

Pseudomonas stutzeri IAM 12097의
Exo-maltotetrahydrolase에 관한 研究

第一報. Exo-maltotetrahydrolase의 精製

李 美 子 · 鄭 萬 在

忠北大學校 食品加工學科

(1984년 4월 8일 수리)

Studies on the Exo-maltotetrahydrolase of *Pseudomonas stutzeri* IAM 12097

Part I. Purification of Exo-maltotetrahydrolase

Mi-Ja Lee and Man-Jae Chung

Department of Food Science and Technology, College of Agriculture,
Chungbuk National University, Cheongju, Korea.

Abstract

The optimum culture time and initial pH, for the production of exo-maltotetrahydrolase from *Pseudomonas stutzeri* IAM 12097, in the trypticase medium were 36 hrs and pH 6.3, respectively. Exo-maltotetrahydrolase was purified by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and two times of column chromatography on DEAE-cellulose. Specific activity of the purified enzyme was 108.6U/mg-protein and yield of the enzyme activity was 9.4%. The purified enzyme showed a single band on polyacrylamide gel electrophoresis and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

緒 論

1970年까지는 各種 少糖類의 製造가 困難하여 그 性質이 充分히 研究되지 못하였던 관계로 그 利用特性에 관하여도 不分明한 點이 많다. 그러나 最近 새로운 少糖類生成 Exo-amylase의 出現으로 그 研究가 進行中에 있으나 β -amylase以外的의 少糖類生成 amylase에 대하여는 아직까지 充分하게 研究되어 있지 않은 實情이다.

少糖類生成 Exo-amylase中 maltose生成 amylase에 관한 研究로는 *Bacillus polymyxa*¹⁻³⁾, *Bacillus megaterium*⁴⁾, *Bacillus* sp. BQ 10⁵⁾, *Pseudomonas* sp. BQ 6⁶⁻⁷⁾, *Bacillus cereus*⁸⁾, *Bacillus cereus* var. *mycodies*^{9,10)}, 등의 β -amylase (α -1, 4 glucan maltohydrolase)를, maltotriose 生成 amylase로는 *Streptomyces griseus* NA 468¹¹⁾의 Exo-maltotriohydrolase를, maltotetraose 生成 amylase로는 *Pseudomonas stutzeri* NRRL B-33 89¹²⁻¹⁶⁾의 Exo-maltotetrahydrolase를, maltopen-

taose生成amylase로는 *Bacillus licheniformis*¹⁷⁾의 Exo-maltopentaohydrolase를, maltohexaose生成amylase로는 *Aerobacter aerogenes*¹⁸⁾와 *Bacillus circulans* F-2¹⁹⁾의 Exo-maltohexaohydrolase등을 들 수 있다.

Exo-maltotetraohydrolase에 관한 研究로는 Robyt등¹²⁾, Schmidt등¹³⁾, Sakano등^{14~16)}의 단편적인 研究가 있을 뿐 廣範圍하게 研究되어 있지 않은 實情이다.

著者 등은 Exo-maltotetraohydrolase의 酵素學의 特性을 綜合的으로 檢討하기 위하여 *Pseudomonas stutzeri* IAM 12097을 供試菌株로 선정하고 本菌株가 生産하는 Exo-maltotetraohydrolase를 精製하였으며 精製酵素에 대하여 polyacrylamide gel electrophoresis 및 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 實施하여 그 結果를 報告하는 바이다.

材料 및 方法

1. 菌 株

Pseudomonas stutzeri IAM 12097

東京大學應用微生物研究所로부터 分讓받았다.

2. 培地 및 培養方法

酵素生成培地로는 Table 1과 같은 培地를 사용하여 前培養과 本培養을 行하였다. 즉, 培地 3ml를 試驗管(1.6×18cm)에 넣고 120°C에서 30分間 加壓殺菌한 後 供試菌을 1白金耳 接種하여 30°C에서 24時間 振盪培養(oscill 120/stroke 5cm/min)하였다. 本培養은 培地 100ml를 500ml의 振盪후라스크에 넣고 120°C에서 30分間 加壓殺菌한 다음 前培養液 3ml를 接種하고 30°C에서 36時間 振盪培養(oscill. 120/stroke 5cm/min)하였다.

3. 酵素活性的 測定

1% soluble starch (5mM phosphate buffer: pH 6.6에 녹임) 0.1ml와 酵素液 0.1ml를 40°C에서 20分間 反應시킨 後 生成된 還元糖을 Somogyi-Nelson法^{20, 21)}에 의하여 定量하였다. 酵素單位는 1分間에 1μmole의 maltotetraose에 相當하는 還元糖을 遊離하는 효소량을 1 unit(1u)로 하였으며, specific activity는 protein mg當의 activity로 表示하였다.

Table 1. Medium for the enzyme production

Trypticase	1%
Soluble starch	0.5%
Yeast extract	0.5%
KH ₂ PO ₄	0.1%
pH	6.3

4. 蛋白質의 定量

Bovine serum albumin을 標準蛋白質로 하여 Lowry등²²⁾의 方法에 의해 定量하였다.

5. DEAE-cellulose의 處理

傾斜法에 의해 微粉子를 除去한 後 DEAE-cellulose를 Buchner濾斗上에 옮겨 0.3N NaOH, 0.3N HCl 및 증류수로 2회 반복하여 洗滌한 後 10mM Tris buffer (pH 8.5)로 平衡化하였다.

6. Polyacrylamide gel electrophoresis

Davis²³⁾의 方法에 따라 실시하였으며 酵素蛋白質은 gel當 25μg으로 조절하였다. 7.5% gel을 사용하였으며 gel當 3mA의 전류로 1時間 30分 동안 泳動을 실시한 다음 coomasie brilliant blue R-250(CBBR-250)으로 1時間 染色하고, methanol을 10%含有하는 7% acetic acid로 脫色하였다. 요오드 染色의 경우에는 泳動이 끝난 gel을 꺼내어 3% soluble starch용액중에서 30°C로 10分間 反應시킨 後 0.1% I₂-1% KI용액으로 染色하였다. gel 保存液은 methanol을 30%含有하는 7% acetic acid를 使用하였다.

7. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

Weber & Osborn²⁴⁾의 方法에 의하여 실시하였다. 酵素蛋白質은 1% SDS와 5% 2-mercaptoethanol을含有하는 10mM phosphate buffer中에서 10分間 煮沸하였다. 10% gel을 사용하였으며 蛋白質은 gel當 15μg으로 조절하고 8mA의 전류로 室溫에서 4時間 泳動하였다. 泳動 後 CBBR-250으로 2時間 染色하고 methanol을 10%含有하는 7% acetic acid로 脫色하였다.

8. Paper chromatography

Whatman No. 1 여지에 반응액을 10μl씩 spot 하고 60°C에서 上昇法에 의하여 2회 展開시켰다.

展開劑로는 65% n-propylalcohol을 사용하였으며 展開後 glucoamylase를 處理하고 40°C에서 1時間 反應시켜 alkaline silver nitrate dip method²⁵⁾에 의해 發色시켰다.

結果 및 考察

1. 培養條件

培養時間別로 酵素活性을 본 結果는 Fig. 1. 과 같이 30°C에서 36時間 培養時에 最高의 活性을 나타내었다.

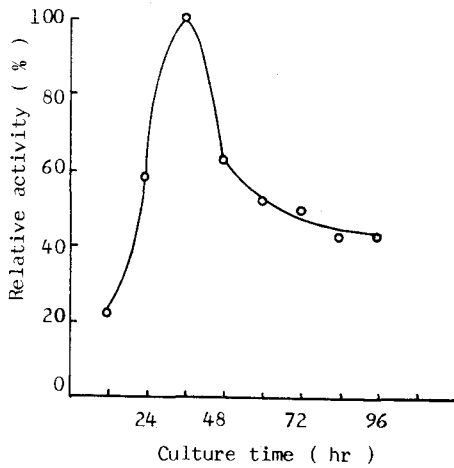


Fig. 1. Effect of culture time on the enzyme production

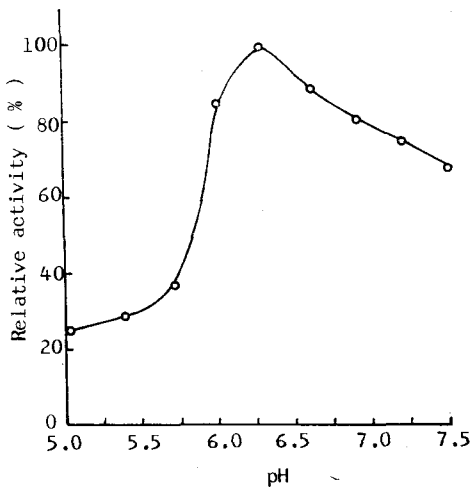


Fig. 2. Effect of initial pH on the enzyme production

培地의 Initial pH를 各各 달리하여 培養한 結果는 Fig. 2와 같이 최적 Initial pH는 6.3이었다.

2. 酵素의 精製

a. 黃酸암모니아 分劃: 培養液을 10,000rpm으로 10分間 遠心分離하여 얻은 上澄液(粗酵素液) 1,500ml에 黃酸암모니아를 0.5飽和度가 되도록 교반하면서 서서히 添加하고 하룻밤 4°C의 低溫室에 放置한 다음 10,000rpm으로 10分間 遠心分離하였다. 沈澱을 少量의 10mM Tris buffer(pH 8.5)에 녹인 다음 不溶成分을 除去하기 위해 다시 10,000rpm으로 10分間 遠心分離하여 上澄液을 分離하고 10mM Tris buffer (pH 8.5)로 이췌뵁 透析하여 145ml의 透析液을 얻었다. 以上의 過程을 要約하면 Fig. 3과 같다.

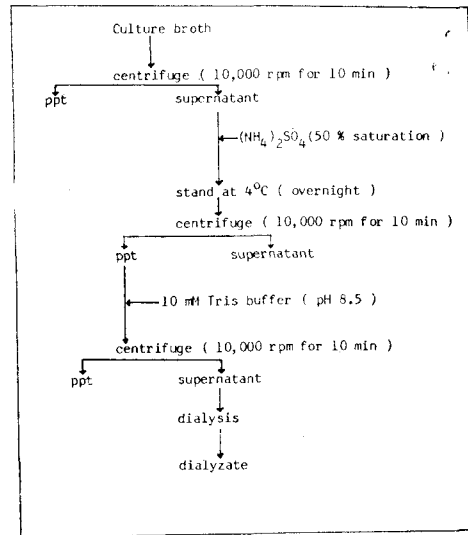


Fig. 3. Flow diagram of ammonium sulfate fraction of the enzyme

b. 1次 DEAE-cellulose column chromatography: 145ml의 透析液을 10mM Tris buffer (pH 8.5)로 平衡化시킨 column (2.0×40cm)에 注入하고 同一 緩衝液 200ml로 column을 洗滌하였다. reservoir에는 10mM Tris buffer (pH 8.5, 0.7M NaCl 含有) 300ml와 mixing chamber에는 10mM Tris buffer (pH 8.5) 300ml를 넣고 溶出하였다. 이때 溶出速度는 時間當 18ml였고 4.5ml씩 分劃하였다 各 fraction의 蛋白質은 mg/ml로, 酵素活性은 u/ml로 表示하였다.

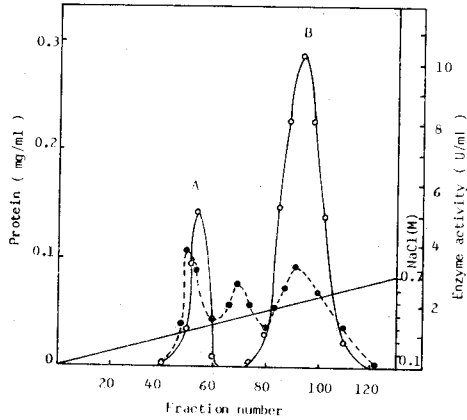


Fig. 4. First column chromatography on DEAE-cellulose

145ml dialyzate was applied on DEAE cellulose column(2.2×40cm) equilibrated with 10mM Tris buffer (pH 8.5). Elution performed with a linear gradient of the same buffer containing NaCl of concentration from 0M to 0.7M at a flow rate of 18ml/hr, and 4.5ml fractions were collected.

○—○ : activity ●—● : protein

Fig. 4에서 보는 바와같이 fraction No. 40~60 과 fraction No. 73~120에서 두개의 活性 peak (peak A와 peak B)가 나타났다. 두개의 peak가 모두 目的하는 maltotetraose生成 amylase인가를

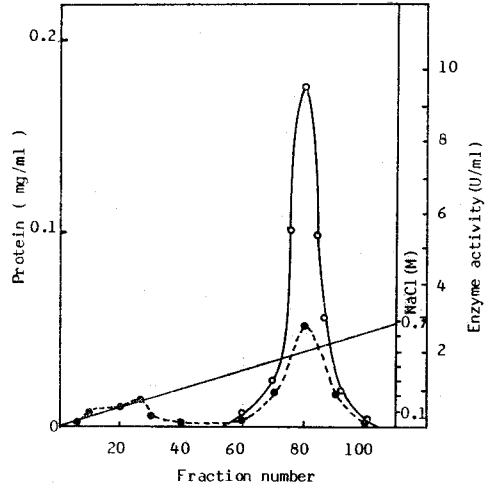
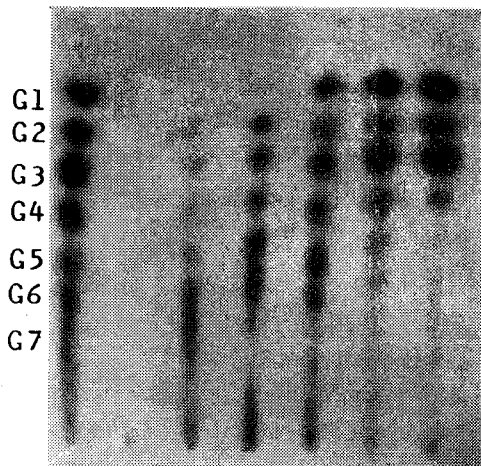


Fig. 6. Second column chromatography on DEAE-cellulose

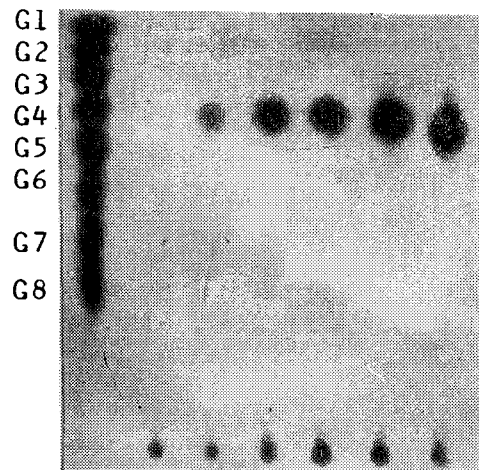
B fraction in Fig. 4 was dialyzed against 10mM Tris buffer (pH 8.5). 112.5ml dialyzed enzyme was applied on the same buffer. Elution was performed at a flow rate of 42ml/hr, and 5.6ml fractions were collected.

○—○ : activity ●—● : protein

확인하기 위하여 paper chromatography를 실시하여 分解産物을 調査한 결과는 Fig. 5와 같이 peak A와 peak B는 전혀 다른 分解樣式을 보였다. 즉 peak A는 α -amylase가 主體이고 peak B는



Std. 0 5 30 50 70 90min
Incubation time
Peak A



Std. 0 5 30 50 70 90min
Incubation time
Peak B

Fig. 5. Paper chromatograms of hydrolysis products on the soluble starch

Table 2. Purification procedure of the enzyme

Step	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (u/mg·protein)	Yield (%)
Crude enzyme	8450	6916	0.8	100.0
(NH ₄) ₂ SO ₄ fractionation	30.5	1487.7	48.7	21.5
First DEAE-cellulose column chromatography	10.3	1061.3	102.9	15.2
Second DEAE-cellulose column chromatography	6.0	651.3	108.6	9.4

는 maltotetraose 生成 amylase 가 主體 이었다.

c. 2次 DEAE-cellulose column chromatography: 目的 하는 Exo-maltotetrahydrolase 部分 (Fig. 4의 peak B) 만을 모아 10mM Tris buffer (pH 8.5) 로 透析 하여 112.5ml 의 透析 酵素液 을 얻었다. 이것을 同一 緩衝液 으로 平衡 化 시킨 column 에 注入 하고, 1次 DEAE-cellulose column chromatography 와 同一 하게 column chromatography 를 실시 하였다. 단 이때의 溶出 速度 는 時間 당 42ml 였고 5.6ml 적 分劃 하였다.

Fig. 6에서 보는바와 같이 fraction No. 60~100 에서 하나의 活性 peak 가 나타났다. 이것을 모아 centriflo (CF 25) 를 使用 하여 농축 하고 精製 酵素 로 使用 하였다.

이와 같은 精製 過程 을 통하여 本 酵素 의 specific activity 는 108.6u/mg·protein 으로 約 136倍 精製 되었으며, 收率 은 9.4% 이었다. 以上의 精製 過程 을 要約 하면 Table 2와 같다.

Sakano 등¹⁶⁾ 은 Sephadex G-100 column chromatography, PBE 94 column chromatography 등에 의하여 *Pseudomonas Stutzeri* NRRL B-3389의 酵素 를 精製 하여 2種 의 Exo-maltotetrahydrolase (F-1과 F-2) 를 分離 하였으며 specific activity 는 各各 104u/mg·protein, 102u/mg·protein 이고 α-amylase 는 生成 되지 않았다고 報告 하였는데, 本 菌株 는 Exo-maltotetrahydrolase 以外 에 α-amylase 를 生成 하는 것이 特異 하였다.

7. 精製 酵素 의 確認 및 純度 檢定

Second DEAE-cellulose column chromatography 에 의하여 精製 한 酵素 의 polyacrylamide gel electrophoresis 의 結果 는 Fig. 7과 같이 Relative mobility 가 0.4인 단일 band 를 나타내었다. 이 단일 band 가 amylase 活性 을 가진 band 인가 를 확인 하기 위하여 요오드 染色 을 한 結果 는 Fig. 7과

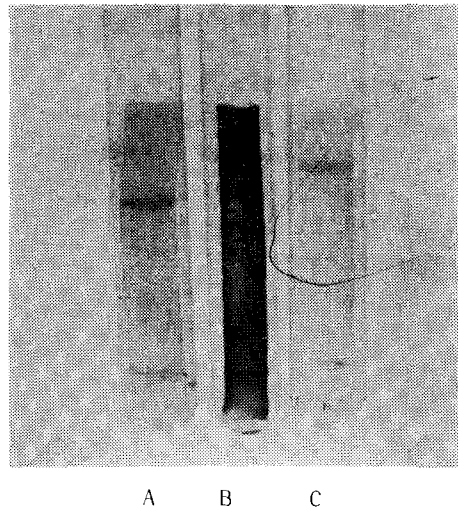


Fig. 7. Pattern of polyacrylamide gel electrophoresis of the purified enzyme

A, B: Polyacrylamide gel electrophoresis

C: SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

A, C: Stained with CBBR-250 solution

B: Stained with iodine-potassium iodide solution

같이 amylase 活性 을 가진 band 로 나타났다.

本 精製 酵素 가 glycoprotein 인지의 여부를 確認 하기 위하여 澱 沃 素 schiff 染色 을 실시 한 結果 는 陰性 으로 나타났으며, 反應 產物 의 paper chromatography 에 의하여 本 精製 酵素 는 Exo-maltotetrahydrolase 임이 確認 되었다.

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis 의 結果 는 Fig. 6와 같이 relative mobility 가 0.28인 단일 band 를 나타내었다.

抄 錄

Pseudomonas stutzeri IAM 12097의 trypticase

培地에서 36時間, initial pH는 6.3일 때 Fxo-malto tetraohydrolase가 최대로 생산되었다. Exo-maltotetraohydase. 黃酸암모니아分劃과 2회의 DE-AE-cellulose column chromatography에 의하여 精製하였으며 精製酵素의 specific activity는 108.6 u/mg·protein, 收率은 9.4%이었다. 本精製酵素는 polyacrylamide gel electrophoresis와 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis에 의하여 各各 單一 band를 나타내었다.

參考文獻

- Murao, S., Ohyama, K. and Arai, M.: *Agr. Biol. Chem.*, 43(4) : 719~726(1979)
- Griffin, P.J. and Fogarty, W.M.: *Biochem. Soc. Trans.*, 1 : 397(1973).
- Marshall, J.J.: *Febs Letter*, 46 : 1(1974).
- Higashihara, M. and Okada, S.: *Agr. Biol. Chem.*, 38(5) : 1023~1029(1974)
- Nanmori, T., Shinke, R., Aoki, K. and Nishira, H.: *Agr. Biol. Chem.*, 38(5) : 942~947 (1983)
- Shinke, R., Kunimi, Y. and Nishira, H.: *J. Ferment. Technol.*, 53(10) : 693~697(1975)
- Shinke, R., Kunimi, Y. and Nishira, H.: *J. Ferment. Technol.*, 53(10) : 698~702(1975).
- 高崎義行: 農化大會要旨集, 291(1974)
- Takasaki, Y.: *Agr. Biol. Chem.*, 40(8) : 15 15~1522(1976)
- Takasaki, Y.: *Agr. Biol. Chem.*, 40(8) : 15 23~1530(1976).
- Wako, K., Hashimodo, S., Kubomura, S., Yokota, K., Aikawa, K. and Kanaeda, J.: *J. Jap. Soc. Starch Sci.*, 26(3) : 179~181(19 79)
- Robyt, J.F. and Ackerman, R.J.: *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 145 : 105~ 114(1971).
- Schmidt, J. and John, M.: *Biochimica et Biophysica.*, 556 : 88~99(1979)
- Sakano, Y., Kashiwagi, Y. and Kobayashi, T.: *Agr. Biol. Chem.*, 46(3) : 639~646(1982)
- 坂野好幸, 柏木豊, 樫山英二, 小林恒夫: 澱粉 科學, 29(2) : 131~137(1982).
- Sakano, Y., Kashiwagi, E. and Kobayashi, T.: *Agr. Biol. Chem.*, 47(8) : 1761~1768(19 83)
- Saito, N.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 155 : 290(1973)
- Kainuma, K., Wako, K., Kobayashi, S., Nogami, A. and Suzuki, S.: *Biochimica et Biophysica Acta*, 410 : 333~346(1975)
- Taniguchi, H., Man Jae, C., Yoshigi, N. and Maruyama, Y.: *Agr. Biol. Chem.*, 47 (3) : 511~519(1983)
- Nelson, N.: *J. Biol. Chem.*, 153 : 375~380 (1944)
- Somogyi, M.: *J. Biol. Chem.*, 195 : 19~23 (1952)
- Lowry, O.H., Rosebrogh, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.S.: *J. Biol. Chem.*, 193 : 265 ~295(1951)
- Davis, B.J.: *Ann. New York Acad. Sci.*, 121 : 404~427(1964)
- Weber, K. and Osborn, M.: *The Journal of Biological Chemistry*, 244(6) : 4006~4112 (1969)
- Trevelyan, W.E., Procter, D.P. and Harrison, J.S.: *Nature*, 166 : 441~445(1950)