

*Pediococcus halophilus*로부터 생성한 α -Glucosidase의 정제 및 특성

민해기 · 이호근 · 문지웅¹ · 강국희*
성균관대학교 낙농학과, ¹서울우유 기술연구소

Purification and Properties of α -Glucosidase from *Pediococcus halophilus*

Min, Hae-Ki, Ho-Keun Yi, Jee-Woong Moon¹ and Kook-Hee Kang*

Dept. of Dairy Science, Sung Kyun Kwan University, Suwon 440-746, Korea

¹Technical Research Institute, Seoul Dairy Co-Operative

Abstract — A bacterial strain No. 2, which highly produced α -glucosidase, was isolated from Kimchi and identified to be a similar species of *Pediococcus halophilus*. This enzyme was purified by protamine sulfate, ammonium sulfate fractionation, ion exchange and gel filtration. The maximal α -glucosidase activity was observed at pH 6.0 and this enzyme was stable at pH 6.0~7.5. The optimum temperature of this enzyme activity was 37°C, but enzyme activity was gradually lost above 37°C. This enzyme was activated by 10 mM MgCl₂ and inhibited by 10 mM mercaptoethanol. The kinetics of PNPG(p-Nitrophenyl- α -D-glucopyranoside) and maltose were $K_m=0.52$ mM/27.5 μ g protein, $V_{max}=0.021$ mM/min 27.5 μ g protein and $K_m=0.32$ mM/27.5 μ g protein, $V_{max}=0.025$ mM/min 27.5 μ g protein, respectively. The molecular weight of α -glucosidase was about 37,000.

α -Glucosidase(EC 3.2.1.20 ; α -D-Glucoside glucohydrolase)는 disaccharides, oligosaccharides 및 aryl-, alkyl- α -glucopyranosides를 D-glucose로 분해하는 효소로 알려져 있다. 이 효소는 식품, 화학, 세척제 및 직물공업 등에서는 전분으로부터 여러당을 변환시키는데 이용되기도 한다(1-3). α -Glucosidase는 효모, 세균, 곰팡이 등 많은 미생물로부터 생산되며, *Aspergillus niger*(4), *Bacillus circulans*(5), *Bacillus thermoglucosidus* KP 1006(6), *Clostridium* sp.(7)에 의한 α -glucosidase가 보고되었으며 Costantino 등(8)에 의해 초고온성 세균인 *Pyrococcus furiosus*에서 생성되는 α -glucosidase가 보고되었다. 최근에는 *Aspergillus niger*(9)로부터 α -glucosidase 결정화와 기질특이성에 대한 연구가 보고되었다. 한국 전통 음식중에서 가장 대표적인 것으로서 오랫동안 한국인의 식탁에서 가장 중요한 부식으로 사용되어온 김치로

부터 분리 및 동정된 *Pediococcus halophilus*에 의한 α -glucosidase의 정제 및 특성을 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

균주분리 및 동정

호화 전분이 포함된 김치를 3일 동안 상온에서 숙성시킨 후 APT medium(10)를 사용하여 유산균을 분리하였으며, paper chromatography(11)로 유산 생성을 확인하였다. 유산발효 형태는 McDonald 등(12)의 방법에 준하였고, 기타 동정은 Bergey's manual(13)에 따라 실시하였다.

효소의 생산

*Pediococcus halophilus*의 α -glucosidase 생산을 위한 배지는 0.5% soluble starch, 0.4% trypticase peptone, 0.4% yeast extract, 0.5% sodium citrate, 0.5% potassium phosphate로 초기배양 pH6.5로 하여 37°C에서 24시간 배양하였다.

Key words: *Pediococcus halophilus*, α -glucosidase, properties

*Corresponding author

조효소액의 조제

배양이 끝난 후 배양액을 4°C로 급냉하고 저온(4°C)에서 7,000 rpm, 20분간 원심분리하여 균체를 회수한 다음 50 mM citrate phosphate buffer(pH7.0) 용액으로 세척하였다. 미리 냉각된 세포마쇄용 aluminum oxide(Junsei Chemical Co., Ltd)를 균체 무게에 대해서 15 : 1 비율로 가하여 유발에서 갈아서 세포를 파쇄하였다. 파쇄된 균체를 50 mM citrate phosphate buffer(pH 7.0)에 현탁시켜 10,000 rpm, 30분간 원심분리하여 분리된 상등액을 본 실험의 균체내 조효소액으로 사용하였다.

효소 활성 측정

Kleinaman(14)의 방법에 따라 p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside(PNPG, Sigma Chemical Co., Ltd.)를 기질로 하여 측정하였다. 50 mM citrate phosphate buffer(pH 7.0)에 PNPG를 5 mM이 되도록 용해한 기질용액 0.5 ml를 37°C에서 미리 이온화시킨 후, 적절히 희석한 효소액 0.5 ml를 가하여 37°C, 10분간 반응시킨 후, 냉각된 0.55 M Na₂CO₃용액 4 ml를 첨가하여 반응을 정지시킨 다음, 발색된 황색의 흡광도를 400 nm에서 측정하였다. 효소의 활성은 PNP(p-nitrophenol) 표준곡선으로부터 산출하였다. 효소활성의 단위는 상기조건에서 1분간 1 μ mol의 p-nitrophenol을 유리시키는데 필요한 효소량을 1 unit로 하였다.

효소의 정제

조효소액을 ammonium sulfate 분획, protamine

sulfate 처리에 의한 핵산제거, gel filtration(Sephadex G-100), ion exchange chromatography(DEAE-Sephadex A-50) 단계로 정제하였다. 효소의 정제도는 7.5% SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)로 확인하였다.

단백질 정량 및 분자량 측정

단백질 정량은 Lowry 등(15)의 방법에 준하였고, 표준단백질은 bovine serum albumin을 사용하였다. 효소의 분자량 측정은 Hemes와 Rickwood(16)의 방법에 준하여 실시하였다.

결과 및 고찰

균주의 분리 및 동정

호화전분이 포함된 김치를 3일간 상온에서 숙성시킨 후 0.02% bromo cresol purple과 soluble starch가 포함된 APT 고체배지에서 산을 생성하여 노란색깔을 띠는 6균주를 선별하였다. 선별된 6균주중 유산 생성을 조사하기 위해 정성 paper chromatography로 확인한 결과는 Fig. 1과 같다. 이 균주들은 모두 유산을 생성한 것으로 보아 유산균임을 알 수 있었다. 선별된 6 균주는 soluble starch가 포함된 APT 액체배지에서 37°C에서 2일간 배양하면서 그 중 균 생육과 cell free extract로부터 α -glucosidase 활력이 가장 우수한 strain No. 2를 본 연구의 시험균주로 최종선별하여 동정을 실시하였다(Table 1). 본 분리 균주 No. 2의 형태학적, 생화학적, 생리학적 특성 및 탄소원의 이용성은 Table 2에 나타낸 바와 같다. 이상의 실험결과에 의하면 No. 2 균주는 *Pediococcus halophilus* 또는

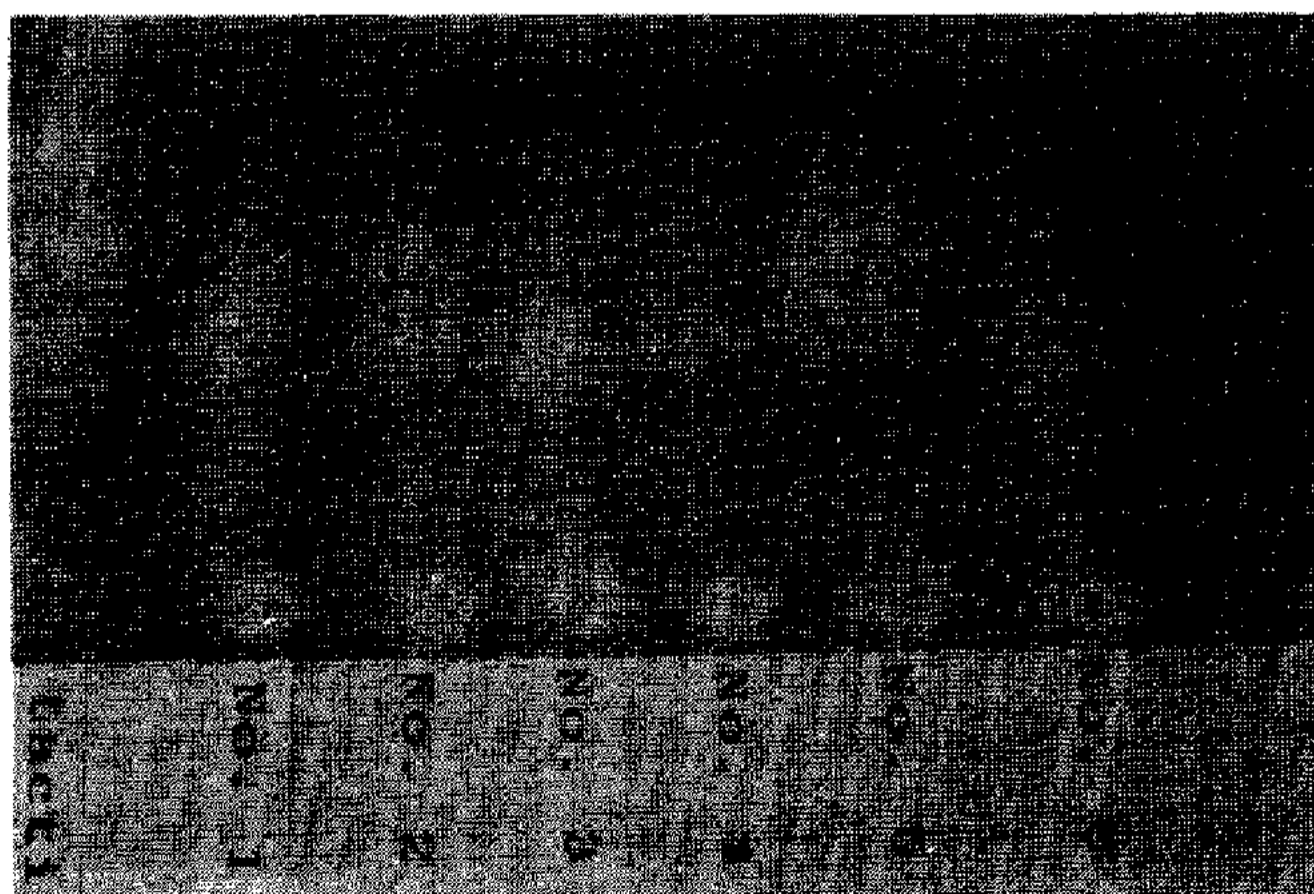


Fig. 1. Paper chromatography of lactic acid production from isolated strain.

Table 1. Production of α -glucosidase by the isolates.

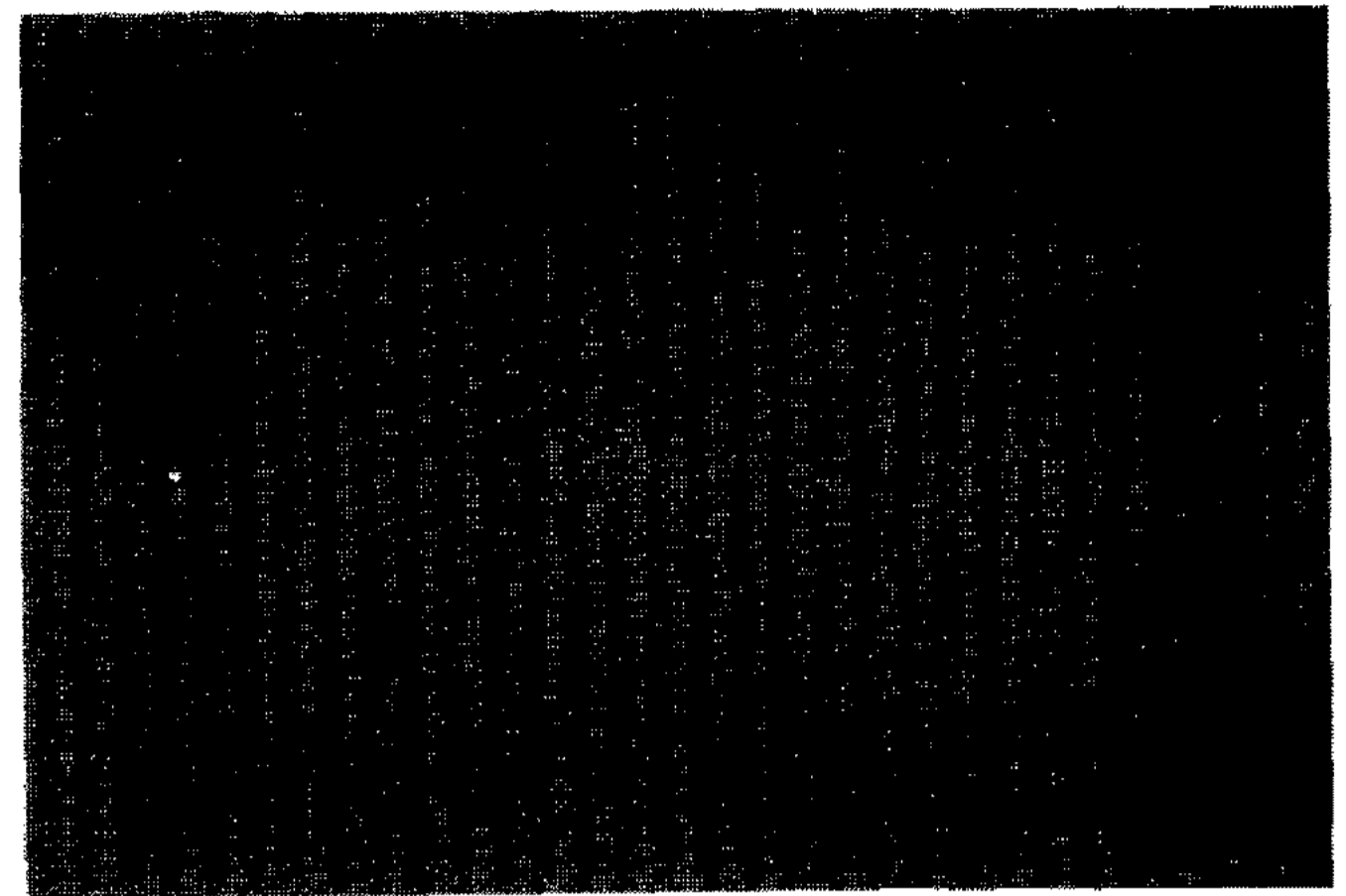
Strain No.	Viable cell count (colony No. /ml)		Final pH	Specific activity (unit/mg protein)
	Before incubation	After incubation		
1	8.4 × 10 ⁵	1.0 × 10 ⁷	4.10	1.04
2	4.2 × 10 ⁵	4.2 × 10 ⁸	3.33	20.10
3	7.8 × 10 ⁵	1.0 × 10 ⁷	4.00	2.02
4	5.9 × 10 ⁵	4.0 × 10 ⁷	3.66	4.32
5	4.9 × 10 ⁵	1.1 × 10 ⁸	3.50	10.80
6	6.1 × 10 ⁵	1.0 × 10 ⁷	3.80	3.24

Culture temperature: 37°C, culture time: 48 hrs.

Table 2. Microbiological characteristics of the isolated strain No. 2

1. Morphological characteristics	
Cells	spherical 0.6~1.0 μ m short
Gram stain	Gram-positive
Motile	-
Spore formation	+
2. Physiological characteristics	
Growth at	
35°C	+
40°C	-
50°C	-
Growth at	
pH 4.2	-
pH 7.5	+
Growth in	
4.0% NaCl	d
6.5% NaCl	+
Fermentation	Homo
3. Biochemical characteristics	
Glucose	+
Arabinose	+
Galactose	+
Cellobiose	+
Maltose	+
Fructose	+
Mannose	+
Sorbitol	-
Rhamnose	+
Raffinose	-
ONPG	+
ADH	+
LDC	+
TDA	-
ODC	-
IND	-
CIT	-
GEL	-
H ₂ S	-
URE	-

+ : Positive, - : Negative, d: diversity, ONPG: β -Galactosidase, ADH: Arginine dehydrolase, LDC: Lysine decarboxylase, TDA: Tryptophan desaminase, ODC: Ornithine decarboxylase, IND: Indole, CIT: Simmons citrate, GEL: Proteolysis of gelatin, H₂S: Production of H₂S, URE: Urease(Ferguson)

**Fig. 2. Photomicrograph of morphology of *P. halophilus* strain No. 2($\times 1500$).**

그 유연균으로 판명되었다(Fig. 2).

효소의 정제

Protamine sulfate에 의한 핵산제거 : 조효소액에 1% protamine sulfate 용액을 첨가하여 4°C에서 30 분간 방치한 후 원심분리하여 침전된 핵산을 제거하였다. Protamine sulfate의 양은 시료의 단백질 1 mg당 0.25 mg이 되도록 첨가하였다. 이때 specific activity(25.06 unit/mg protein)는 조효소액보다 1.22배 증가되었다.

Ammonium sulfate 분획 : Protamine sulfate 처리가 끝난 시료에 고품질 ammonium sulfate를 40% 농도로 포화시켜 상등액에 2차로 40% 농도로 처리한 다음, 4°C에서 3시간 정지한 후 원심분리하여 침전된 효소단백질을 분획하고 소량의 50 mM citrate phosphate buffer(pH 7.0)에 용해하였다. 잔존하는 ammonium sulfate를 제거하기 위해서 4°C에서 투석하였다. 이때 specific activity(51.02 unit/mg protein)는 조효소액보다 2.5배 증가되었다.

Sephadex G-100 gel 여과 : Ammonium sulfate 처리가 끝난 효소액을 50 mM citrate phosphate buffer(pH 7.0)로 평형시킨 Sephadex G-100 column(1.8 \times 65cm)에 주입하여 시간당 20 ml의 유속으로 tube 당 5 ml씩 분획하였으며(Fig. 3), 효소활성이 있는 분획은 No. 15~25이었다. Gel filtration한 효소용출 용액의 specific activity(85.40 unit/mg protein)는 조효소액보다 4.16배 증가되었다.

DEAE Sephadex A-50 이온교환 : Gel 여과가 끝난 효소액을 완충용액으로 평형시킨 DEAE-Sephadex

A-50 column(3.3×25cm)에 흡착시켰다. 흡착된 효소는 0~0.5 M NaCl gradient로 시간당 20 ml의 유속으로 용출 tube당 3ml씩 분획하여 그 결과 No. 35~45에서 활성분획을 얻었다(Fig. 4). 이때 specific activity(413.62 unit/mg protein)는 조효소액에 비해

20.17배 증가되었다. 이상의 정제과정 결과를 Table 3에 요약하였으며 정제된 α -glucosidase는 7.5% SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)하여 순수하게 정제되었음을 확인하였다(Fig. 5).

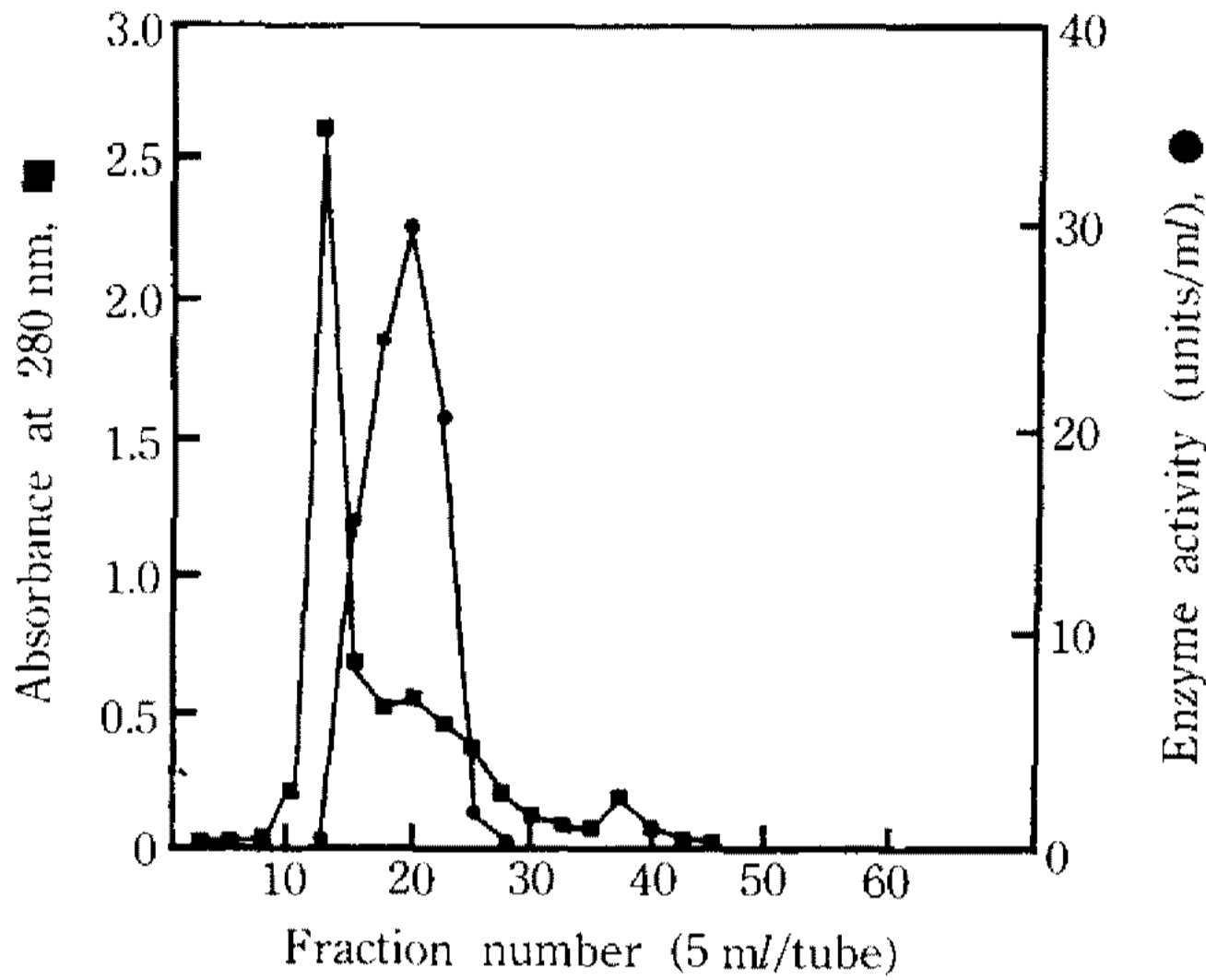


Fig. 3. Sephadex G-100 gel filtration pattern of α -glucosidase from *P. halophilus*.

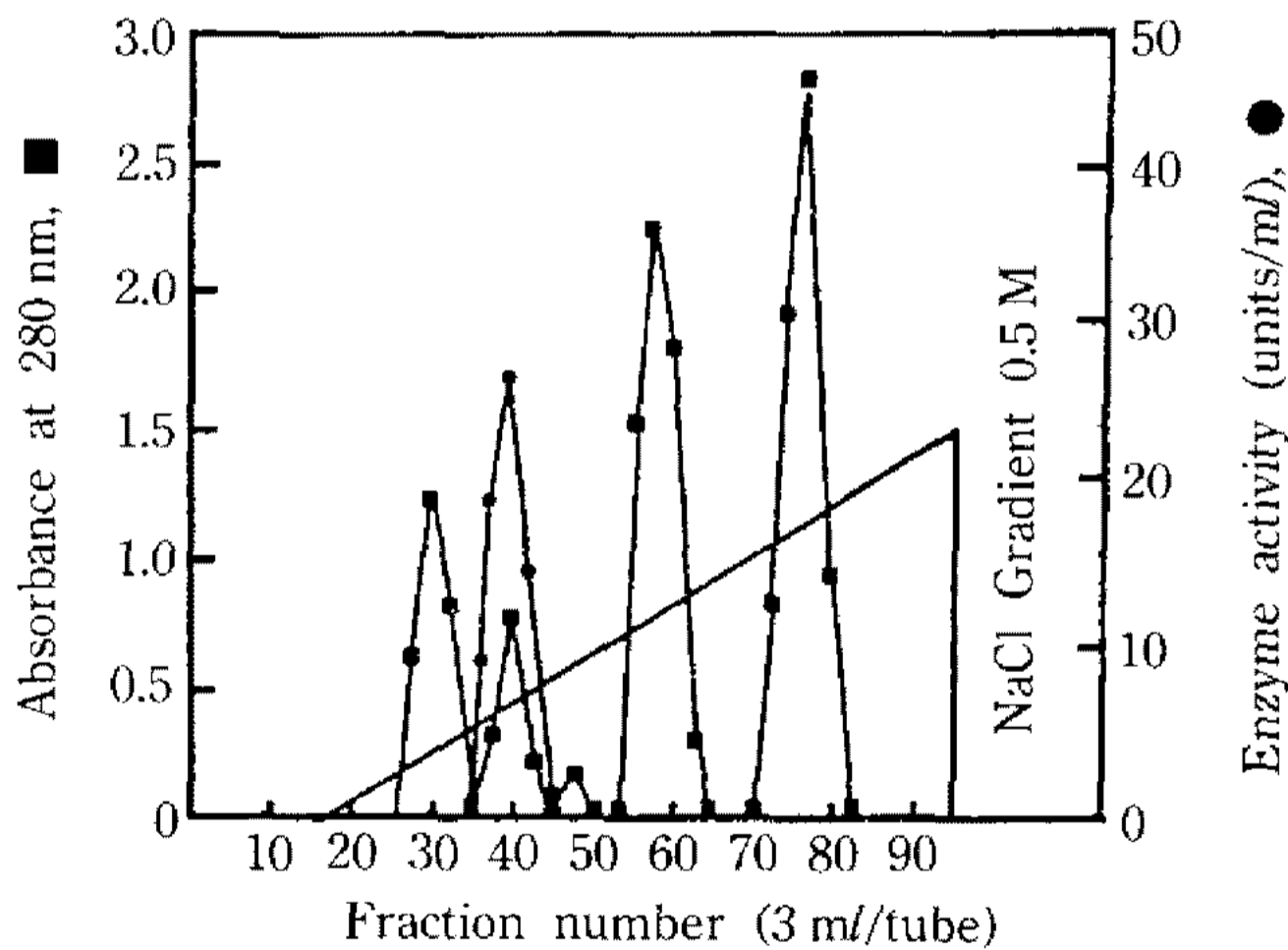


Fig. 4. DEAE-Sephadex A-50 ion exchange chromatography of α -glucosidase from *P. halophilus*.

효소의 특성

pH의 영향: pH 3.0~9.0 범위에서 각각의 완충용액으로 기질과 효소의 pH를 조절한 후 효소활성을 측정된 결과는 Fig. 6과 같다. Fig. 6에 나타난 바와 같이 pH 5.5와 6.5 사이에서 상대적으로 활성이 높게 나타났다. 이와같은 결과는 초고온성 세균인 *Pyrococ-*

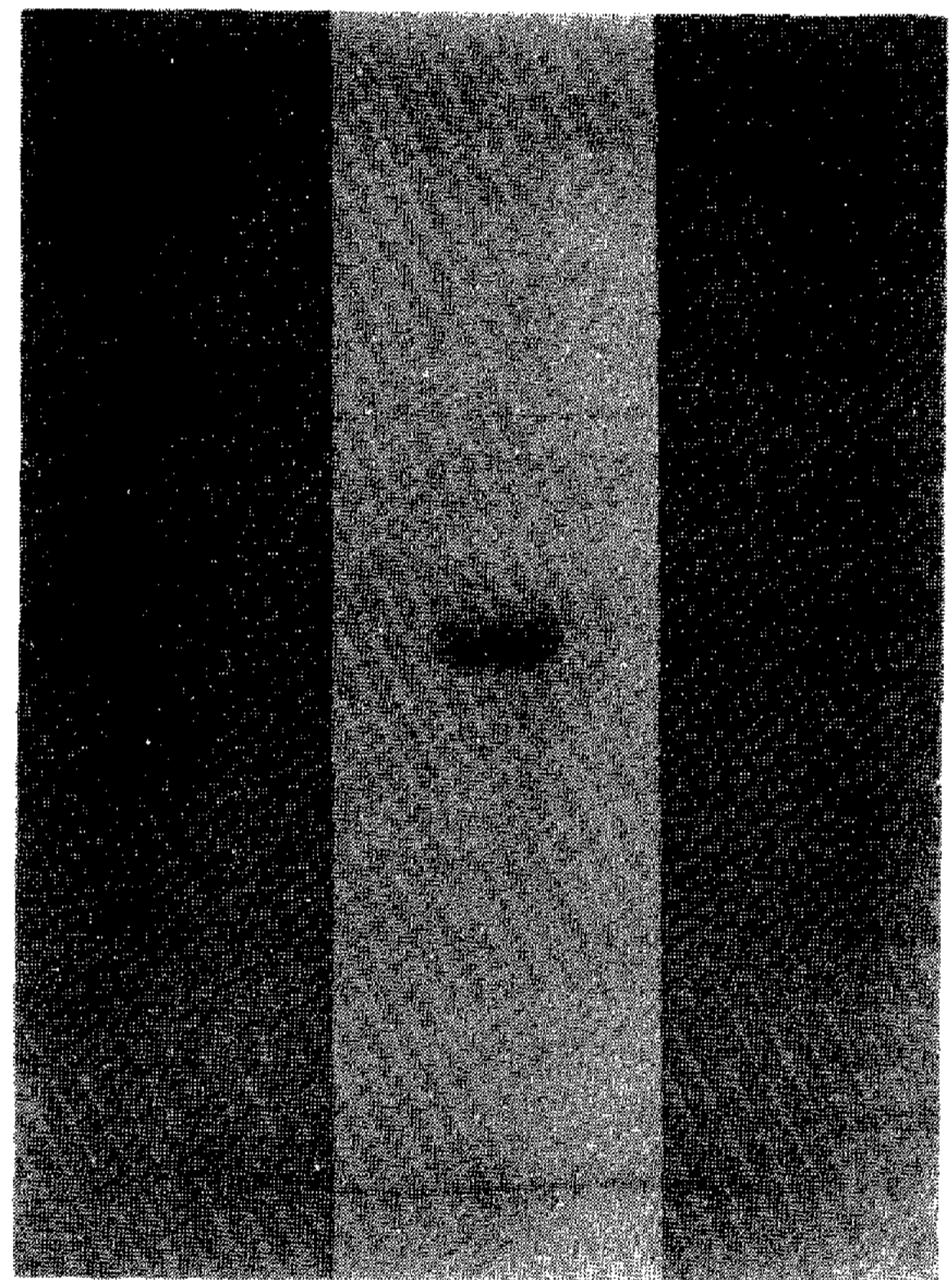


Fig. 5. Photography of purified α -glucosidase from *P. halophilus* on 7.5% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

Table 3. Summary of purification of α -glucosidase from *P. halophilus*

Procedure	Total activity(unit)	Total protein(mg)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)	Purification fold
Cell free extract	2751.01	134.19	20.50	100.00	1.00
Protamine sulfate	2649.14	105.71	25.06	96.29	1.22
Ammonium sulfate	2195.03	43.02	51.02	79.78	2.48
Sephadex G-100 gel filtration	1275.03	14.93	85.40	46.34	4.16
DEAE-Sephadex A-50 ion exchange chromatography	910.02	2.20	413.62	33.07	20.17

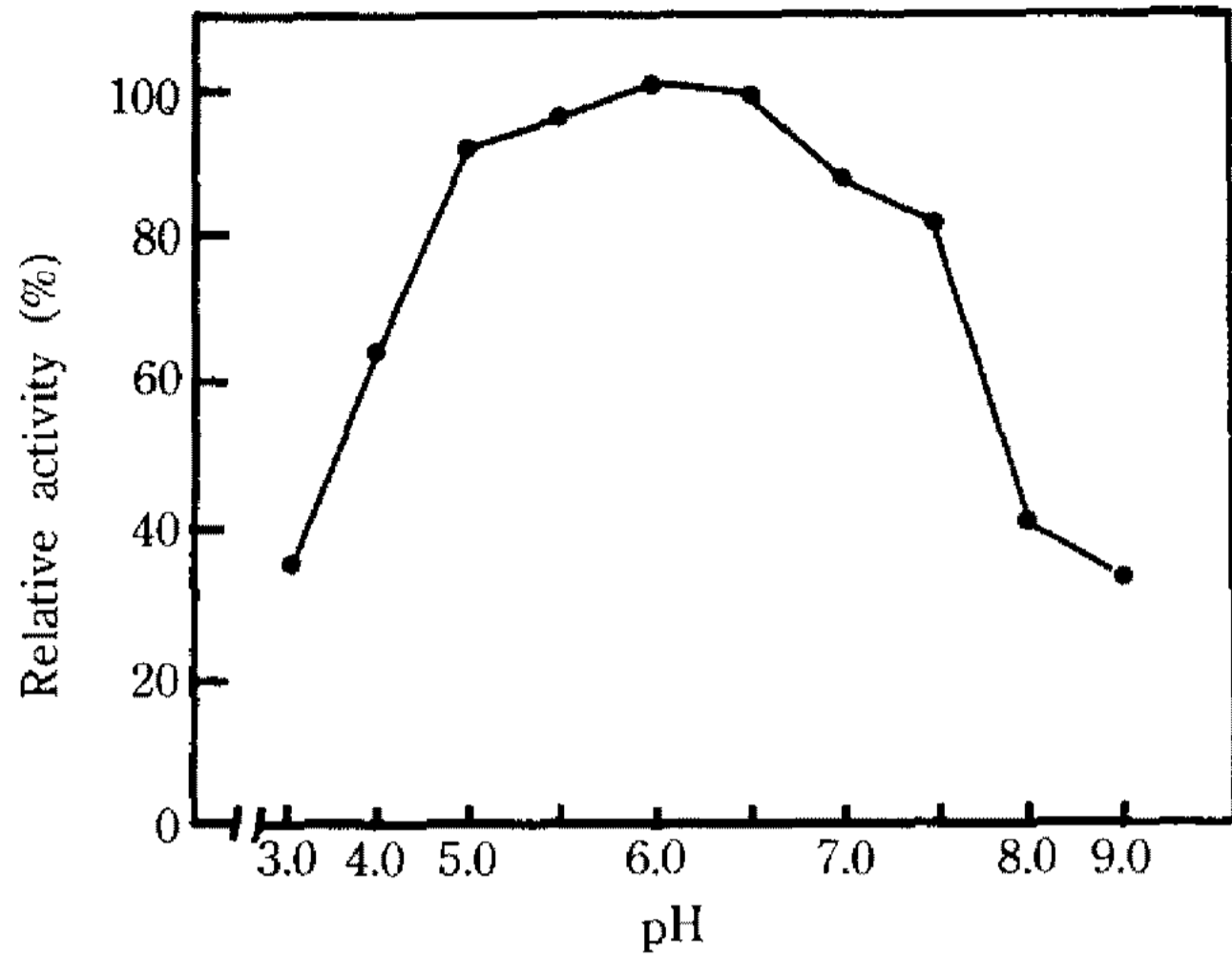


Fig. 6. Effect of pH on α -glucosidase activity of *P. halophilus*.

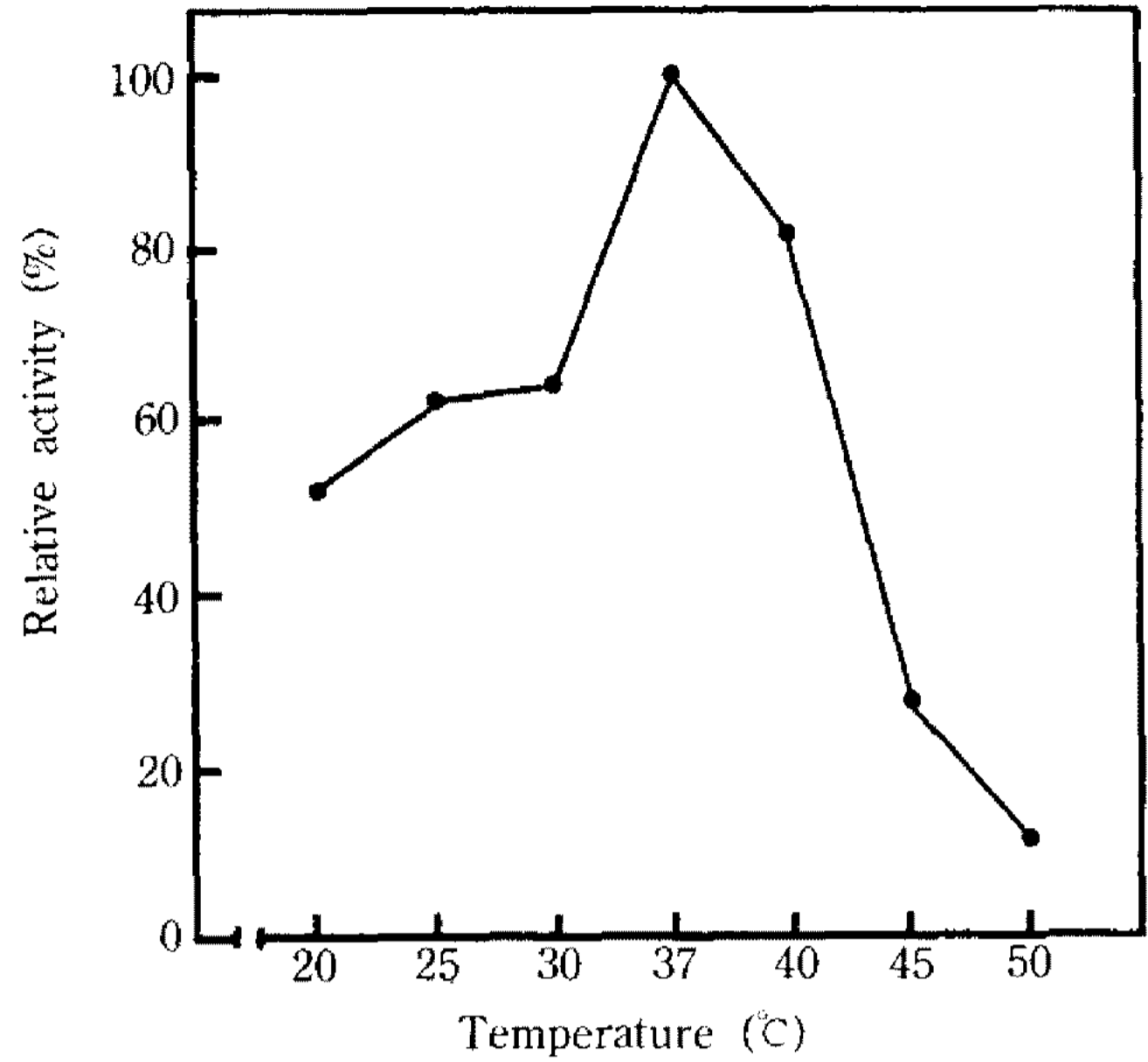


Fig. 8. Effect of temperature on α -glucosidase activity of *P. halophilus*.

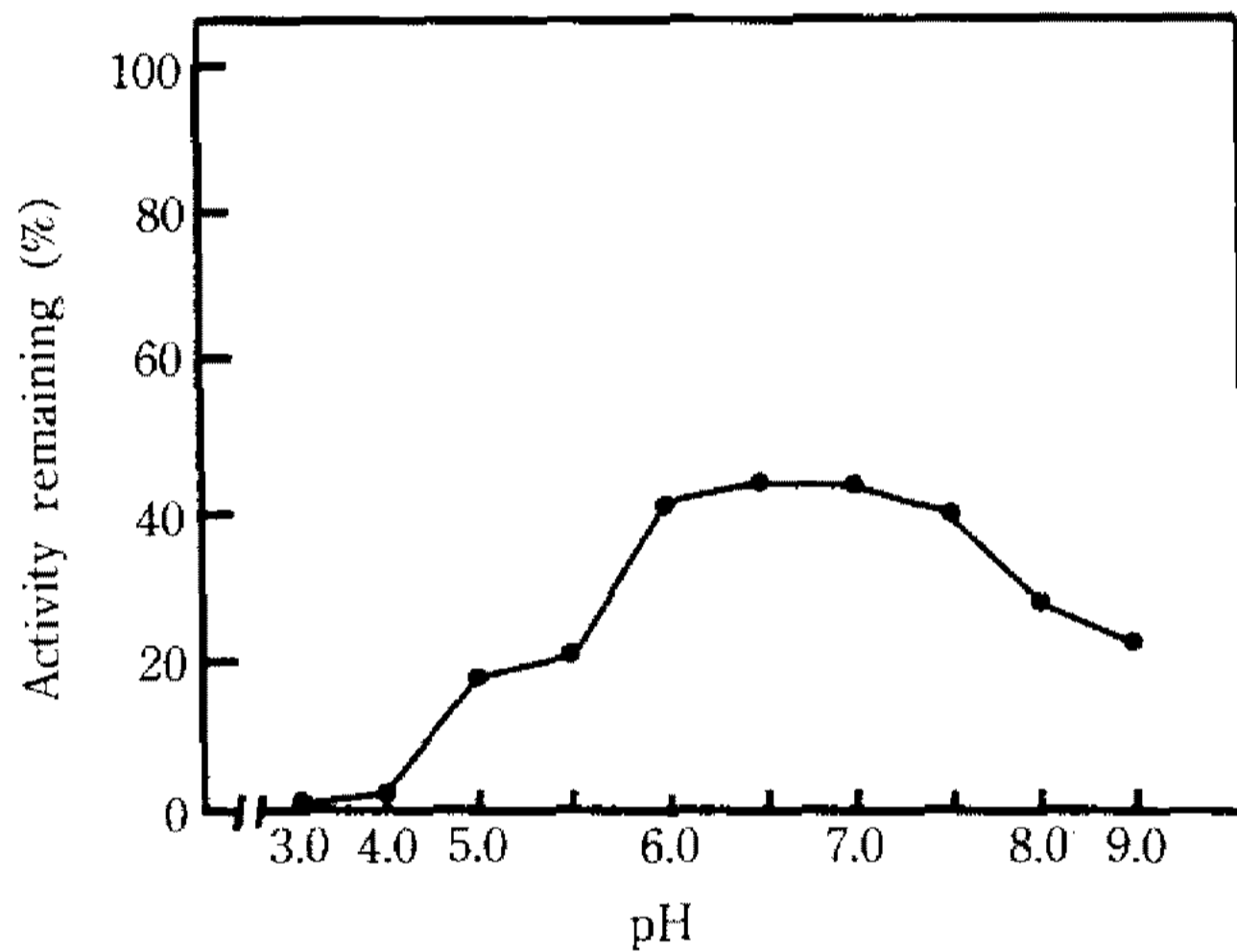


Fig. 7. Effect of pH on α -glucosidase stability of *P. halophilus*.

cus furiosus(8), *Bacillus circulans* F-2(5)에 의한 α -glucosidase의 최적 pH와 유사하였으나, *Aspergillus niger*(9)로부터 생성한 α -glucosidase의 최적 pH는 4.3으로 산성부근에서 최대 활성을 보였다. 또한 본 정제효소에 대한 각 pH에서 효소활성의 안정성을 조사하기 위하여 효소용액을 37°C에서 30분간 정치한 후 잔존하는 효소활성을 측정된 결과는 Fig. 7에서와 같이 pH 6.5와 7.5 사이에서 상대적으로 높게 나타났다.

온도의 영향 : 20~50°C범위에서 정제효소를 10분간 반응 후 효소활성을 측정된 결과 37°C에서 높은 활성을 나타냈으며(Fig. 8), 30°C이상의 온도에서 30분간 방치하면 효소의 활성이 급격히 떨어졌다(Fig. 9). *Aspergillus niger*의 α -glucosidase는 55°C까지는 안정성을 유지하였으나 70°C 이상부터는 활성이 급

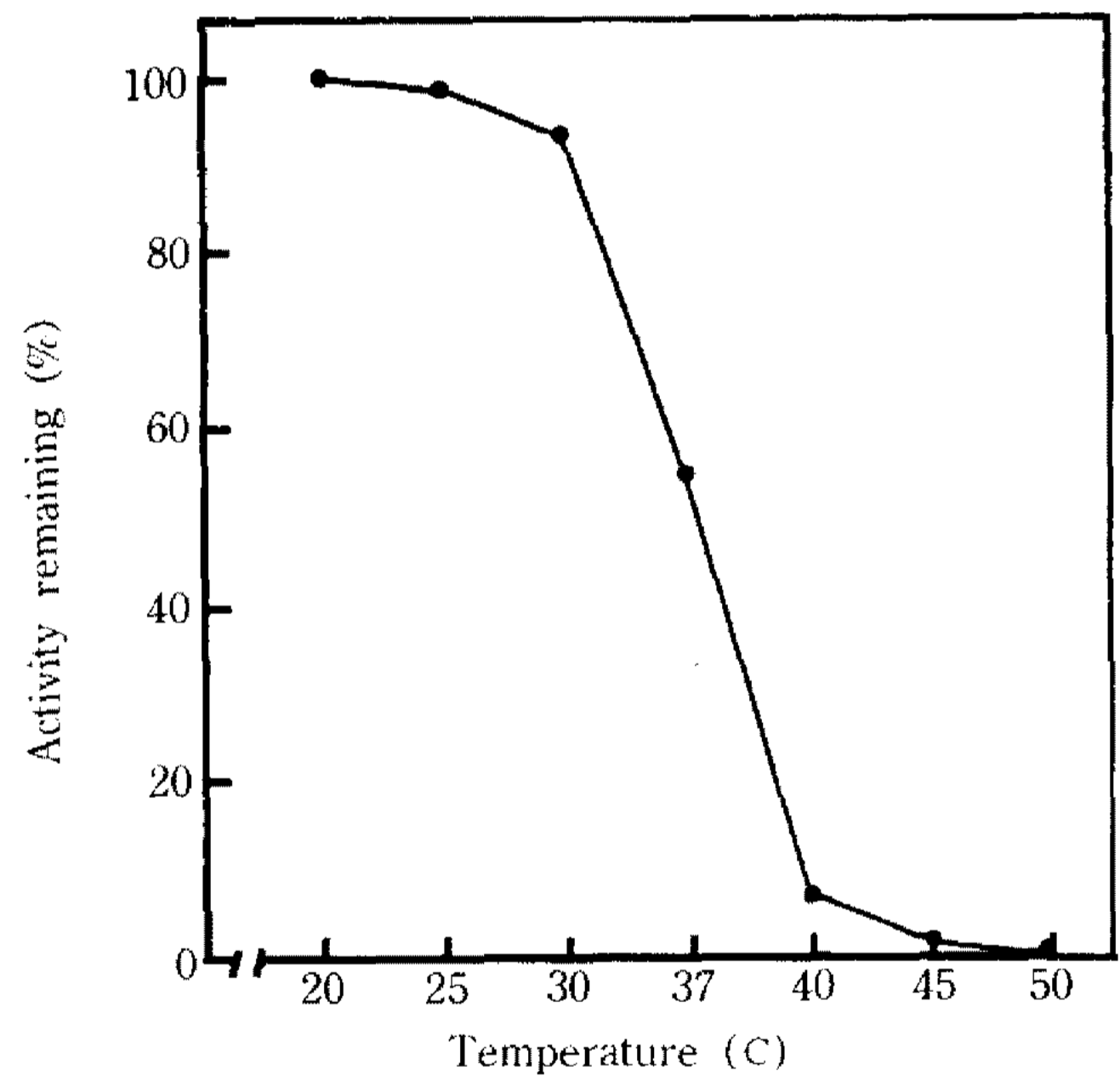


Fig. 9. Effect of temperature on α -glucosidase stability of *P. halophilus*.

격히 감소하였으나(9), 초고온성 세균인 *Pyrococcus furiosus*(8, 17), *Pyrococcus Brockii*(18)의 경우 최적 온도는 105~115°C이었다고 보고하였다. 그러나 본 실험 균주는 김치내의 중온성 유산균으로 인한 정제 효소에 대한 열 안정성이 비교적 약한 것으로 나타났다.

금속이온과 기타 저해제의 영향 : 효소활성에 미치는 금속이온들의 영향을 검토한 결과는 Table 4와 같다. 금속이온들중 Mg^{2+} 이온은 α -glucosidase 활

Table 4. Effects of various metal ions and inhibitors on the α -glucosidase activity

Reagents	Concentration (mM)	Relative activity (%)
No addition		100.00
LiCl	10.0	71.10
KCl	10.0	61.10
	1.0	98.20
NaCl	10.0	65.40
	1.0	95.70
CaCl ₂	10.0	62.30
FeCl ₂	10.0	70.10
MgCl ₂	10.0	107.40
CoCl ₂	10.0	52.10
MnCl ₂	10.0	70.80
ZnSO ₄	10.0	82.20
EDTA	10.0	57.90
Thiosulfate	10.0	67.70
2-Mercaptoethanol	10.0	51.60

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid.

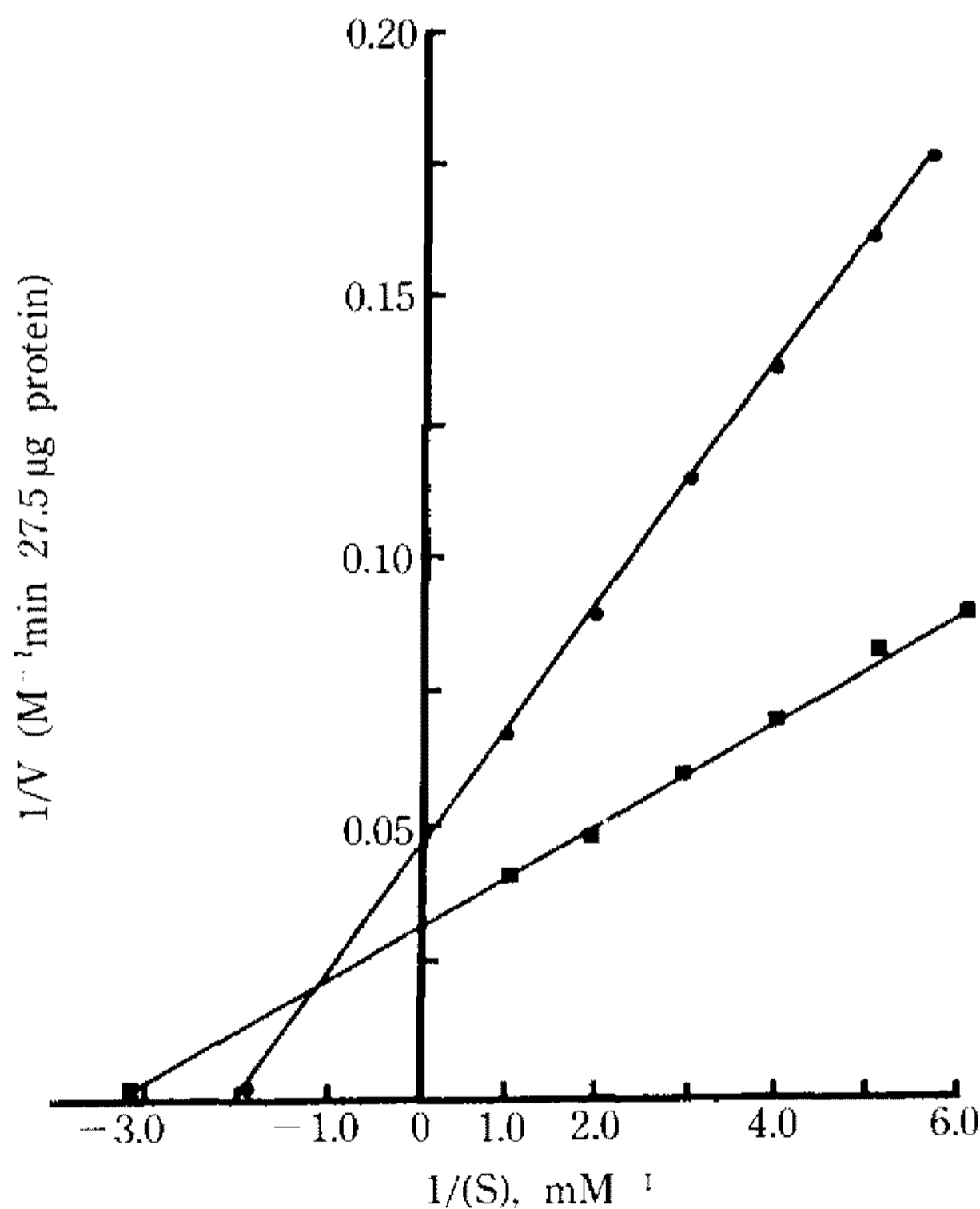


Fig. 10. Effect of substrate concentration on α -glucosidase activity from *P. halophilus*. PNPG, ●; Maltose, ■.

성을 촉진시킨 반면, 그 외의 금속이온에 대해서는 활성이 저해되었다. Sulfur를 함유한 용액에서는 50% 정도의 효소활성이 저해되었다. 또한 chelating agent인 EDTA에 의해 억제받은 것으로 보아 효소의 활성단에 금속이온이 존재하여 활성에 영향을 주는

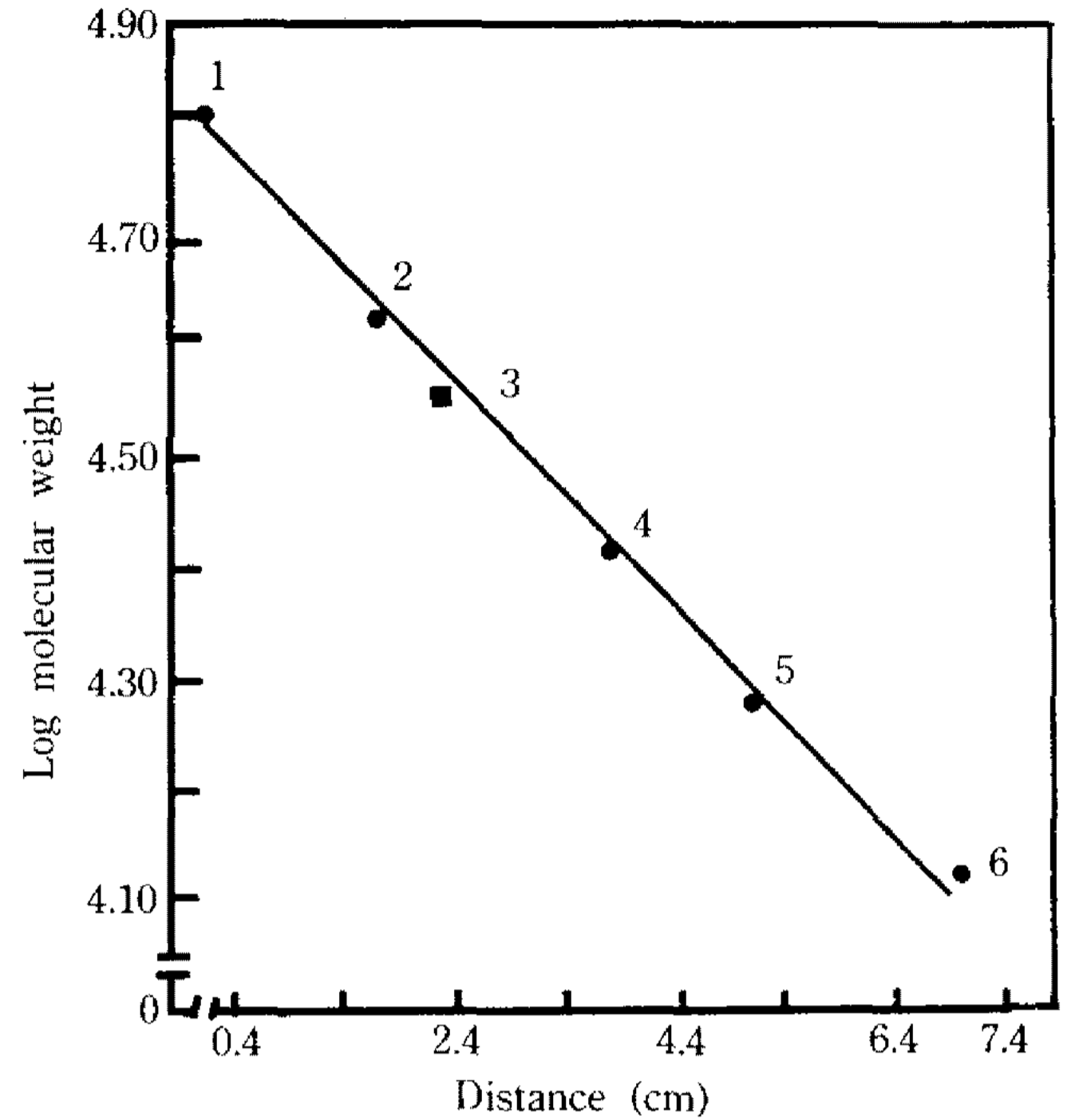


Fig. 11. Estimation of molecular weight of α -glucosidase by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

1, Albumin bovine (M.W. 66,000); 2, Albumin egg (M.W. 45,000); 3, Pepsin (M.W. 34,700); 4, Trypsinogen (M.W. 24,000); 5, Lactoglobulin (M.W. 18,400); 6, Lysozyme (M.W. 14,300); ■, *P. halophilus* α -glucosidase

metalloenzyme의 하나인 것으로 추정된다. 이러한 결과는 *Pyrococcus furiosus*(8), *Clostridium* sp.(19) 등과 같은 균주와 유사한 결과를 나타내었다.

기질 농도의 영향: 기질 농도에 따른 반응속도를 Lineweaver와 Burk(20) 방법으로 plot한 결과는 Fig. 10과 같으며, Lineweaver-Burk 방정식에 의하여 Michaelis-Menten 상수(K_m)와 최대 반응속도(V_{max})를 구하였다. 본 정제효소는 PNPG가 기질일 때 K_m 은 0.52 mM/27.5 μ g protein이고 V_{max} 는 0.021 mM/min 27.5 μ g protein이었으며, maltose를 기질로 했을 때 K_m =0.32 mM/27.5 μ g protein, V_{max} =0.025 mM/min 27.5 μ g protein이었다.

효소의 분자량

표준단백질을 이용하여 gel 여과로 측정된 native α -glucosidase의 분자량은 37,000 dalton 정도로 추정되었다(Fig. 11). Kita 등(9)은 *Aspergillus niger*가 생산하는 α -glucosidase 분자량이 약 125,000 dalton 이었다고 보고하였다. 따라서 본 균주에 의한 α -glucosidase의 분자량은 *Aspergillus niger*에 비해 비교적

작은 것으로 나타났다.

요 약

호화전분이 포함된 김치로부터 유산을 생성하는 6 균주를 분리하였으며, 분리된 균주는 soluble starch 가 포함된 APT 액체배지에서 분리균의 생육과 α -glucosidase 활력이 우수한 No. 2 균주를 선별하였다. 이 분리균은 *Pediococcus halophilus* 또는 그 유연균으로 동정되었다. 효소의 정제는 protamine sulfate에 의한 핵산의 제거, ammonium sulfate 분획, gel filtration 및 ion exchange 등의 4단계 정제과정을 거친 결과 20.17배 정제되어 단일 band 효소로 분리되었다. 정제효소의 최적 활성온도는 37°C, 최적 pH는 6.0이었고 금속이온과 저해제에 대한 효소의 활성은 Mg^{2+} 에 의해 촉진되는 반면, 10 mM mercaptoethanol과 EDTA 등에 의해 저해되었다. 합성기질인 PNPG에 대한 K_m 은 0.52 mM/27.5 μ g protein, V_{max} =0.021 mM/min 27.5 μ g protein이었으며, 효소의 분자량은 약 37,000이었다.

참고문헌

1. Barfoed, H.C. 1976. Enzymes in starch processing. *Cereal Foods World* **21**: 588-593.
2. Norman, B.E. 1979. The application of polysaccharide degrading enzymes in the starch industry. Pp. 339-376. Academic Press Inc., New York.
3. Solomo, B. 1978. Starch hydrolysis by immobilized enzymes industrial application, Vol. 10. Pp. 147-149. Springer-Verlag Press.
4. Pazur, J.H. and K. Kleppe. 1962. The hydrolysis of α -D-glucosidases by amyloglucosidase from *Aspergillus niger*. *J. Biol. Chem.* **237**: 1002-1006.
5. Sata, H., H. Taniguchi, and Y. Maruyama. 1987. Production of α -glucosidases and its role in regulation of amylase production by *Bacillus circulans* F-2. *Agric. Biol. Chem.* **51**: 3257-3280.
6. Suzuki, Y., T. Yuki, T. Kishigami, and S. Abe. 1976 Purification and properties of extracellular α -glucosidases of a thermophile, *Bacillus thermoglucosidus* KP 1006. *Biochem. Biophys. Acta.* **445**: 386-397.
7. Medi, E., G. Antranikian, K. Ohmiya, and G. Gottschalk. 1987. Thermostable amylolytic enzymes from a new *Clostridium* isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 1661-1667.
8. Costantino, H.R., S.H. Brown, and R.M. Kelly. 1990. Purification and characterization of an α -glucosidase from a hyperthermophilic Archae bacterium, *Pyrococcus furiosus*, exhibiting a temperature optimum of 105°C to 115°C. *J. Bacteriol.* **172**: 3654-3660.
9. Kita, A., H. Matsui, A. Somoto, A. Kimura, M. Takata, and S. Chiba. 1991. Substrate specificity and substrate affinities of crystalline α -glucosidase from *Aspergillus niger*. *Agric. Biol. Chem.* **55**: 2327-2335.
10. Evans, J.B. and C.F. Nivin, JR. 1951. Nutrition of the heterofermentation *Lactobacilli* that cause greening of cured meat product. *J. Bacteriol.* **62**: 599-603.
11. O'Verell, B.T. 1951. Displacement chromatography on ion exchange columns of the carboxylic acids in plant tissue extracts. *Nature* **167**: 361-362.
12. McDonald, S.C., R.F. McFecter, M.A. Paeschel, and H.P. Fleming. 1987. A differential medium for the enumeration of homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 1382-1384.
13. Sneath, P.H.A., N.S. Mair, M.E. Sharpe, and J.G. Holt. 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams & Wilkins, Vol. 2, 1075-1078.
14. Kleinman, M.J., A.E. Wilkinson, I.P. Wright, I. H. Evans, and E.A. Bevan. 1988. Purification and properties of an extracellular glucoamylase from a diastatic strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* **249**: 163-170.
15. Lowry, O.H., M.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
16. Hames, B.D. and D. Rickword. 1983. *Gel Electrophoresis of Nucleic Acids*. Pp. 12-18. 2nd ed. IRL Press, Oxford, Washington DC.
17. Aono, S., F.O. Bryant, and M.W.W. Adams. 1989. A novel and remarkable thermostable ferredoxin from the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. *J. Bacteriol.* **171**: 3433-3493.
18. Pihl, T.D., R.N. Schicho, R.M. Kelly, and R.J. Maier. 1989. Characterization of hydrogen uptake activity in the hyperthermophile *Pyrococcus brockii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 138-141.
19. Antranikian, G., C. Herzberg, and G. Gottschalk. 1987. Production of thermostable α -amylase, pullanase, and α -glucosidase in continuous culture by a new *Clostridium* isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 1668-1673.
20. Lineweaver, H. and D. Burk. 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Amer. Chem. Soc.* **56**: 658-666.

(Received November 18, 1991)