

Pseudomonas stutzeri IAM 12097의 exo-maltotetrahydrolase에 관한 研究

第二報. Exo-maltotetrahydrolase 의 特性

李美子 · 鄭萬在*

韓國人蔘煙草研究所*, 忠北大學校 食品加工學科
(1984년 8월 13일 수리)

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

Part II. Characteristics of Exo-maltotetrahydrolase

Mi-Ja Lee and Man-Jae Chung*

Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Daejeon, *Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Chungbuk National University, Cheongju, Korea.

Abstract

Molecular weight of Exo-maltotetrahydrolase produced by *Pseudomonas stutzeri* IAM 12097 was estimated to be approximately 63,000 and 60,000 with SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and Sephadex-G-100 gel filtration, respectively. The isoelectric point was appeared to be pH 4.8. Optimum pH, the stable pH range and optimum temperature of this enzyme were pH 6.6, pH 6.0~10.5 and 45~50°C. The enzyme was stable below 40°C and was rapidly inactivated above 55°C. This enzyme was inactivated completely by Ag⁺, Hg⁺⁺, I₂ and β-cyclodextrin, and slightly by EDTA, p-CMB and IAA. Michaelis constant(Km) of this enzyme toward soluble starch, amylose and amylopectin were 7.70mg/ml, 6.17mg/ml, 5.56mg/ml, respectively.

緒 論

Exomaltotetrahydrolase는 1971年 Robyt등¹⁾에 의하여 *Pseudomonas stutzeri* NRRL B-3389

로부터 최초로 發見된 酵素로 이에 관한 研究로는 Schmidt등,²⁾ Sakano등³⁻⁵⁾의 研究가 있을뿐 아직까지 廣範圍하게 研究되어있지 않은 實情이다 筆者등은 *Pseudomonas stutzeri* IAM 12097의 maltotetraose生産 amylase인 Exo-malto-tetrao-

hydrolase를 ammonium sulfate fractionation과 2회의 DEAE-cellulose column chromatography에 의하여 精製하고 그 結果를 報告하였다.⁶⁾

本報에서는 精製한 Exo-maltotetrahydrolase의 酵素의 特性을 검토하였으므로 이를 報告하는 바이다.

材料 및 方法

1. 試 藥

amylose, amylopectin, soluble starch 및 DNP-alanine은 Sigma製, 標準蛋白質은 Boehringer Mannheim Combithek製, sodium dodecyl sulfate(SDS), 2-mercapto ethanol, blue dextran은 東京化成製, Sephadex G-100은 Pharmacia Fine Chemicals製, pepstatin, leupeptin, antipain은 Protein Research Foundation製, α, β, γ -cyclodextrin은 東京大學 生化學教室에서 分讓받았으며, 그밖의 것은 特級試藥을 使用하였다.

2. 供試酵素

Pseudomonas stutzeri IAM 12097의 Exo-maltotetrahydrolase : 筆者등이 精製한 酵素임⁶⁾.

3. 酵素活性的의 測定

前報에 記述한 方法⁶⁾에 따라 1% soluble starch를 基質로 하여 1分間에 1 μ mole의 maltotetraose에 相當하는 還元糖을 유리하는 酵素量을 1unit로 하였다.

4. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

Weber와 Osborn⁷⁾의 方法에 따라 실시하였으며 標準蛋白質으로써 chymotrypsinogen A, pepsin, hen egg albumin, bovine serum albumin을 使用하였다.

5. Gel electrofocusing

Wrigley^{8,9)}와 Vesterberg¹⁰⁾의 方法에 의해 실시하였으며, pH 3.5~10.0의 ampholine을 사용하고 350V에서 4時間 通電하였다. 이때 두개를 병행하여 실시하였으며, 그중 한개는 5% TCA로 洗滌하여 ampholine을 완전히 除去하고 amido black 10B로 染色한 후 脫色하였다. 나머지 한개는 5mm의 간격으로 切斷하고 각 slice를 2ml의 증류수에 넣어 하룻밤 浸出하여 pH를 測定하였다.

6. Gel filtration

沸騰水浴中에서 충분히 膨潤시킨 Sephadex G-

을 column(2.5×80cm)에 充塡하고 5mM phosphate buffer(pH 6.6)로 平衡化시켰다. blue dextran과 DNP-alanine을 1mg씩 0.5ml의 증류수에 녹여 column에 注入한 후 同一緩衝液으로 溶出하였다. 이때 溶出速度는 時間當 8ml였으며, 3ml씩 分割하여 Void volume과 Bed volume을 求하였다. 이때 使用한 標準蛋白質의 증류는 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis의 경우와 같다

結果 및 考察

1. 分子量的의 測定

1) SDS-PAGE에 의한 分子量的의 測定.

25,000~68,000의 分子량을 갖는 4種의 標準蛋白質을 使用하여 測定하였으며 그 結果는 Fig. 1과 같이 精製酵素의 分子량은 63,000으로 推定되었다.

2) Gel filtration에 의한 分子량測定.

標準蛋白質 및 精製酵素를 Sephadex G-100으로 gel filtration하여 求한 kav와 표준단백질의 log molecular weight를 plot한 結果는 Fig. 2와 같으며 精製酵素의 分子량은 60,000으로 推定되었다.

以上の 結果로 부터 本酵素는 monomer인 것으로 생각된다. Schmidt등²⁾은 *Ps. stutzeri* NRRL B-3389의 Exo-maltotetrahydrolase는 分子량이

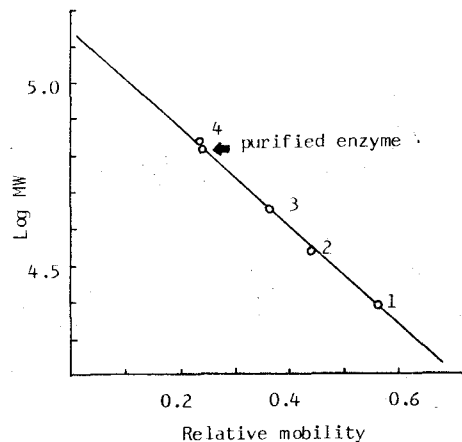


Fig. 1. Estimation of molecular weight of the purified enzyme by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

1. Chymotrypsinogen A(MW 25,000)
2. Pepsin(MW 35,000)
3. Hen egg albumin(MW 45,000)
4. Bovine serum albumin(MW 68,000)

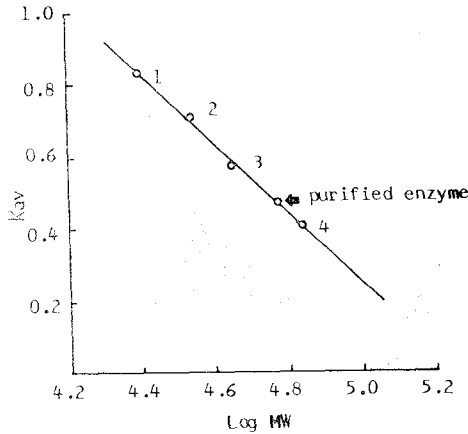


Fig. 2. Estimation of molecular weight by gel filtration with Sephadex G-100
 1. Chymotrypsinogen A(MW 25,000)
 2. Pepsin(MW 35,000)
 3. Hen egg albumin(MW 45,000)
 4. Bovine serum albumin(MW 68,000)

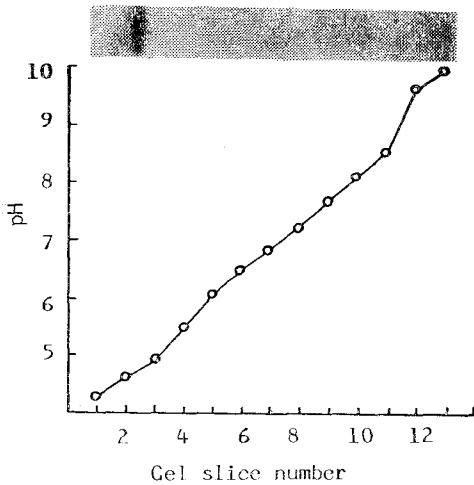


Fig. 3. Isoelectric focusing in polyacrylamide gel column
 Ampholine; pH 3.5~10.0

48,000과 58,000인 2개의 subunit로 되어있고, 7개의 isozyme이 존재한다고 보고하였으나 본酵素에서는 isozyme을 發見할 수 없었다.

2. 等電點의 測定

pH 3.5~10.0의 ampholine을 사용하여 Wrigley 등⁸⁻¹⁰⁾의 方法에 따라 等電點을 測定한 結果는 Fig. 3에서 보는바와 같이 pH 4.8이었다. *Ps. stutzeri* NRRL B-3389의 Exo-maltotetrahydrolase의 等電點은 pH 5.3~5.6으로 본酵素와 差異가 있음을 알 수 있다.

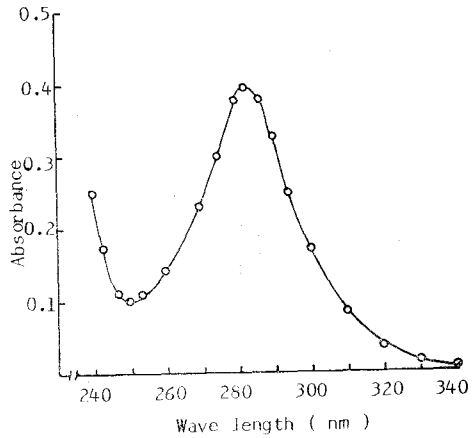


Fig. 4. Ultraviolet absorption spectrum of the purified enzyme. Used buffer; 5mM phosphate buffer(pH 6.6).

3. Ultraviolet absorption spectrum

5mM phosphate buffer(pH 6.6)를 사용하여 測定하였으며 Fig. 4와 같이 283nm에서 最大吸收를 나타내었다. 이것은 다른 amylase의 경우와 거의 一致하고 있다.¹¹⁻¹⁴⁾

4. pH와 溫度의 影響

1) 最適pH

作用最適pH를 알기 위하여 pH 4.0~8.0은 McIlvaine buffer, pH 8.4~11.0은 Atkins와 Pantin buffer를 사용하여 1% soluble starch의 pH를 所定pH로 조절하고 活性을 測定한 結果는 Fig. 5와 같이 最適pH는 6.6이었다.

2) pH 安定性

McIlvaine buffer(pH 2.0~8.0), Atkins와 Pantin buffer(pH 8.5~10.0) 및 Ringer buffer(pH 10.5~12.0)에 酵素液을 同量 加하여 30°C에서 1時間 處理한 후 0.5M phosphate buffer로써 pH 6.6으로 조절하고 酵素의 殘存活性을 測定한 結果는 Fig. 6과 같이 pH6.0~10.5에서 安定하였다.

2) 最適溫度

1% soluble starch를 基質로 하여 所定溫度에서 活性을 測定한 結果는 Fig. 7과 같이 最適溫度는 45~50°C이며 60°C以上에서는 급격하게 活性이 減少되었다.

4) 熱安定性

酵素液을 所定溫度에서 5~20分間 前處理한 후 酵素의 殘存活性을 測定한 結果는 Fig. 8과 같이 45°C에서 20分 처리로 90%의 殘存活性을 나타내

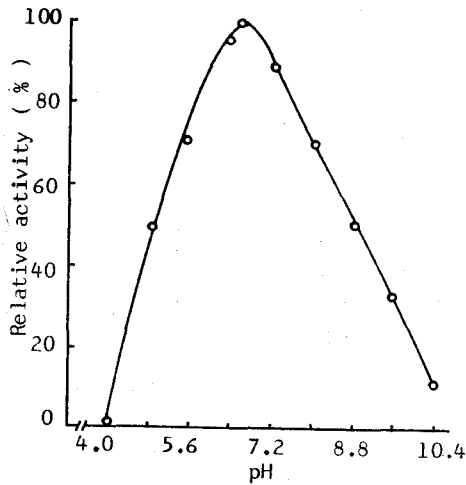


Fig. 5. Effect of pH on the purified enzyme activity
Used buffer; pH 4.0~8.0; Mcllvaine buffer, pH 8.4~11.0; Atkins & Pantin buffer

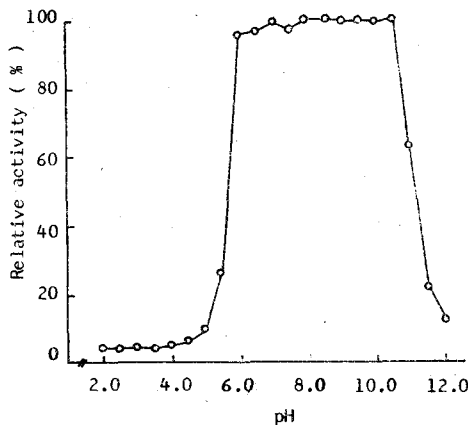


Fig. 6. pH stability of the purified enzyme
Used buffer; pH 2.0~8.0 Mcllvaine buffer pH 8.5~10.0; Atkins & Pantin buffer pH 10.5~12.0; Ringer buffer 20 μ l of enzyme solution was preincubated for 1hr at 30°C with 20 μ l of various buffer solution as above. Preincubated mixture was mixed with 60 μ l of 0.5M phosphate buffer (pH 6.6). To 100 μ l of this mixture, 100 μ l of 1% soluble starch (pH 6.6) was added and the residual enzyme activity was measured.

있으나, 55°C에서 20분간 처리하였을때는 약 30%의 殘存活性을 보였다.

Sakano 등³⁻⁵⁾은 *Ps. stutzeri* NRRL B-3389의 Exo-maltotetraohydrolase의 opt. pH는 7.8~8.2, pH안정성은 5.5~10.0, opt. temp.는 45°C이고,

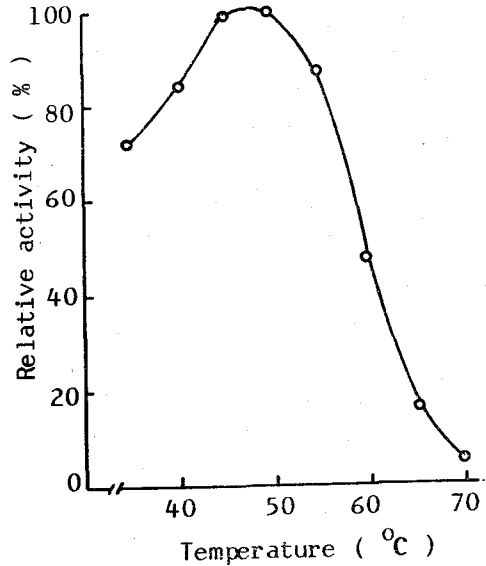


Fig. 7. Effect of temperature on the purified enzyme

The reaction mixture consisted of 20 μ l of enzyme solution(0.02U), 80 μ l of 5mM phosphate buffer(pH 6.6) and 100 μ l of 1% soluble starch. The reaction carried out for 20min at various temperature as indicated.

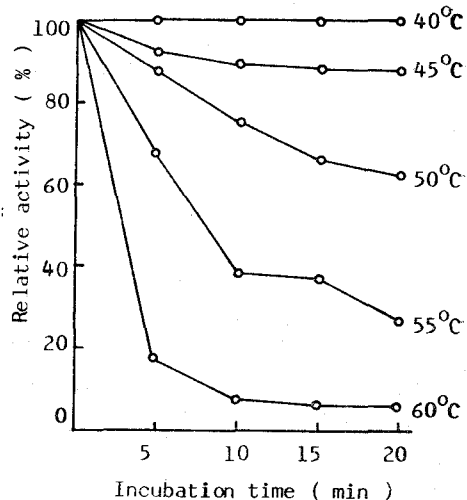


Fig. 8. Thermal stability of the purified enzyme

20 μ l of enzyme solution(0.02U) was preincubated for 5, 10, 15 and 20min at various temperature with 80 μ l of 5mM phosphate buffer(pH 6.6). After preincubation, 100 μ l of 1% soluble starch(pH 6.6) was added and the residual enzyme activity was measured

Table 1. Effect of various chemicals on the purified enzyme activity

Chemicals	Final concentration (mM)	Relative activity (%)
SnCl ₂ ·2H ₂ O	1	74.3
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1	93.3
AgNO ₃	1	0
HgCl ₂	1	0
AlCl ₃ ·6H ₂ O	1	53.1
SrCl ₂ ·6H ₂ O	1	71.4
CaCl ₂	1	86.6
FeCl ₃ ·6H ₂ O	1	93.4
PbCl ₂	1	86.0
BaCl ₂ ·2H ₂ O	1	89.1
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1	80.8
CdCl ₂ ·H ₂ O	1	82.9
Li ₂ SO ₄ ·H ₂ O	1	88.5
Cu(CH ₃ COO) ₂ ·H ₂ O	1	2.8
ZnSO ₄	1	88.6
FeSO ₄ ·7H ₂ O	1	70.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1	77.1
EDTA	1	32.4
IAA	1	70.8
SDS	1	51.7
I ₂	1	0
NBS	1	100.7
Na-arsenate	1	87.1
NaF	1	106.7
NaN ₃	1	87.1
<i>ρ</i> -CMB	1	31.6
Control	0	100.0

20 μ l of enzyme solution(0.02U) was preincubated with 20 μ l of 2mM metal ion solution in 0.5M phosphate buffer(pH 6.6) at 30°C for 30min. After preincubation, 100 μ l of 2mM metal ion solution was added, and then the remaining activity was measured with 100 μ l of 1% soluble starch as substrate.

EDTA: Ethylenediamine tetraacetic acid

IAA: Monoiodoacetic acid

SDS: Sodium dodecyl sulfate

NBS: N-bromosuccinimide

ρ-CMB: *ρ*-chloromercuribenzoic acid

45°C以下에서 安定하나 55°C 以上에서는 완전히 失活된다고 하였는데, 本酵素와 比較할때 opt. pH 에 있어서 현저한 差異를 나타내었다.

5. 各種試藥의 影響

酵素液을 0.5M phosphate buffer(pH 6.6)에 녹인 各種試藥의 溶液에 넣어(終濃度를 1mM로 조절) 30°C에서 30分間 前處理한 후 酵素의 殘存活性을 測定한 結果는 Table 1과 같이 Ag⁺, Hg⁺⁺, I₂에 의해 완전히 失活되었고, Cu⁺⁺, EDTA, IAA, *ρ*-CMB 및 SDS에 의하여는 各各 97%, 68%, 29%, 68% 48%정도 阻害되었다. Schmidt등²⁾, Sakano등³⁾의 Hg⁺⁺, Cu⁺⁺, Zn⁺⁺, Fe⁺⁺에 의하여 크게 阻害된다는 報告와는 약간의 差異가 있었고, EDTA, IAA, *ρ*-CMB의 영향을 받는 것으로 보아 本酵素는 金屬蛋白質인 同時에 sulfhydryl基가 活性의 發現에 關여하는 것으로 생각된다. 또한 I₂에 의하여 완전히 活性이 阻害되는 것으로 보아 本酵素는 活性基로써 tyrosine과 histidine을 가지고 있는 것으로 생각되며¹⁵⁾, *ρ*-CMB의 영향을 받는 것은 Sakano등³⁾의 結果와 一致하였다.

6. Enzyme inhibitor의 影響

酵素阻害劑로 알려진 各種物質을 所定濃度로 酵素液에 넣고 30°C에서 30分間 前處理한 후 酵素의 殘存活性을 測定한 結果는 Table 2와 같이 β -cyclodextrin에 依해서 완전히 阻害되었다. Simon등¹⁶⁾은 β -cyclodextrin에 의한 pancreatic amylase의 阻害는 β -cyclodextrin이 酵素의 active center

Table 2. Effect of enzyme inhibitors on the purified enzyme activity

Inhibitors	Concentration (%)	Relative activity (%)
Pepstatin	0.1	102.2
Leupeptin	0.1	84.4
Antipain	0.1	93.0
<i>ρ</i> -tosyl-L-phenyl-alanine chloromethyl ketone	0.1	96.4
Phenyl ethyl sulfonyl fluoride	0.1	97.5
α -cyclodextrin	1.0	73.9
β -cyclodextrin	1.0	0
γ -cyclodextrin	1.0	76.4
Pullulan	1.0	88.3
Control	0	100.0

Inhibitor sensitivity of the enzyme was assayed as follows; 20 μ l of enzyme solution(0.02U) was preincubated with 20 μ l of inhibitors at 30°C for 30min. After preincubation, 60 μ l of 5mM phosphate buffer(pH 6.6) was added, and then the remaining activity was measured.

에 結合하여 複合體를 形成하기 때문이라고 하였는데 本酵素의 경우도 이와같은 현상에 基因되는 것으로 생각된다. 이 結果는 β -cyclodextrin에 의하여 전혀 阻害를 받지않는다는 Sakano 등⁵⁾의 報告와는 差異가 있다.

7. Michaelis constant(Km)

soluble starch, amylopectin, amylose를 5mM phosphate buffer에 녹여 이들의 濃度를 ml當 1~10mg으로 조절하고(酵素 0.1unit 포함) 40°C에서 20分間 反應시켜 初期反應速度를 測定하여 基質濃度와의 關係를 Lineweaver-Burk의 方法¹⁷⁾에 따라 plot한 結果는 Fig. 9와 같다.

그래프로 부터 求한 soluble starch, amylopectin, amylose에 對한 本酵素의 Michaelis constant (Km)는 各各 7.7mg/ml, 6.17mg/ml, 5.56mg/ml이었다. 上記 세종류의 기질中 amylose가 本酵素와 親和性이 가장 큰 것으로 나타났다. 이것은 Sakano 등³⁾의 結果와 대략 一致하였다.

以上에서 보는바와 같이 *Ps. stutzeri* NRRL B-3389와 供試菌株인 *Ps. stutzeri* IAM 12097이 生産하는 Exo-maltotetraohydrolase의 酵素의 特性에 여러가지 差異點이 發見되었다. 이와 같은 現象은 *Bac. subtilis*의 neutral protease,^{19~20)} *Asp. oryzae*의 alkaline protease^{21,22)}, *Bac. polymyxa*

의 β -amylase²³⁾등에서도 報告된 바와같이 菌株間에 生成되는 효소단백질의 物理化學的性質이 다른데 基因되는 것으로 생각된다.

抄 錄

Pseudomonas stutzeri IAM 12097이 生産하는 Exo-maltotetraohydrolase의 gel filtration에 의하여 推定된 分子量은 60,000이었고, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis에 의하여 推定된 分子量은 63,000이었으며 等電點은 pH 4.8이었다.

最適pH는 6.6, pH安定범위는 6.0~10.5, 最適溫度는 45~50°C, 40°C以下에서는 安定하였으며, 55°C以上에서는 급격하게 不活性化되었다.

本酵素는 Ag⁺, Hg⁺⁺, I₂, β -cyclodextrin에 의하여 完全히 阻害되었고 EDTA, ρ -CMB, IAA에 의하여 약간 阻害되었다.

soluble starch, amylopectin, amylose에 對한 Michaelis constant(Km)는 各各 7.70mg/ml, 6.17mg/ml, 5.56mg/ml이었다.

참 고 문 헌

1. Robyt, J.F. and Ackerman, R.J.: Arch. Biochem. Biophys., 145 : 105~114(1984).
2. Schmidt, J. and John, M.: Biochem. et Biophys. Acta., 556 : 88~99(1979).
3. Sakano, Y., Kashiwagi, Y. and Kobayashi, T.: Agr. Biol. Chem., 46(3) : 639~646(1982).
4. 坂野好幸·柏木豊·櫻山英二·小林恒夫: 澱粉科學, 29(2) : 131~137(1982).
5. Sakano, Y., Koshiyama, E. and Kobayashi, T.: Agr. Biol. Chem., 47(8) : 1761~1768(1983).
6. 李美子·鄭萬在: 韓農化, 27(2) : 73~78(1984)
7. Weber, K. and Osborn, M.: Jour. Biol. Chem., 244(6) : 4006~4112(1969).
8. Wrigley, C.W.: J. Chromatog., 36 : 362~365(1968).
9. Wrigley, C.W.: Method in Enzymology, 22 : 559~564(1971).
10. Vesterberg, O.: Method in Enzymology, 22 : 389~412(1971).
11. Suzuki, T. and Tuzimura, K.: Agr. Biol. Chem., 37(3) : 689~691(1973).

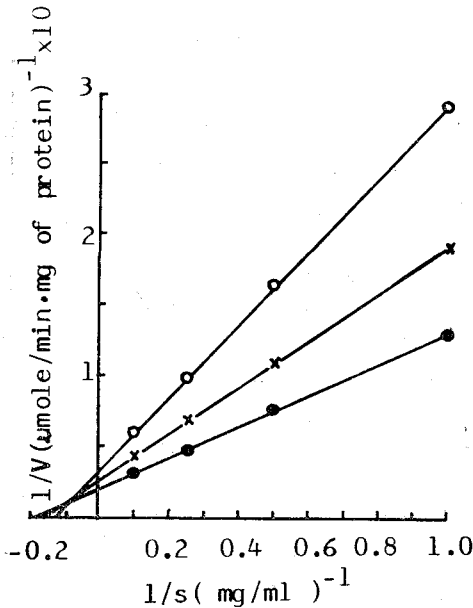


Fig. 9. Effect of substrate concentration on the purified enzyme ○—○; soluble starch ×—×; amylopectin ●—●; amylose

12. Miyata, K. Maejima, K., Tomoda, K. and Isono, M.: *Agr. Biol. Chem.*, 34(2) : 310~318(1970).
13. Ueda, S. and Ohba, R.: *Agr. Biol. Chem.*, 36(3) : 2331~2391(1972).
14. Visuri, K. and Nummi, H.: *Eur. J. Biochem.*, 28 : 555~565(1972).
15. Amemura, K., Kitagawa, H. and Harada, T.: *J. Biochem.*, 17 : 575~578(1975).
16. Simon, I., Mora, I. and Elödi, P.: *Molecul. & Cell. Biochem.*, 4(3) : 205~209(1974).
17. Lineweaver, H. and Burk, D.: *J. Amer. Chem. Soc.*, 56 : 658~666(1934).
18. McConn, J.D., Tsuru, D. and Yasunobu, T.: *J. Biol. Chem.*, 239 : 3706(1964).
19. Tsuru, D., Yamamoto, T. and Fukumoto, J.: *Agr. Biol. Chem.*, 30(7) : 651~658(1966).
20. Tsuru, D., Kira, H., Yamamoto, T. and Fukumoto, J.: *Agr. Biol. Chem.*, 30(11) : 1164~1169(1966).
21. Spadari, S. Subramanian, A.R., Kalnitsky, G., *Biochem. Biophys. Acta.*, 243 : 479(1971)
22. Nordwig, A.R., Jahn, W.F.: *Eur. J. Biochem.*, 3 : 519(1968).
23. Murao, S., Ohyama, K. and Arai, M.: *Agr. Biol. Chem.*, 43(4) : 719~726(1979).