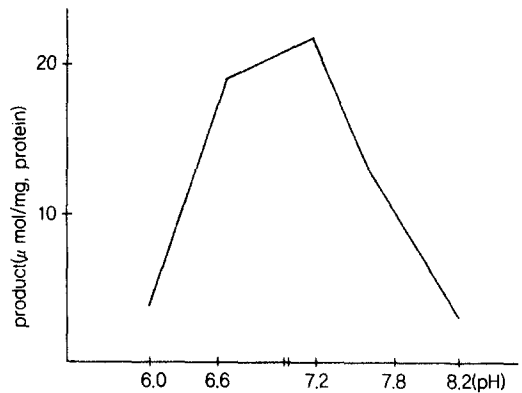


Fig. 7. Optimum pH for growth of *Pyrococcus horikoshii*.

Buffer : phosphate buffer
 Diluted cell soln. (1 mg/mL) : 0.5 mL
 Substrate (NBD-PC, 100 μ g/mL in CHCl₃):100 μ L (12.95 nmol)
 Na-cholate (100 mM in H₂O) : 200 μ L
 CaCl₂ · 2H₂O (20 mM in H₂O) : 40 μ L
 Reacted in a block heater set at 93°C for 40 min

다. 이런 결과는 Kosugi의 결과²⁾와도 일치하며 또 반응액에 20 mM CaCl₂의 양을 증가시키면 반응생성물의 양이 증가하는 것으로 보아 이 효소는 Ca²⁺의존형인 것으로 생각된다 (data 생략).

포스포리파제 A₂의 기질선택성, 이 균체에는 트리올레인과 같은 트리글리세리드에는 작용하는 리파제는 존재하지 않았다. L- α -phosphatidylcholine-dipalmitoleoyl, L- α -phosphatidylcholine- β -palmitoyl- γ -oleoyl와 같은 포스파티딜 콜린분자를 위시하여 포스파티딜 에탄올아민, 포스파티딜 세린과 포스파티딜 이노시톨과 같은 글리세로-인지질을 가수분해 하였으며, 특히 글리세로-인지질에서 아라키돈산 (arachidonic acid), 리놀레산과 같은 불포화 지방 산에 대하여 선택성이 높았다. 그러나 DL- α -phosphatidylcholine- β -palmitoyl- γ -hexadecyl, DL- α -phosphatidylcholine- β -oleoyl- γ -O-hexadecanoyl, DL-phosphatidylcholine-dihexadecanoyl와 같은 α -내지는 β -위치 또는 α 와 β 의 2 위치에 에테르결합을 가진 인지질에는 작용하지 못하고 있음을 알 수 있었다.

4. 결론

호열성균인 *Pyrococcus horikoshii*와 *Sulfolobus acidocaldarius*의 2 균주에서 포스포리파제 A₂의 생

성여부를 조사한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. *Pyrococcus horikoshii*는 편성혐기성 (obligate anaerobic)으로 105°C에서 잘 자랐으나 60°C이하에서는 자라지 않았으며, 또 산소대신에 에너지원으로 분말상태의 유황을 요구하였다. 반면에 *Sulfolobus acidocaldarius*균주는 효모와 설탕분자를 포함한 산성배지 (pH 2.5)에서 호기성 조건하에서 성장하였으며, 최적 온도는 75°C이었다.

2. *Sulfolobus acidocaldarius*균주의 배양액에서는 리파제가 존재하여 트리글리세리드인 트리올레인을 가수분해하였으나, *Pyrococcus horikoshii*의 배양 현탁액은 트리올레인을 가수분해하지 못하였다. 한편 *Sulfolobus acidocaldarius*균주의 배양액을 10배로 농축하여도 적어도 pH 1.5~3.5의 범위에서는 포스포리파제 A의 존재를 확인할 수 없었으나, 반면에 *Pyrococcus horikoshii*균주의 현탁액에서는 포스포리파제 A₂가 존재하고 있었다.

3. 포스포리파제 A₂의 분비여부를 검색하는데 사용되는 기질인 1-decanoyl-2-(*p*-nitrophenylglutaryl)phosphatidylcholine은 효소액을 넣지 않은 대조군에서도 반응중에 쉽게 분해되었으나, 형광물질인 N-7-nitrobenzo-2-oxa-1, 3-diazol을 표지한 기질인 L- α -phosphatidylcholine- β -[N-7-nitrobenzo-2-oxa-1, 3-diazol]aminohexanoyl- γ -hexadecanoyl은 반응중에 스스로 분해되거나 위치이동이 일어나지 않아 본 실험에 기질로서 매우 적합하였다.

4. *Pyrococcus horikoshii*균주에서 얻은 포스포리파제 A₂의 최적 pH와 온도는 각각 6.7~7.2와 95~105°C이었으며, Ca⁺⁺에 의하여 활성화 되었다. 또 이 포스포리파제 A₂는 글리세로-인지질인 포스파티딜 콜린, 포스파티딜 에탄올아민, 포스파티딜 세린과 포스파티딜 이노시톨을 가수분해하였으며, 또 포스파티딜 콜린에 있어서 아라키돈산과 리놀산과 같은 불포지방산에 선택성이 높았다. 그러나 DL- α -phosphatidylcholine- β -palmitoyl- γ -O-hexadecyl, DL- α -phosphatidylcholine- β -oleoyl- γ -O-hexadecyl, DL-phosphatidylcholine-dihexadecyl와 같은 α , β -위치에 에테르결합을 가진 인지질에는 작용하지 못하고 있음을 알 수 있었다.

감사의 글

본연구는 1997년도 교육부 생물화학공학분야 학술연구조성비 (과제번호 97-H-2)에 의하여 수행된 연구결과의 일부이며, 저자는 교육부 관계자 여러분에게 감사를 드립니다. 그리고 이 연구의 일부를

일본 통산성 산하「生命工學共業技術研究所」의 蛋白質工學 研究室에서 행하였으며, 저자는 당 연구실의 고쓰기(小杉佳次)박사님, 마쓰이(松井郁夫)박사님께 심심한 사의를 표하는 바입니다.

참고문헌

- 1) Gunstone, F., in *Fatty Acid and Lipid Chemistry*(1st ed.), Blackie Academic & Professional, London, p. 41, 1996.
- 2) Kleuser, B., Meister, A., Sternfeld, L. and Gercken, G., *Chem. Phys. Lipids*, **79**, 29 (1996).
- 3) Dalke, K. and Buchold, H., *INFORM*, **6**(12), 1284 (1995).
- 4) Buchold, H., *Fat Sci. Technol.*, **8**, 360 (1993).
- 5) Drigalla, P. and Krause, T., *Fat Sci. Technol.*, **8**, 280 (1993).
- 6) Shen, Z. and Cho, W., *J. Lipid Res.*, **36**, 1147 (1995).
- 7) Aura, A. -M., Forssell, P., Mustranta, A. and Poutanen, K., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **72**, 1375 (1995).
- 8) 山岸明彦, 蛋白質 核酸 酵素, **38**(10), 1556 (1993).
- 9) 小林哲夫, 蛋白質 核酸 酵素, **38**(10), 1575 (1993).
- 10) 古賀洋介, 蛋白質 核酸 酵素, **38**(10), 1566 (1993).
- 11) Lanzotti, V., Trincone, A., Nicolaus, B., Zillig, W., De Rosa, M. and Gambarcorta, A., *BBA*, **1004**, 44 (1989).
- 12) Sugai, A., Sakuma, R., Fukuda, I., Kurosawa, N., Itoh, Y. H., Kon, K., Ando, S. and Itoh, T., *Lipids*, **30**, 339 (1995).
- 13) 舟橋三郎, 原 一郎, 山川民夫, 脂質 1, 共立出版社, 東京, pp 130-211, 1970.
- 14) 増地陽子, personal communication.
- 15) Ohnuma, S., Watanabe, M. and Nishio, T., *J. Biochem.*, **119**, 541 (1996).
- 16) Sedmak, J. J. and Grosberg, S. E., *Anal. Biochem.*, **79**, 544 (1977).
- 17) Ruegg, U. T. and Rudinger, J., *Meths. Enzymol.*, **47**, 111 (1977).
- 18) Wittenauer, L. A., Shirai, K., Jackson, R. L. and Jonson, J. D., *Biochem. Biophys. Res.*

- Comm.*, **118**, 894 (1984).
- 19) Christie, W. W., Brechany, E. Y. and Stefanov, K., *Chem. Phys. Lipids*, **46**, 127 (1988).
- 20) Washburn, W. N. and Dennis, E. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 2040 (1990).
- 21) Kosugi, Y. T., Joh, Y.-G., Khan, A. R., Higuchi, K. H., Ishikawa, K. H., and Matsui, I. O., *Annals of the New York Academy of Sciences*, **864**, 349 (1988)

Summary

We checked the presence of phospholipase A₂ (PLA₂) which could split the ester bond at the position 2 in the glycerol backbone of glycerophospholipids, in the cells of hyperthermophiles of *Pyrococcus horikoshii* and *Sulfolobus acidocaldarius*. The results obtained are as follows;

①. *Pyrococcus horikoshii* cells were grown in obligate anaerobic conditions at 95°C and they needed sulfur as energy source instead of oxygen, while *Sulfolobus acidocaldarius* species grew well in the aerobic medium (pH 2.5) containing yeast and sucrose at 75°C.

②. *Pyrococcus horikoshii* cells produced phospholipase A₂ in the cell culture media although this species did not show lipase activity at least in the pH range of 1.5 ~ 3.5. *Sulfolobus acidocaldarius* cells produced lipase hydrolyzing triacylglycerols such as triolein, but did not split any kind of phospholipids used as substrates.

③. The compound of 1-decanoyl-2-(*p*-nitrophenylglutaryl) phosphatidylcholine was not suitable for a substrate in this experiment, though frequently used as a substrate for checking presence of phospholipase A₂, for its decomposition in this experiment. The L- α -phosphatidylcholine- β -(N-7-nitrobenz-2-oxa-1, 3-diazol)aminohexanoyl- γ -hexadecanoyl labelled with a fluorescent material, did not show any migration of acyl chains in the molecule during the reaction with phospholipase A₂ under a hot condition.

④. Phospholipase A₂ in the cells of *Pyrococcus horikoshii*, showed the optimum activity at pH 6.7~7.2 and 95~105°C, respectively, and was activated by addition of calcium chloride solution. And the phospholipase A₂ specifically hydrolyzed glycerophospholipids such as phosphatidyl choline, phosphatidyl ethanolamine, phosphatidyl serine and phosphatidyl inositol, but could not split phospholipid containing ether bonds in the molecule such as DL- α -phosphatidylcholine- β -palmitoyl- γ -O-hexadecyl, DL- α -phosphatidylcholine- β -oleoyl- γ -O-hexadecyl, DL-phosphatidylcholine-dihexadecyl.