

Herpetosiphon geysericola 균주의 Amylase 부분정제 및 특성

전영수·홍용기*·서정훈**

부산대학교 식품영양학과, *부산수산대학 생물공학과

**경북대학교 미생물학과

(1987년 3월 10일 접수)

Partial Purification and Characteristics of Amylases from *Herpetosiphon geysericola*

Yeong-Soo Jun, Yong-Ki Hong* and Jung-Hwn Seu**

Department of Food and Nutrition, Pusan National University

* Department of Biological Science and Technology, National Fisheries
University of Pusan

** Department of Microbiology, Kyungpook National University

(Received March, 10, 1987)

Abstract

Extracellular α -amylase, β -amylase and glucoamylase produced by a thermophilic and cellulolytic bacterium, *Herpetosiphon geysericola* CUM 317, were partially purified by salting out with ammonium sulfate and by chromatography on a DEAE-cellulose column and on a CM-cellulose column.

The K_m values of α -amylase, β -amylase and glucoamylase for potato starch were 2.31mg/ml , 7.69mg/ml and 8.33mg/ml . The molecular weights of α -amylase, β -amylase and glucoamylase were calculated to be about 84000 dalton, 76000 dalton and 80000 dalton, respectively.

서 론

미생물 유래의 전분 분해효소는 대량생산 및 경제 용이성의 이유로 많이 연구되어졌으며, 그 중에서도 내열성 α -amylase(α -1, 4-glucan 4-glucanohydrolase; E.C. 3, 2, 1, 1)의 성질, 세포의 분비기구, 생합성 조절기구 등에 대해서는 널리 연구되어지고 있다.^{1~16)} β -amylase(α -1, 4-glucan maltohydrolase; E.C. 3, 2, 1, 2)는 Higashihara 등¹⁷⁾에 의하여 처음으로 순수하게 분리된 후, 이의 생산 경제 등에 대한 연구가 활발하-

며,^{18~25)} glucoamylase (α -1, 4-glucan glucohydrolase; E.C. 3, 2, 1, 3)는 주로 곰팡이류에서부터의 효소 생산과 성질에 관한 연구가 많이 이루어지고 있다.^{26~38)} 본인 등은 퇴비 속성화연구^{39~40)} 과정중에서 분리된 고온성 세균 *Herpetosiphon geysericola* CUM 317 균주를 대상으로 그 배양 조건에 따른 세 가지 종류의 amylase 생성변화는 이미 발표한 바 있으며,⁴¹⁾ 다음 이들 각 효소들의 부분정제과정과 기질 친화력, 분자량들을 측정하여 서로 비교하고자 한다.

재료 및 방법

1. 사용균주

실험에 사용된 고온성 cellulose 분해균 *Herpetosiphon geysericola* CUM 317 균주의 동경 및 생리적 성질은 이미 발표되었다.^{39~40)}

2. 배양방법

액체배양을 하기 위하여 0.5% polypeptone, 0.05% K₂HPO₄, 0.01% MgSO₄·7H₂O, 0.01% NaCl의 조성으로 각 효소들의 생성에 최적인 40°C에서 36시간 동안 진탕배양하였다.

3. α -Amylase 활성측정

0.5%의 감자전분을 기질로 사용하여 Fuwa의 microdetermination법⁴²⁾을 이용하였다.

4. β -Amylase 활성측정

Somogyi-Nelson법⁴³⁾에 따라서 유리되어 나오는 전체 환원당을 측정한 다음, glucose oxidase에 의해서 정량되는 유리 glucose 함량과의 차이를 maltose로 환산하여 나타내었다. 효소단위는 1분당 유리되는 1 μ g의 maltose를 생성하는 효소량으로 규정하였다.

5. Glucoamylase 활성측정

Glucose oxidase를 사용하여 반응액중의 유리 glucose를 정량하였으며, 효소단위는 1분당 유리되는 1 μ g의 glucose를 생성하는 효소량으로 규정하였다.

6. 단백질 정량

Shimadzu spectrophotometer UV 200을 사용하여 280nm에서의 흡광도로 표시하거나 혹은 Hammarsten milk casein을 기준으로 중량으로 나타내었다.

7. 효소의 부분정제

1) 균체제거

액체배양된 균체를 10000×g에서 5분간 원심분리하여 그 상정액을 사용하였다.

2) 황산암모늄 염석

황산암모늄을 60% 포화되게 하여 4°C에서 하루밤 두었다. 다음 이를 원심분리시킨 후 2mM 인산 완충용액(pH7.2)으로 1일동안 투석시켰다.

3) DEAE-Cellulose chromatography

투석된 효소를 DEAE-Cellulose column(2×22cm)에 넣은후 pH7.2의 5mM과 50mM의 Tris-HCl 완충용액에 NaCl 농도를 달리하여 유속 70ml/hr되게 유출시키면서 3ml씩 분취하였다.

4) CM-Cellulose chromatography

각 amylase의 peak를 모아 CM-cellulose column(2.2×18cm)에 넣은후 pH6.0의 10mM 인산완충용액으로부터 pH7.6의 100mM 인산완충용액까지 gradient chromatography하였으며 이때 유속은 85ml/hr되게 하여 3ml씩 분취하였다.

8. 분자량 측정

각 효소의 분자량은 Andrews의 방법⁴⁴⁾에 따라 sephadex G-100 column(1.6×24cm)을 사용하여 2mM 인산완충용액(pH7.2)의 3ml/hr 유속으로 3ml씩 분취하였다. 이때 사용한 기준 단백질의 분자량은 bovine serum albumin(70,000, ovalbumin 45,000, trypsin 24,000)이었다.

결과 및 고찰

1. Amylase의 염석

각 amylase들을 부분정제하기 위해서는 각종 당들이 특히 β -amylase의 생성을 repression하므로 당이 침가되지 않은 액체배지를 사용하여 그 배양액에 황산암모늄을 55%에서 95%까지 각 농도별로 포화시켜서 4°C에서 하루밤 침전시켰다. 이를 2mM의 인산완충용액에 투석한 후 각 효소의 활성을 단백질 함량으로 나눈 비활성도가 Fig. 1과 같다. 65%의 황산암모늄 포화농도에서 α -amylase, β -amylase 및 glucoamylase 모두 가장 높은 비활성도 값을 나타내어서 이 염석농도에서 다음 단계의 정제과정에 이용하였다.

2. DEAE-Cellulose Chromatography

투석된 효소용액을 5mM Tris-HCl 완충용액(pH7.2)으로 셋은 DEAE-cellulose column에 의

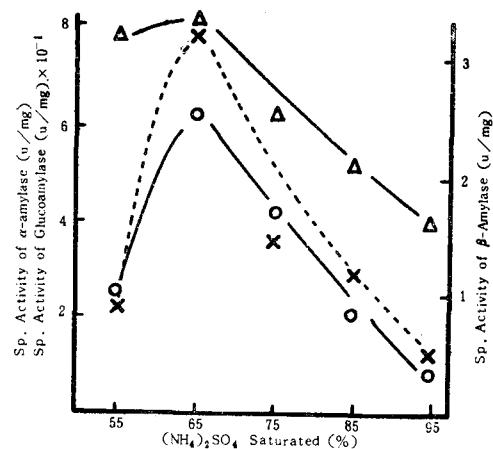


Fig. 1. Salting out of amylases by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturation. $\times \cdots \times$, α -amylase; $\triangle - \triangle$, β -amylase; $\circ - \circ$, glucoamylase.

해 분리한 바 Fig. 2에서 보는 바와 같이 glucoamylase가 둥일 완충용액으로 먼저 분리되어 나왔으며, 다음 0.1M-NaCl이 함유된 50mM Tris-HCl(pH7.2)로 α -amylase가 분리되어 나오고, 0.4M-NaCl이 함유된 50mM Tris-HCl(pH7.2)로 β -amylase가 단계적으로 분리되어 부분정제 할 수 있었다.

3. CM-Cellulose chromatography

분리된 각 amylase들을 10mM 인산완충용액(pH6.0)으로 완충된 CM-cellulose column에서 100mM 인산완충용액(pH7.6)까지 gradient elution시켰다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 α -amylase의 경우 gradient 초기 36번체의 분획에서 가장 높은 활성을 나타내었으며, β -amylase의 경우도 Fig. 4와 같이 elution 초기 16번체 분획에서 가장 많이 유출되어지며 glucoamylase의 경우는 Fig. 5에서와 같이 10mM 인산완충용액(pH6.0)으로 유출시키는 과정에서 분리되어 나왔다. 이를 모두 아직 단일 단백질로서 정제되지는 않았으나 CM-cellulose column상에서 실활되는 정도를 최소화하기 위하여, 분획초기에 분리되게 위와 같은 조건으로 유출조건을 조정하였다.

4. 정제수율

이와 같이 부분정제단계로 각각 분리된 amylase들의 정제수율 및 회수율을 보면 Table 1과 같이 α -amylase의 경우 1,490mℓ의 배양원액으로부터 17.4배의 부분정제로 0.15%의 회수율을 얻었다. β -amylase의 경우 Table 2와 같이 DEAE-Cellulose column을 통하여 20.5배의 부분정제와 1.75

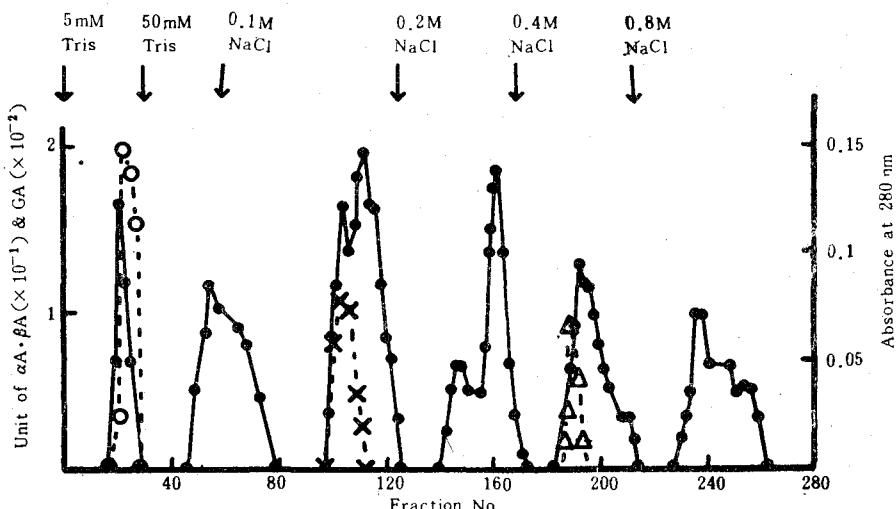


Fig. 2. Chromatography of amylases on DEAE-cellulose. Fraction volume = 3mℓ, flow rate = 70mℓ per hr, column size = 22 × 2cm. $\times \cdots \times$, activity of α -amylase; $\triangle \cdots \triangle$, activity of β -amylase; $\circ - \circ$, activity of glucoamylase; ●—●, absorbance at 280nm.

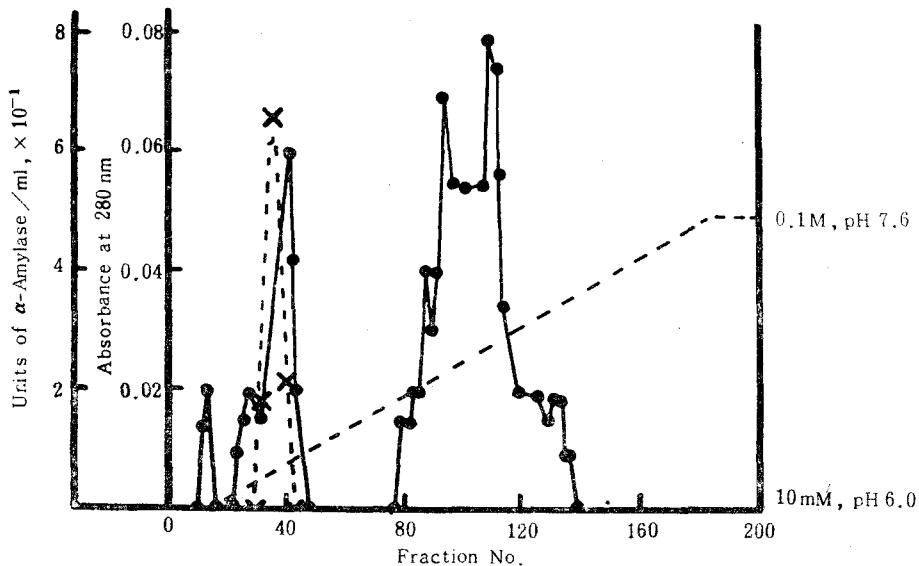


Fig. 3. Gradient chromatography of α -amylase on CM-cellulose. Fraction volume = 3ml , flow rate= 85ml per hr, column size= $18 \times 2.2\text{cm}$. $\times\cdots\times$, activity of α -amylase; ●—●, absorbance at 280nm; dashed line, gradient elution of phosphate buffer.

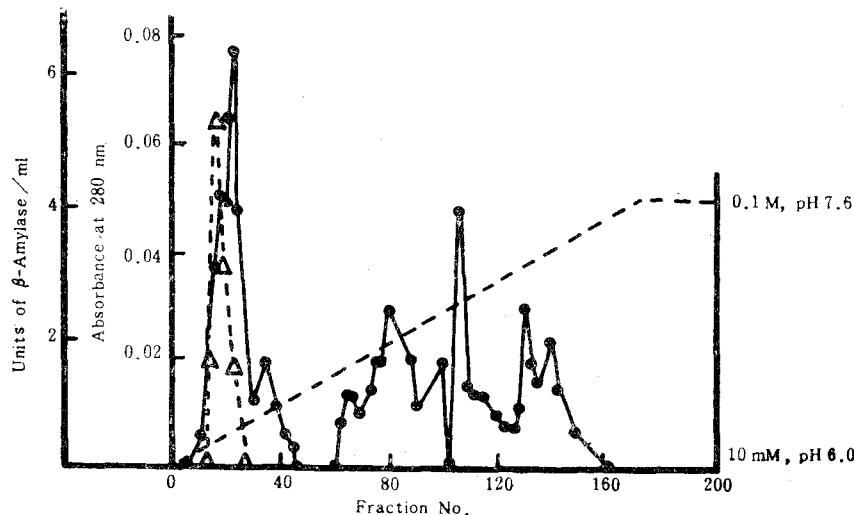


Fig. 4. Gradient chromatography of β -amylase on CM-cellulose. Fraction volume = 3ml , flow rate= 85ml per hr, column size= $18 \times 2.2\text{cm}$. $\triangle\cdots\triangle$, activity of β -amylase; ●—●, absorbance at 280nm; dashed line, gradient elution of phosphate buffer.

%의 회수율로 분리할 수 있었으나 CM-cellulose column에서는 분리도중 실온에서의 많은 효소실 활로서 오히려 정제수율이 감소하였다. gluco-

amylase의 경우 Table 3과 같이 450ml배 양여 액으로부터 267.4배의 부분정제와 7%의 회수율을 얻었다.

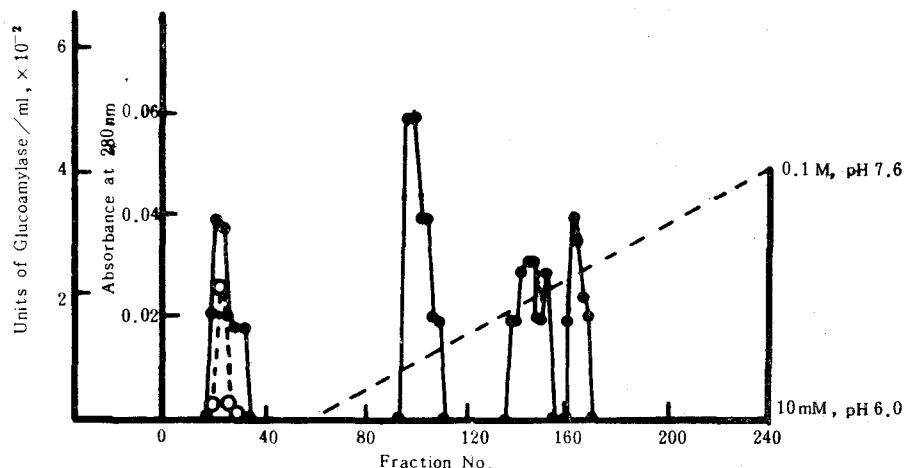


Fig. 5. Gradient chromatography of glucoamylase on CM-cellulose. Fraction volume = 3 ml, flow rate = 85 ml per hr, column size = 18 × 2.2 cm. ○—○, activity of glucoamylase; ●—●, absorbance at 280 nm; dashed line, gradient elution of phosphate buffer.

Table 1. Summary of the partial purification of α -amylase

Purification Steps	Vol (ml)	Total Enzyme (U)	Total Protein (mg)	Sp. Activity (U/mg)	Purification Fold	Yield (%)
Culture Fluid	1490	42018.0	8698.9	4.8	1	100
65% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	93.5	3571.7	351.6	10.2	2.1	8.5
DEAE-Cellulose	25.43	511.1	7.6	67.3	13.9	1.22
CM-Cellulose	14.54	61.1	0.727	840.1	17.4	0.15

Table 2. Summary of the partial purification of β -amylase

Purification Steps	Vol (ml)	Total Enzyme (U)	Total Protein (mg)	Sp. Activity (U/mg)	Purification Fold	Yield (%)
Culture Fluid	1000	6500.0	5838	1.6	1	100
65% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	71	770.8	267	2.9	2.6	11.9
DEAE-Cellulose	22.8	114.1	5	22.8	20.5	1.75
CM-Cellulose	14.1	17.6	0.82	21.5	19.3	0.27

Table 3. Summary of the partial purification of glucoamylase

Purification Steps	Vol (ml)	Total Enzyme (U)	Total Protein (mg)	Sp. Activity (U/mg)	Purification Fold	Yield (%)
Culture Fluid	450	15250	2627	5.8	1	100
65% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	47	12063	176.7	68.3	11.7	78.8
DEAE-Cellulose	49	4312	8.7	495.6	85.1	28.2
CM-Cellulose	10.61	1075	0.69	1558.2	267.4	7.03

5. Amylase의 K_m 치

감자전분을 기질로 하여 각 부분정제된 amylose의 반응속도에 대한 기질농도의 효과를 조사한 바 α -amylase의 경우는 Fig. 6과 같이 K_m 치가 2.31 mg/ml로 나타났다. 이는 타의 내열성 α -amylase들과 비교하여 보면 *Thermospora curvata* 균주⁴⁵⁾의 경우 0.39 mg/ml, *Bacillus stearothermophilus*⁴⁶⁾ 경우 1.0 mg/ml, *B. macerans*⁴⁷⁾ 경우 3.3 mg/ml로서 기질 친화력이 다소 낮다는 것을 알 수 있다. β -Amylase의 기질농도에 따른 효과는 Fig. 7에서와 같이 maltose 환원당으로 환산되어 표시된 반응속도에 대한 K_m 치는 7.69 mg/ml로서 *B. cereus* var. *mycoides*²³⁾의 경우 2.5 mg/ml보다 다소 낮은 기질친화력을 보였다. 그리고 glucoamylase는 Fig. 8에서와 같이 glucose oxidase로 측정된 glucose의 생성속도에 대한 K_m 치는 8.33 mg/ml로서 대표적인 *Aspergillus awamori*³⁸⁾의 경우 0.149 mg/ml보다는 많이 기질친화력이 떨어

진다는 것을 알 수 있었다.

6. Amylase의 분자량

각 amylose의 최종 부분정제단계의 활성부분 반 회수하여 gel filtration 방법으로 Fig. 9와 같이 유출량에 대한 분자량으로 도식하였다. 이 결과 α -amylase는 약 84,000 dalton, β -amylase는 약 76,000 dalton, glucoamylase는 약 80,000 dalton 정도로 나타났다. 이는 대부분의 세균이나 곰팡이로 부터의 α -amylase들은 대개 50,000 내지 60,000 정도의 분자량을 가지며⁴⁸⁾, *B. cereus* var. *mycoides*²³⁾의 β -amylase는 35,000 정도였고, glucoamylase의 경우 *Endomycopsis fibuligera*³⁵⁾는 57,000, *Asp. awamori*³⁸⁾는 86,000 정도, *Mucor rouxianus*³²⁾는 49,000과 59,000의 두 종류를 가진데 반하여 이들 *H. geysericola*의 amylose들은 대체로 큰 분자량들로 구성되어 있다는 것을 알 수 있다.

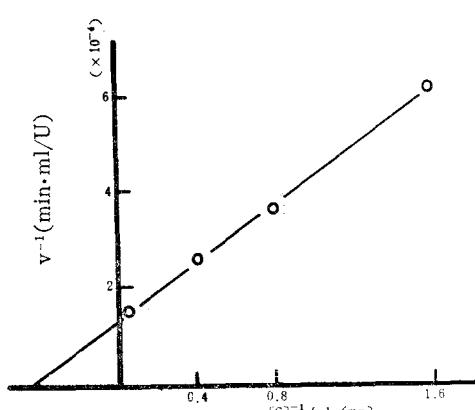


Fig. 6. K_m value on the reaction rate of α -amylase.

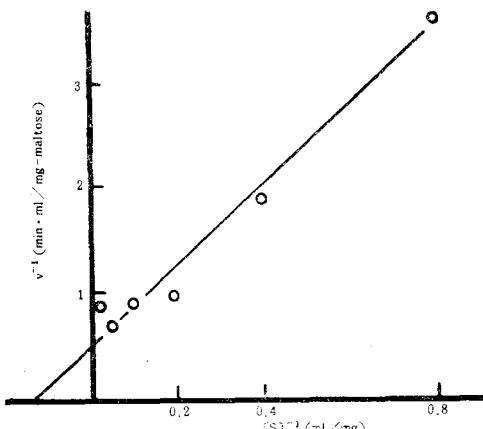


Fig. 7. K_m value on the reaction rate of β -amylase.

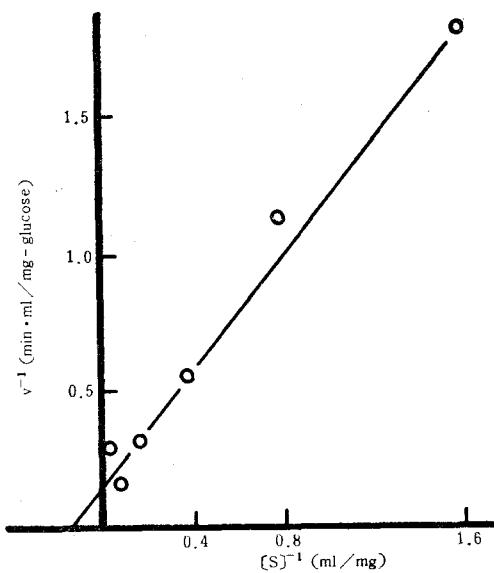


Fig. 8. Km value on the reaction rate of glucoamylase.

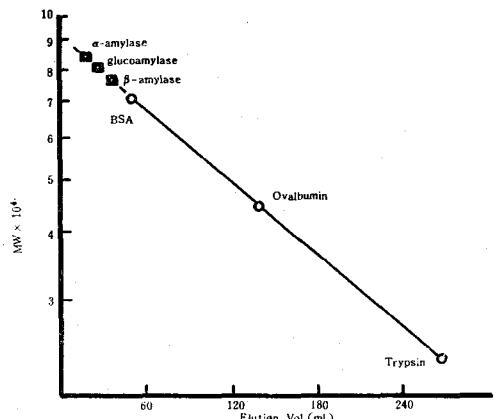


Fig. 9. Determination of molecular weight of amylases by gel filtration method using Sephadex G-100. BSA is bovine serum albumin.

요약

고온성 cellulose 분해이용세균인 *Herpetosiphon geysericola* CUM 317 균주가 생성하는 α -amylase, β -amylase 및 glucoamylase를 황산암모늄 염석, DEAE-cellulose chromatography,

CM-cellulose chromatography 방법으로 각각 부분정제하였다. 이를 α -amylase, β -amylase 및 glucoamylase의 각자 전분에 대한 Km치는 2.31 mg/ml, 7.69 mg/ml 및 8.33 mg/ml였으며, 각 분자량은 84,000 dalton, 76,000 dalton 및 80,000 dalton의 크기로 나타났다.

References

- Stark, E. and Tetrault, P.A.: *J. Bacteriol.*, **62**: 247 (1951).
- Hartman, P.A., Wellerson, R.Jr., and Tetrault, P.A.: *Appl. Microbiol.*, **3**: 7 (1955).
- Manning, G.B., Campbell, L.L., and Foster, R.J.: *J. Biol. Chem.*, **236**: 2958 (1961).
- Welker, N.E. and Campbell, L.L.: *J. Bacteriol.*, **86**: 681 (1963).
- Pfueller, S.L. and Elliot, W.H.: *J. Biol. Chem.*, **241**: 48 (1969).
- Ogasahara, K., Imanishi, A., and Isemura, T.: *J. Biochem.*, **67**: 65 (1970).
- Fogarty, W.M.: *Technol. Ireland*, **2**: 17 (1971).
- Yutani, K.: *J. Biochem.*, **74**: 581 (1973).
- Yutani, K., Sasaki, I., and Ogasahara, K.: *J. Biochem.*, **74**, 573 (1973).
- Buonocore, V., Caporale, C., Rosa, M.D., and Gambacorta, A.: *J. Bacteriol.*, **128**: 515 (1976).
- Upton, M.E. and Forgarty, W.M.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**: 59 (1977).
- Welker, N.E. and Campbell, L.L.: *J. Bacteriol.*, **86**: 1202 (1963).
- Coleman, G.: *J. Gen. Microbiol.*, **49**: 421 (1967).
- Schaeffer, P.: *Bacteriol. Rev.*, **33**: 48 (1969).
- Ueda, Y. and Yuki, S.: *Jap. J. Gen.*, **46**: 253 (1971).
- Saito, N. and Yamamoto, K.: *J. Bacteriol.*, **121**: 848 (1975).

17. Higashihara, M. and Okada, S.: *Agr. Biol. Chem.*, **38**: 1023 (1974).
18. Hoshino, M., Hirose, Y., Sano, K., and Mitsugi, K.: *Agr. Biol. Chem.*, **39**: 2415 (1975).
19. Shinke, R., Kunimi, Y., and Nishira, H.: *J. Ferment. Technol.*, **53**: 698 (1975).
20. Shinke, R., Kunimi, Y., and Nishira, H.: *J. Ferment. Technol.*, **53**: 693 (1975).
21. Shinke, R., Kunimi, Y., and Nishira, H.: *J. Ferment. Technol.*, **53**: 687 (1975).
22. Takasaki, Y.: *Agr. Biol. Chem.*, **40**: 1515 (1976).
23. Takasaki, Y.: *Agr. Biol. Chem.*, **40**: 1523 (1976).
24. Yamane, T. and Tsukano, M.: *J. Ferment. Technol.*, **55**: 233 (1977).
25. Shinke, R., Kunimi, Y., Aoki, K., and Nishira, H.: *J. Ferment. Technol.*, **55**: 103 (1977).
26. Pazur, J.H. and Ando, T.: *J. Biol. Chem.*, **235**: 297 (1960).
27. Ohga, M., Shimizu, K., and Morita, Y.: *Agr. Biol. Chem.*, **30**: 967 (1966).
28. King, N.J.: *Biochem. J.*, **105**: 577 (1967).
29. Watanabe, K. and Fukimbara, T.: *J. Ferment. Technol.*, **46**: 992 (1968).
30. Lineback, D.R., Russell, I.J., and Rasmussen, C.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **134**: 539 (1969).
31. Lineback, D.R. and Baumann, W.E.: *Carbohydr. Res.*, **14**: 341 (1970).
32. Tsuboi, A., Yamasaki, Y., and Suzuki, Y.: *Agr. Biol. Chem.*, **38**: 543 (1974).
33. Krzechowska, M. and Urbanek, H.: *Appl. Microbiol.*, **30**: 163 (1975).
34. Sukhumavasi, J., Kato, K., and Harada, T.: *J. Ferment. Technol.*, **53**: 559 (1975).
35. Kato, K., Kuswanto, K., Banno, I., and Harada, T.: *J. Ferment. Technol.*, **54**: 831 (1976).
36. Moriyama, S., Matsuno, R., and Kamikubo, T.: *Agr. Biol. Chem.*, **41**: 1985 (1977).
37. Yamasaki, Y., Tsuboi, A., and Suzuki, Y.: *Agr. Biol. Chem.*, **41**: 2139 (1977).
38. Yamasaki, Y., Suzuki, Y., and Ozawa, J.: *Agr. Biol. Chem.*, **41**: 2149 (1977).
39. 홍용기, 김종국, 배무, 서정훈, 홍순덕: 경북대학교 산업개발연구소 연구보고집, **10**: 109 (1982).
40. 홍용기, 김종국, 배무, 서정훈, 홍순덕: 경북대학교 산업개발연구소 연구보고집, **10**: 119 (1982).
41. 전영수, 서정훈: 한국식량영양학회지, **14**: 188 (1985).
42. Wijeyaratne, S.C., Waki, T., Suga, K.I., and Ichikawa, K.: *Annual Reports of ICME*, **2**: 213 (1979).
43. Ando, E., Terayama, H., Nishizawa, K., and Yamakawa, T.: *Biochemical Research Methods*, Vol. 1, Asakura press, Tokyo, 126 (1967).
44. Andrews, P.: *Biochem. J.*, **96**: 595 (1965).
45. Glymph, J.L. and Stutzenberger, F.J.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **34**: 391 (1977).
46. Manning, G.B. and Campbell, L.L.: *J. Biol. Chem.*, **236**: 2952 (1961).
47. DePinto, J.A. and Campbell, L.L.: *Biochemistry*, **7**: 114 (1968).
48. Minoda, Y., Arai, M., Torigoe, Y., and Yamada, K.: *Agr. Biol. Chem.*, **32**: 110 (1968).