

Micrococcus sp. LL3가 생성하는 intracellular aminopeptidase의 특성 및 정제

이시경 · 주현규*

두산기술원, *건국대학교

초록 : 본 연구에서는 Cheddar 치즈의 숙성기간을 단축시키고 flavor를 증진시키기 위하여 *Micrococcus* sp. LL3를 치즈 제조시에 첨가할 목적으로 본 균주가 생성하는 aminopeptidase의 특성을 조사하였으며, 또한 본 효소를 정제하였다. L-Leucine-*p*-nitroanilide를 기질로 사용하였을 때 본 효소의 최적온도와 pH는 각각 30°C 및 7.0이었다. 본 효소는 50°C 까지의 온도에서 10분간 방치하였을 경우에도 안정하였다. Mg⁺⁺ ion에 의해 본 효소의 활성이 촉진되었으나 Hg⁺⁺ ion과 EDTA나 1,10-phenanthroline에 의해서 효소활성이 거의 실패되어 metallopeptidase인 것으로 추정되었다. 본 효소의 기질 특이성은 광범위 하였으나, N-terminal amino acid로서 arginine를 함유한 peptide는 분해하지 못했다. 본 균주가 생성하는 aminopeptidase의 정제를 위하여 DEAE-Sephacel ion chromatography 및 gel filtration을 실시하였으며, 이때 분자량 46,500의 효소를 얻을 수 있었다(1993년 11월 12일 접수, 1993년 12월 2일 수리).

서 론

치즈의 숙성과정은 잘 제어된 조건하에서 이루어져야 좋은 결과를 얻을 수 있기 때문에 이러한 저장단계는 자본 집약적인 치즈산업에 있어 운영비의 상승을 초래한다. 숙성과정중 단백질, 지방, 탄수화물의 분해가 이루어진다. 특히 단백질분해(proteolysis)는 치즈의 숙성과정에 있어 매우 중요하며 이는 치즈의 microflora, milk protease와 첨가된 rennet 등에 의해 이루어진다. 숙성기간을 단축시키려는 시도가 여러 연구자들에 의해 보고되었다.^{1,2)}

그러나 지금까지의 숙성 치즈숙성에 관한 연구에서는 주로 starter로서 이용되는 *Streptococci*나 non-starter bacteria 중 *Lactobacilli*가 생성하는 protease와 aminopeptidase를 중심으로 이루어져 치즈제조에 응용되었다.³⁾

*Micrococci*는 체다치즈의 major secondary microflora로 존재하며,⁴⁾ 분류학적으로는 *Micrococcaceae* family에 속하는 그람 양성 non-starter non-lactic acid bacteria이다. Feagan 등⁵⁾은 *Micrococci*가 Cheddar cheese의 non-starter population중 16~68%를 차지한다고 보고하였다.

*Micrococci*는 저온 살균에서도 살아남을 수 있어 pas-

teurized milk에도 존재하며, cheese 제조시 이의 첨가에 의해 Cheddar cheese의 flavor를 증가시켰다는 보고가 있다.⁶⁾ *Micrococci*에 의한 cheese flavor 증진효과는 이 균이 갖고 있는 proteolytic, lipolytic activity에 기인하는 것으로 알려져있다.⁷⁾ 또한 intracellular proteinase, endopeptidase, aminopeptidase, dipeptidase 등의 효소가 여러 *Micrococcus* sp.에 존재하는 것으로 최근 보고되었다.⁸⁾ peptidase는 casein으로부터 분해된 large peptide 성분을 저분자의 peptide(low molecular weight peptide)와 아미노산으로 분해하여 치즈 flavor 형성에 기여한다. 따라서 본 연구에서는 *Micrococcus* sp. LL3균주가 생성하는 intracellular aminopeptidase의 효소적 특성을 연구하여 치즈제조에 adjunct로서의 가능성을 조사하였다.

재료 및 방법

사용 균주

미국 University of Wisconsin-Madison, Department of Food Science에서 제공받은 *Micrococcus* sp. LL3균주를 사용하였다.

사용 배지 및 배양

균 성장 배지는 glucose 0.2%, tryptone 1%, yeast ext-

ract 0.2%, glutamic acid 0.2%, MgSO₄ 0.05%, NaCl 1% (pH 7.0)의 배지조성으로 배양액을 제조후 121°C 에서 15 분간 가압 멸균하였다. 그후 종균 1%(v/v)를 접종하여 30°C 에서 24시간 진탕 배양(120 rpm)하였다.

Cell free extract조제

24시간 배양된 배양액을 0.01 M phosphate buffer(pH 7.0)로 2회 세척 원심 분리한 균체를 세포분해용 alumina를 첨가하여 분쇄하였다. 그후 0.01 M phosphate buffer(pH 7.0)를 처음 배양액의 10% 가하고 냉장 원심 분리하여 상등액을 cell free extract 효소액으로 사용하였다.

Aminopeptidase activity 측정

Soda 등⁹⁾의 방법을 변형하여 측정하였다. Leucine-*p*-nitroanilide(LNA)를 기질로하여 35°C water bath상에서 20분간 반응시킨 후 410 nm에서의 흡광도를 측정하였다. specific activity는 1분간에 효소 단백질 1 mg에 의한 흡광도 0.01의 증가로 하였다.

Protein determination

Cell free extract의 단백질양은 Biuret법으로 정량하였으며, bovine serum albumin을 표준물질로 사용하였다.

Ion exchange chromatography

24시간 배양된 균체로부터 얻어진 cell free extract를 0.01 M Tris buffer(pH 7.5)로 미리 평형시킨 DEAE(Diethylaminoethyl)-Sephacel수지 컬럼(2.6×100 CM)에 흡착 시켰으며, 0~0.5 M NaCl gradient Tris buffer(pH 7.5)을 이용하여 35 ml/hr의 유속으로 통과시켜 효소 단백질을 용출시키면서 tube당 4.0 ml씩 분획하였다.

Gel permeation chromatography

DEAE-Sephacel chromatography에서 수집된 효소활성이 있는 부분을 freeze dry시켜 농축시킨 후 Tris buffer(pH 7.5)로 평형을 이룬 Sephacryl S-300(2.6×60 CM) 컬럼을 이용하여 35 ml/hr의 유속으로 gel filtration을 행하여 효소활성이 있는 부분을 수집하였다. 같은 방법으로 2차 gel filtration을 실시 하였다.

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

각 분리 단계에서 얻어진 효소활성이 있는 부분의 용액 0.2 ml를 취하여 7% SDS용액 0.2 ml와 protein solvent 0.2 ml를 가한 후 mercaptoethanol 100 µl를 가하여 수조상에서 5분간 중탕 하였다. 그후 실온에서 냉각시켜

0.1% bromophenol blue dye용액 0.4 ml를 가한 후 Phast-System 기기를 사용하여 전기영동을 행하였다.

분자량 측정

효소단백질의 분자량을 측정하기 위하여 SDS-PAGE 를 사용하였다. 사용된 molecular weight marker로는 phosphorylase b(MW 94,000), BSA(MW 62,000), ovalbumin(MW 43,000), carbonic anhydrase(MW 30,000), trypsin inhibitor(MW 20,100), α-lactalbumin(MW 14,400)을 각각 사용하여 이동도(R_f value)에 대한 분자량과의 관계로부터 분자량을 산출하였다.

결과 및 고찰

효소 반응시간에 따른 기질의 분해

각 온도에서 반응시간에 따른 효소활성을 측정한 결과 Fig. 1에서와 같이 35°C 에서 기질의 분해속도가 가장 높았으며, 또한 반응 30분까지 직선적(linear)인 반응을 보였다.

45°C 에서도 같은 결과였다. 그러나 반응 온도가 높아짐에 따라 효소활성이 낮아졌으며, 특히 60°C 에서 반응시켰을 경우 반응 15분까지는 직선적인 반응을 보였으나 20분 이후에는 더 이상의 기질의 분해가 없는 비직선적(non-linear)인 반응을 나타내었다. 이는 높은 온도에서 효소가 불활성화되기 때문이라고 생각된다.

효소의 최적 pH 및 pH안정성

Micrococcus sp. LL3균주가 생성하는 aminopeptidase

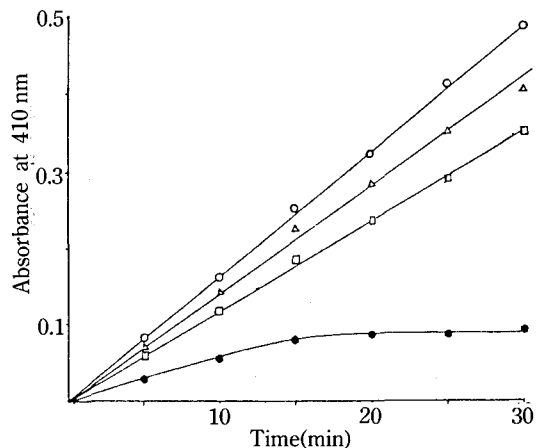


Fig. 1. Rate of hydrolysis of leu-*p*-na by aminopeptidase at various temperatures. ○-○: 35°C, △-△: 45°C, □-□: 50°C, ●-●: 60°C.

의 최적 작용 pH를 조사한 결과 Fig. 2에서와 같이 본 효소는 pH 7.0에서 가장 높은 효소활성을 나타 내었으며, pH 6.0과 pH 8.0에서도 90% 이상의 높은 효소활성을 나타내었다. 그러나 pH 4.0과 pH 10.0의 용액에서 반응시켰을 경우 효소활성이 급격히 저하되었다. 한편 각 pH의 buffer용액으로 추출한 조효소액을 25°C에서 각각 1시간과 10시간 동안 방치한 후 이를 효소용액으로 하여 잔여 효소활성을 측정 한 결과는 Fig. 3과 같다. pH 7.0에서 1시간 방치 후의 효소활성은 거의 변화가 없었으며, pH 6.0과 pH 8.0에서도 높은 효소활성을 나타내었다. 그러나 pH 9.0에서의 잔여 효소활성은 현저히 감소하였고, 10시간 방치하였을 경우에도 유사한 결과였다.

Soda의 *L. plantarum*¹⁰⁾ 및 *L. casei*¹¹⁾를 이용한 실험에서 이들균주가 생성하는 aminopeptidase의 최적 pH는 각각 7.0과 6.5이었다고 하여 본 균주가 생성하는 효소의

최적 pH와 거의 유사하였다. 또한 Meyer¹²⁾ 등도 *L. lactis*가 생성하는 aminopeptidase의 경우 최적 pH가 7.0이었으나, *Str. thermophilus*의 효소는 6.5~8.2로서 비교적 넓은범위의 최적 pH를 갖고 있었다고 보고하였다. 그의 *L. lactis*¹³⁾와 *B. sterothermophilus*¹⁴⁾가 생성하는 aminopeptidase의 pH가 각각 6.2~7.2 및 7.5~8.0인 것으로 보고되어, 지금까지 보고된 세균에 의해 생성되는 aminopeptidase의 최적 pH 범위는 6.2~8.2임을 알 수 있었다.

효소의 최적 반응온도 및 열 안정성

효소활성의 최적반응 온도를 알아보기 위하여 10~70°C까지 각 온도별로 효소 활성을 측정 한 결과 Fig. 4에

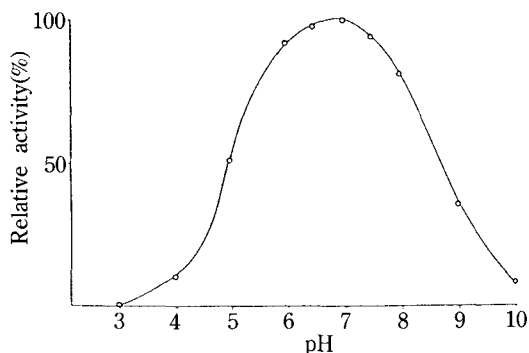


Fig. 2. Effect of pH levels on the aminopeptidase activity. pH 3~5, 0.01 M acetate buffer; pH 6~8, 0.01 M phosphate buffer; pH 9~10, 0.01 M borate buffer.

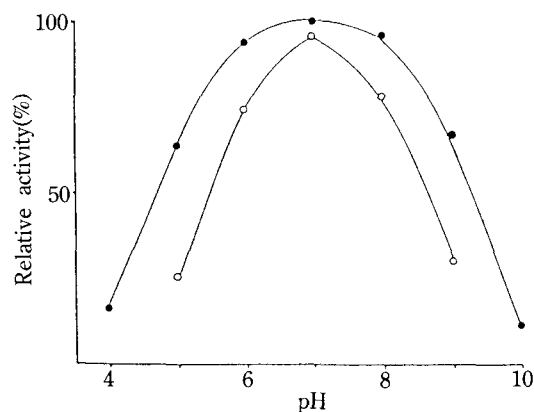


Fig. 3. pH stability of aminopeptidase from *Micrococcus* sp. LL3. The reaction was carried out at 35°C for 20 min after 1 hr (●-●) and 10 hours (○-○) at various pHs.

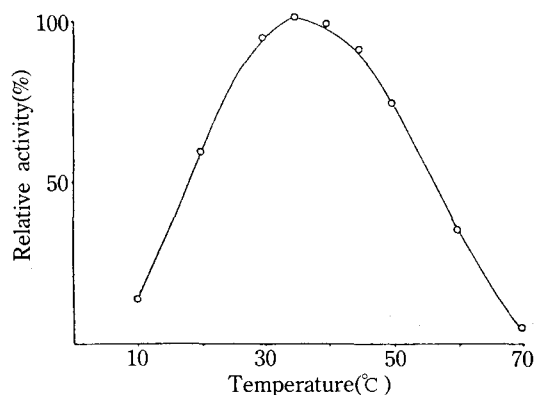


Fig. 4. Effect of temperature on aminopeptidase activity.

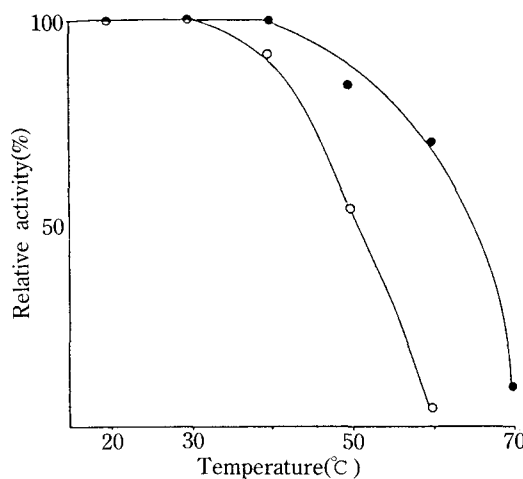


Fig. 5. Temperature stability of aminopeptidase from *Micrococcus* sp. LL3. The reaction was carried out at 35°C for 20 min after preincubation at various temperatures for 10 min (●-●) and 30 min (○-○).

서와 같이 본 효소의 최적온도는 35°C 이었으며, 40°C 에서도 매우 안정된 효소 반응을 나타내었다. 한편 본 효소의 열 안정성을 조사하기 위하여 효소액을 각 온도에서 10분 또는 30분간 방치 후 잔여 효소활성을 측정 한 결과 40°C 까지의 온도에서는 10분간 방치 후에도 효소활성의 변화가 없었으나 70°C 에서는 단지 10%의 잔여 효소 활성만을 나타내었다(Fig. 5).

Bhowmik¹⁵⁾ 등은 *M. freudenreichii* 407의 aminopeptidase 최적 반응 온도가 37°C 이었다고 보고하여 본 실험과 유사한 결과를 나타내었으나 *L. casei* 균주¹¹⁾가 생성하는 aminopeptidase의 최적 반응온도는 45°C 로 보고되었으며, Mou 등¹⁶⁾과 Exterkate 등¹⁷⁾은 *Streptococcus*속의 aminopeptidase 최적온도는 30°C 및 50~ 55°C 이었다고 하여 같은 종간에 차이가 심함을 알 수 있었다.

한편 열 안정성에 관하여는 Desmazeaud 등¹⁸⁾이 *Str. diacetylactis* 균주의 aminopeptidase를 40°C 에서 30분간 열처리시 효소활성의 변화가 없었으나, 50°C 에서 10분간 열처리시에는 단지 10% 미만의 활성이 있었다고 하였다. 그러나 80°C 에서 15시간 방치 후에도 매우 안정된 aminopeptidase¹⁴⁾가 보고되어 있어 생산균주에 따라 열에 대한 안정성이 매우 다양함을 알 수 있었으며, 이는 균주의 내열성과 관계가 있는 것으로 생각된다.

기질 특이성

여러 종류의 peptide기질에 대한 본 균주가 생성하는 aminopeptidase의 기질 특이성을 조사한 결과는 Table 1과 같다. 본 효소는 peptide에 대한 광범위한 기질 특이성이 있는 것으로 나타났으며, 특히 N-terminal 아미노산으로서 lysine을 갖고있는 peptide에 대한 특이성이 매우 높아, leu-p-na의 기질 분해시 보다 4.3배의 높은

기질 분해성을 나타내었다. 반면 N-terminal 아미노산으로서 arginine을 갖는 기질은 전혀 분해하지 못하였으며, 또한 dipeptide에 대하여는 mono-peptide분해시 보다 특이성이 낮았다. 기질 특이성에 관하여 Eggiman 등¹³⁾은 *L. lactis*의 aminopeptidase는 lysine-4n에 대한 분해를 100으로 하였을 때 leu-4-an에 대하여는 13%만을 분해할 수 있었다고 하였다.

그러나 Soda 등⁹⁾은 다양한 *Lactobacillus*균주가 생성하는 aminopeptidase의 기질 특이성에 관한 연구에서 *L. helveticus* 및 *L. acidophilus*균주의 aminopeptidase는 사용된 기질중 leu-p-na를 가장 많이 분해한 반면, ala-p-na를 적게 분해하였고, *L. bulgaricus*가 생성하는 aminopeptidase는 ala-p-na를 가장 많이 분해하였으나, lysine-p-na를 적게 분해하여 같은 *Lactobacillus*균주 사이에서도 기질 선호에 대한 차이가 큼을 보고 하였다. 이들의 실험에서 대체로 *Lactobacillus*균주가 생성하는 aminopeptidase는 N-terminal 아미노기로서 lysine보다는 leucine기를 갖는 peptide를 선호하는 것을 알 수 있었다.

그러나 *L. bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. casei* 등 모두 lysine aminopeptidase의 활성이 다른 기질보다 높았으며,¹⁹⁾ *M. freudenreichii*균주가 생성하는 aminopeptidase¹⁵⁾도 lysine-p-na에 대한 기질 분해가 leu-p-na보다 4배나 더 분해한 것으로 나타나 본 균주가 생성하는 aminopeptidase와 유사한 결과였다.

NaCl농도에 의한 영향

0.01 M phosphate buffer(pH 7.0)와 0.01M acetate buffer(pH 5.0)에 NaCl의 농도를 달리하여 용해시킨 후

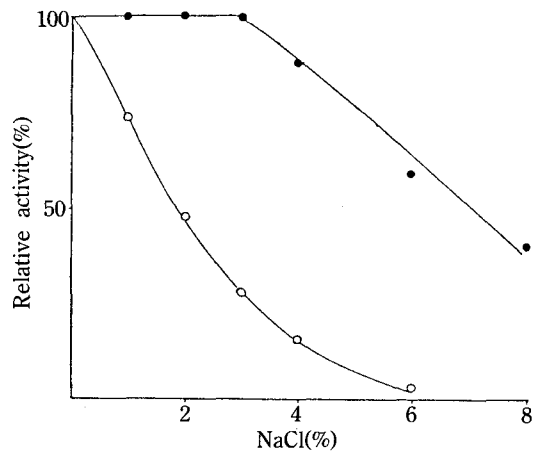


Fig. 6. Effect of NaCl concentration on aminopeptidase activity. ●-●, reaction pH 7.0; ○-○, reaction pH 5.0.

Table 1. Substrate specificity of aminopeptidase

Substrate	enzyme activity (U/ml)	relative activity (%)
Leu-p-NA	19.0	100
Lys-p-NA	81.0	426
Ala-p-NA	24.3	128
Met-p-NA	31.9	168
Glu-p-NA	24.9	131
Arg-p-NA	0	0
Pro-p-NA	16.9	89
Ala-Ala-p-NA	17.7	93
Gly-Pro-p-NA	15.6	82
Glu-Phe-p-NA	12.9	68
Suc-Phe-p-NA	6.5	34

NaCl의 농도가 효소활성에 미치는 영향을 조사하였다. Fig. 6에서와 같이 pH 7.0의 영역에서는 NaCl농도 3%까지 효소활성의 감소가 거의 없었으며, NaCl농도 6%와 8%에서는 각각 최대 효소활성의 59% 및 40%의 효소활성을 나타내었다.

그러나 pH 5.0의 영역에서는 NaCl 농도 2%에서 NaCl을 첨가하지 않은 효소 반응에 비해 48%의 효소활성을 보였으며, NaCl 6% 첨가시에는 효소 활성이 거의 없어 pH 7.0의 용액에서 보다 NaCl 농도에 의한 효소활성의 저해가 심한 것으로 나타났다. 이는 ionic strength의 변화가 효소 단백질의 활성 부위(active site)에 영향을 준 것으로 생각된다.

이상의 결과는 *Asp. oryzae*의 leucine aminopeptidase²⁰⁾가 NaCl 농도 20%에서도 효소활성이 거의 영향을 받지 않았다는 보고와 큰 차이가 있었다. 그러나 *M. freudenreichii* 407균주가 생성하는 aminopeptidase¹⁵⁾의 경우 NaCl 농도 2.5%까지는 효소활성이 감소하지 않았으며, NaCl 5%의 농도에서도 60% 이상의 상대 효소활성이

나타났으며 또한 NaCl농도 5% 용액에서 반응시, 반응 pH 5.0에서보다도 반응 pH 6.5에서 효소활성의 감소가 적어 본 실험의 결과와 유사한 경향이였다.

금속염에 의한 영향

금속이온이 본 효소의 활성에 미치는 영향을 조사한 결과 Table 2에서와 같이 CaCl₂와 MgCl₂ 1.0 mM의 농도에서 효소활성이 다소 증가하였으나, CoCl₂는 어느 농도에서도 효소활성에 영향을 미치지 않았다. 한편 Zn⁺⁺, Cu⁺⁺, Fe⁺⁺이온은 효소활성을 저해 하였으며, 특히 Hg⁺⁺이온을 첨가하였을 경우 효소활성이 나타나지 않았다. Hg⁺⁺이온은 단백질의 sulfhydryl기(-SH기)에 작용하며, 또한 단백질을 cross link시키므로서 불활성화된 dimer형태로 변형시키기도 한다는 사실을 감안할 때 본 효소는 -SH 효소일 것으로 추정되었다.

Eggiman 등¹³⁾의 *L. lactis*가 생성하는 aminopeptidase에 관한 연구에서는 Zn⁺⁺, Co⁺⁺이온 1 mM 농도 첨가에 의해 효소활성이 140~150% 증가되었으며 Mn⁺⁺, Mg⁺⁺, Ca⁺⁺이온은 1 mM 농도 첨가시까지도 효소활성에 영향을 주지 않았다고 하여 본 실험의 결과와 다소

Table 2. Effect of metal ion on enzyme activity

metal ion	concentration (mM)	enzyme activity (U/ml)	relative activity (%)
none	-	19.0	100
CaCl ₂	0.1	21.1	111
	1.0	28.0	147
	10	26.8	141
MgCl ₂	0.1	19.4	102
	1.0	23.0	121
	10	22.4	118
MnCl ₂	0.1	19.4	102
	1.0	22.6	119
	10	21.9	115
CoCl ₂	0.1	19.1	100
	1.0	19.6	103
	10	19.0	100
ZnCl ₂	0.1	16.6	87
	1.0	16.0	84
	10	13.5	71
CuCl ₂	0.1	13.7	72
	1.0	13.1	69
	10	9.9	52
FeCl ₂	0.1	12.9	68
	1.0	8.8	46
	10	5.7	30
HgCl ₂	0.1	1.2	6
	1.0	0.4	2
	10	0	0

Table 3. Effect of some chemicals on enzyme activity

chemicals	concentration (mM)	enzyme activity (U/ml)	relative activity (%)
none	-	19.0	100
EDTA	0.1	2.3	12
	0.5	0	0
	1.0	0	0
1,10-phenanthroline	0.1	8.2	43
	0.5	7.4	39
	1.0	3.6	19
PMSF	0.1	18.6	98
	0.5	18.5	97
	1.0	17.5	92
	1.0	17.5	92
phenylglyoxal	0.1	17.9	94
	0.5	17.5	92
	1.0	16.9	89
Iodoacetate	0.1	13.5	71
	0.5	12.0	63
	1.0	9.6	50
<i>p</i> -CMB	0.1	7.8	41
	0.5	6.7	35
	1.0	5.3	28

EDTA, Ethylenediaminetetraacetic acid; PMSF, Phenylmethyl sulfonyl fluoride; *p*-CMB, *p*-Chloromercuribenzoate.

상이한 결과였다.

반면 이들의 실험에서 Cu^{++} , Hg^{++} 이온은 0.1~1 mM농도에서 효소활성에 심한 저해 효과를 나타내었다. 그러나 *M. freudenreichii* 균주¹⁵⁾ 생성하는 aminopeptidase 경우는 $CaCl_2$ 2.5 mM 첨가시 효소활성이 1.5배 증가한 반면, Zn^{++} , Mn^{++} 이온은 단지 0.1 mM 첨가시에도 저해 효과가 있는 것으로 보고되어 본 실험의 결과와 유사한 경향이였다.

저해제의 영향

Micrococcus sp. LL3균주가 생성하는 aminopeptidase 효소에 미치는 저해제의 영향에 관한 실험에서 Table 3에서와 같이 사용된 저해제중 EDTA에 의한 저해가 가장 심한 것으로 나타났다. 또한 methionine, histidine, cystein, tyrosine 등을 alkylation 시킴으로서 단백질질을 수식하는 iodoacetate의 영향에서도 1 mM 처리시 50%의

저해를 보였으며, -SH기를 특이적으로 저해하는 *p*-CMB를 1.0 mM 첨가시 72%의 효소활성을 잃은 것으로 나타나, 본 효소의 활성 중심(active site)이나 부위에 cystein이 작용할 가능성을 나타낸 것으로 생각된다.

한편 arginine의 guanidyl기에 작용하여 효소활성을 변화시키는 것으로 알려진 phenylglyoxal 1mM 첨가시에는 89%의 효소활성을 나타내었으며, serine의 특이적 저해제인 PMSF에 의해서는 1mM의 높은 농도를 첨가시에도 92%의 높은 효소활성을 유지하고 있어 이들 저해제에 의해서는 심한 영향을 받지않은 것으로 나타나 본 효소의 활성 중심에 serine이 관여하지 않는 것으로 생각된다.

이상의 실험에서 금속염 $CaCl_2$ 나 $MgCl_2$ 의 첨가에 의해 효소활성이 증가되었으며, 금속이온의 chelating agent인 EDTA에 의해 효소활성이 소실되는 사실에 의해 본 균주가 생성하는 aminopeptidase는 금속이온이 관여하는 metallopeptidase이며, Hg^{++} 와 *p*-CMB에 의해 효소활성이 급격히 저해된 사실을 감안할때 본 효소에 cystein이 관여하는 것으로 추정되었다. 이는 Soda 등¹¹⁾이 *L. casei* 균주가 생성하는 aminopeptidase가 EDTA 및 1,10-phenanthroline에 의해 심하게 저해되었다고 언급하면서 이 효소는 metalloenzyme의 특성을 갖고 있다고 보고한 바와 유사한 결과였다.

지금까지 *Str. diacetylactis*,¹⁸⁾ *Str. cremoris*,¹⁷⁾ *B. licheniformis*,²¹⁾ *B. breve* 등²²⁾이 생성하는 aminopeptidase가 metalloenzyme이며, *Str. thermophilus*가 생성하는 aminopeptidase¹²⁾는 serine-peptidase인 것으로 보고 되어 있다.

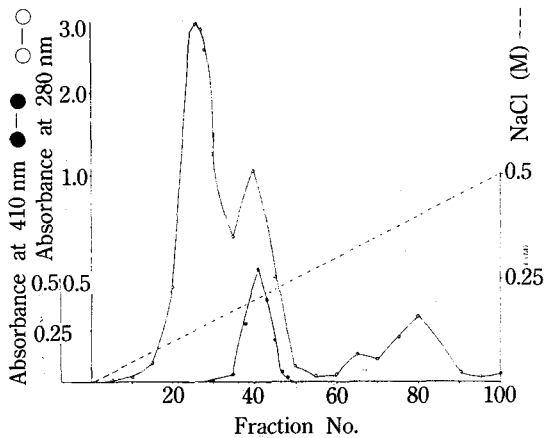


Fig. 7. Ion exchange chromatography of aminopeptidase on DEAE-Sephacel. Colum size, 2.6×100 cm; flow rate, 35 ml/hr; elution buffer, 0.01 M tris buffer(pH 7.5); elution volume, 4.0 ml/tube.

Table 4. Purification of intracellular aminopeptidase of *Micrococcus* sp. LL3

steps	total protein (mg)	total activity (unit)	specific activity *	yield (%)	fold
CFE	360	1008	2.8	100	1.0
DEAE	19.8	492	24.9	48.8	8.9
Gel(1st)	9.6	324	33.8	32.1	12.1
Gel(2nd)	4.2	212	50.5	21.0	18.0

* unit/min/mg protein

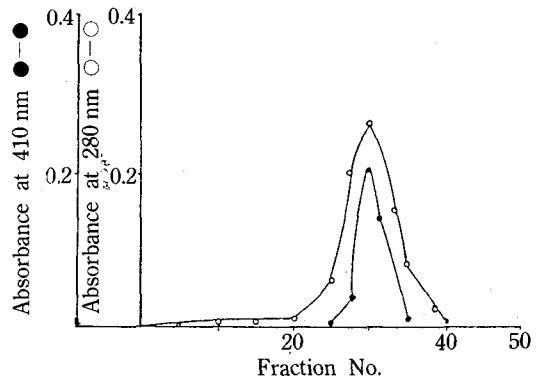


Fig. 8. Second gel filtration of aminopeptidase on Sephacryl S-300. Colum size, 2.6×60 cm; flow rate, 35 ml/hr; elution buffer, 0.01 M tris buffer(pH 7.5); elution volume 3.0 ml/tube.

Aminopeptidase의 정제

Micrococcus sp. LL3균주를 마쇄하여 얻어진 조효소 액을 ion exchange chromatography에 의해 분리 용출된 각 분획 중 aminopeptidase의 효소활성은 Fig. 7에서와 같다.

보다 더 순도를 높이기 위해 fraction 33~48의 샘플 액을 모아 동결건조하여 농축시킨 후 1차 Sephacryl S-300 gel chromatography를 실시한 후 같은 방법으로 2차 gel filtration을 실시한 결과 Fig. 8에서와 같이 효소의 최대활성을 갖는 단일 peak를 얻을 수 있었다.

이상의 정제 과정에서 aminopeptidase의 전체적인 정제결과는 Table 4에서와 같다. 또한 정제과정중 각 단계에서 얻어진 효소단백질의 SDS-PAGE를 이용한 전기영동의 형태를 관찰한 결과 Fig. 9와 같이 절차에 따라 불순 단백질의 band가 제거되며 major band가 농축되어 감을 확인하였다. 그러나 최종단계인 2차 gel chromatography 정제과정 후에도 몇 개의 minor band가 남아있는 것으로 나타났으나, 본 실험에서는 이들을 제거하지 못하였다.

전기 영동상에 나타난 minor bands의 경우 각 정제 과정에서 band가 줄어드는 것을 감안할 때 시료를 모으는 과정(pooling)에서 다른 단백질이 혼합된 것으로 생각되어 시료 채취(pooling)의 범위를 줄이거나, 또는 affinity chromatography와 같은 더욱 정밀한 정제과정이

필요한 것으로 생각된다.

한편 Fig. 10에 나타난 SDS-PAGE상의 이동도와 분자량과의 관계로부터 $\log M.W = 5.07368 - 1.12723 \times R_f$ 의 계산식을 얻어, 분자량을 산출한 결과 본 균주가 생성하는 aminopeptidase의 분자량은 약 46,500 dalton이었다.

지금까지 치즈숙성과 관련된 미생물 중 *Str. thermophilus*,²³⁾ *Str. diacetyllicus*,¹⁸⁾ *L. lactis*,¹³⁾ *Bifidobacterium breve* 등²²⁾이 생성하는 aminopeptidase의 분자량은 각각 62,000, 85,000±6,000, 78,000~81,000, 61,000인 것으로 보고되어 있으며 최근 *M. freudenreichii* 407균주가 생성하는 intracellular aminopeptidase는 43,000 dalton임을 보고하였다.¹⁵⁾ 이상의 연구결과 본 균주가 생성하는 aminopeptidase의 최적온도와 pH가 각각 30°C 및 7.0이었다. 특히 본 효소는 N-terminal 아미노기로서 lysine을 갖고있는 peptide의 분해를 선호하였으며 leucine, alanine 등 다양한 아미노기를 함유한 peptide를 분해할 수 있었다.

이러한 aminopeptidase를 갖고 있는 본 균주를 치즈 제조시 첨가할 경우 proteinase에 의해 분해된 large molecular weight polypeptide가 더 작은 peptide나 아미노산으로 분해되어 치즈 숙성 중 flavor를 증진시킬 것으로 추정된다.

감사의 글

본 논문에 사용된 균주와 실험기구를 제공해 주신 미국

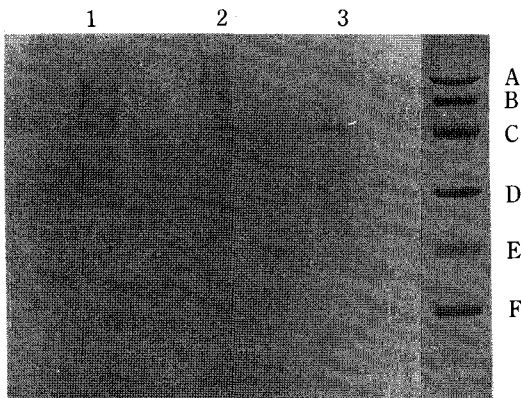


Fig. 9. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of aminopeptidase fraction obtained from different purification steps.

Lane 1: cell free extract; lane 2: active fraction from DEAE-Sephacel; lane 3: active fraction from 2nd Sephacryl S-300.

Marker A, phosphorylase b(MW 94,000); B, BSA(MW 62,000); C, ovalbumin(MW 43,000); D, carbonic anhydrase(MW 30,000); E, trypsin inhibitor(MW 20,100); F, α-lactalbumin(MW 14,400).

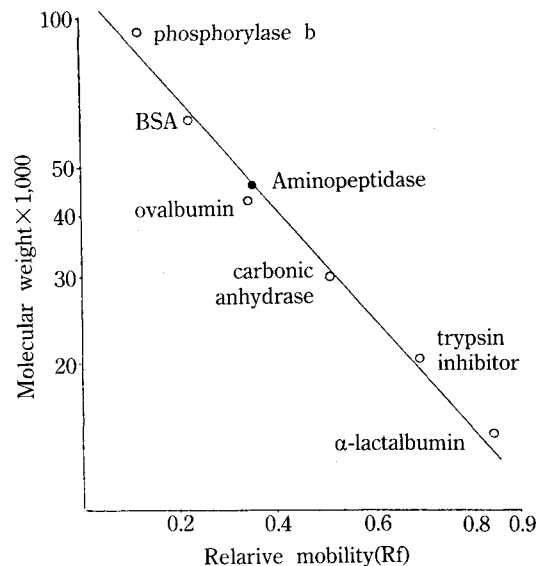


Fig. 10. Molecular weight determination for purified enzyme by SDS-PAGE.

University of Wisconsin-Madison, Department of Food Science의 Dr. E.H. Marth께 깊은 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

1. Fox, P. F.: Food Biotech, 1 : 133(1989)
2. Law, B. A., M. J. Castanon and M. E. Sharpe: J. Dairy Res., 43 : 301(1976)
3. Peterson, S. D. and Marshall, R. T.: J. Dairy Sci., 73 : 1395(1990)
4. Prasad, R., R. K. Malik and D. K. Marthure: Asian J. Dairy Res., 3 : 25(1984)
5. Feagan, J. T. and D. J. Dawson: Aust. J. Dairy Tech., April 59(1959)
6. Alford, J. A. and W. C. Frazier: J. Dairy Sci., 33 : 107(1950)
7. Marth, E. H.: Dairy Sci., 46 : 869(1963)
8. Bhowmik, T. and E. H. Marth: J. Dairy Sci., 71 : 2358(1988)
9. El. Soda, M. and M. J. Desmazeaud: Can. J. Microbiol., 28 : 1181(1982)
10. El. Soda, M., H. Said, M. J. Desmazeaud, R. Mashaly and A. Ismail: Egyptian J. Dairy Sci., 13 : 185 (1985)
11. El. Soda, M., H. J. Desmazeaud and J. I. Bergere: J. Dairy Res., 45 : 445(1978)
12. Meyer, J. and R. Jordi: J. Dairy Sci., 70 : 738(1987)
13. Eggiman, B. and M. Bachmann: Appl. and Env. Microbiol., 40 : 876(1980)
14. Roncar, G. and H. Zuber: Int. J. Protein Res., 1 : 45 (1969)
15. Bhowmick, T. and E. H. Marth: Sys. Appl. Microbiol., 12 : 112(1989)
16. Mou, L., J. J. Sullivan and G. R. Jago: J. Dairy Res., 42 : 147(1975)
17. Exterkate, F. A. and J. C. Gerrie: Appl. and Env. Microbiol., 53 : 147(1975)
18. Desmazeaud, M. J. and C. Zevaco: Milchwissenschaft, 34 : 606(1979)
19. Prey, J. P., E. M. Marth, M. E. Johnson and N. F. Olson: Milchwissenschaft, 41 : 622(1986)
20. Nakadai, T., S. Nasuno and N. Iguchi: Agric. Biol. Chem., 37 : 767(1973)
21. Rodriguez, J. and J. R. Prescott: Arch. Biochem. Biophys., 186 : 257(1985)
22. Cheng, C. and T. Nagasawa: Jpn. J. Zotech. Sci., 56 : 257(1985)
23. Rabier, D. and M. J. Desmazeaud: Biochimie, 55 : 389(1973)

Purification and partial characteristics of intracellular aminopeptidase from *Micrococcus* sp. LL3

Si Kyung Lee and Hyun Kyu Joo*(Microbial Fermentation Lab., Doosan Technical Center, Yongin 449-840 and *Department of Agricultural Chemistry, Kon Kuk University, Seoul 133-701, Korea)

Abstract: This paper describes the purification and partial characteristics of aminopeptidase from *Micrococcus* sp. LL3 to utilize the microorganism as a potential agent for industrial application for the purpose of shortening ripening period of cheddar cheese. The optimal temperature and pH for enzyme activity were 35°C and 7.0, respectively for L-leucine-*p*-nitroanilide as substrate. The enzyme remained stable for 10 minutes up to 50°C. The activity of aminopeptidase was stimulated by Mg⁺⁺ ion but strongly inhibited by Hg⁺⁺, metal complexing reagents, ethylenediaminetetraacetate (EDTA) and 1,10-phenanthroline. The enzyme was thought to be metallopeptidase. This enzyme had a broad substrate specificity, but was inactive on peptide with arginine as *N*-terminal amino acid. An intracellular aminopeptidase from *Micrococcus* sp. LL3 was purified by chromatography on DEAE-Sephacel and filtration on Sepacryl S-300. The enzyme has a molecular weight of 43,500.