

Vibrio sp. AL-145가 생산하는 균체의 효소의 특성(Ⅱ)

주동식 · 조순영* · 이응호†

부산수산대학교 식품공학과

*강릉대학교 식품과학과

Characteristics of the Extracellular Enzyme Produced by *Vibrio* sp. AL-145

Dong-Sik Joo, Soon-Yeong Cho* and Eung-Ho Lee†

Dept. of Food Science and Technology, National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea

*Dept. of Food Science, Kangnung National University, Kangnung 210-702, Korea

Abstract

The optimum pH and temperature for the purified extracellular enzyme activity were 8.0 and 37°C, respectively. NaCl was required for the activation of the enzyme and optimum concentration was 0.5M. This enzyme activity was inhibited by HgCl₂, CoCl₂ and ZnCl₂ and stimulated by CaCl₂. The activity of enzyme was increased by L-cysteine and 2-mercaptoethanol, but decreased by o-phenanthroline, p-CMB, EDTA and iodoacetate. The K_m and V_{max} values of extracellular enzyme appeared as 0.717% and 15.39U/mg, respectively.

Key words : extracellular enzyme, optimum pH, optimum concentration

서 론

근년에는 올리고당이 혈청지질, 급만성독성 및 변이 원성에 대한 영향¹⁾, bifido bacteria의 활성화에 미치는 효과²⁾, 생체조절인자로서의 효과³⁾ 및 장내세균군의 개선, 변비, 항콜레스테롤 효과⁴⁾ 등의 여러가지 기능성이 있어 기능성 식품으로 분류되기도 한다⁵⁻⁷⁾.

본 연구는 알긴산(alginic acid)을 특정한 효소로 분해하여 기능성을 갖는 올리고당을 제조하는데 목적을 두고 있으며, 전보⁸⁾에서는 미역으로부터 알긴산 분해 능이 강한 균주를 분리하여 동정하였고, 그 균주가 생성하는 균체의 효소를 정제하고 분자량을 측정할바 있다. 본 논문에서는 전보⁸⁾에서 정제한 효소의 생화학적 특성을 실험하여 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

효소

전보⁸⁾에서 정제한 분자량이 약 27,000인 단량체 효소

를 순수에 12시간 정도 투석, 농축하여 단백질 농도가 100μg/ml 되게 조절하여 10ml씩 플라스틱튜브에 넣고 밀봉한 후 동결(-40°C)하여 두고 실험에 이용하였다.

단백질 농도 측정

단백질 농도는 Lowry 등⁹⁾의 비색법에 의해 bovine serum albumin(Sigma Co., USA)을 표준단백질로 하여 구한 검량곡선으로부터 구하였다.

효소활성 측정

전보⁸⁾에서와 같이 기질로 0.4% 또는 0.8% Na-alginate(50mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, 0.3M NaCl)용액 4ml와 효소액 1ml를 혼합하여 37°C에서 50분간 반응시킨 후 Somogyi-Nelson법¹⁰⁾에 의해 흡광도를 측정하여 표준당류(mannuronic acid)부터 작성된 표준검량선으로부터 환원당을 측정하였다. 효소 1unit는 1분간에 1μmole의 환원당을 생산하는 효소량으로 하였다.

효소의 활성 최적조건

pH

정제효소 각 0.1ml에 대해 0.8% Na-alginate 1ml와

† To whom all correspondence should be addressed

각 pH 별 완충액(pH 4.0~6.0 ; 0.1M sodium acetate-acetate buffer, pH 7.0~9.0 ; 0.1M Tris-HCl buffer, pH 10.0~11.0 ; 0.1M sodium carbonate-sodium hydroxide carbonate) 1ml를 혼합하여 반응(37° C, 50min)시킨 후 환원당을 측정하여 활성 최적 pH를 결정하였다.

온도

정제효소 0.1ml와 0.4% 기질용액 2.0ml를 혼합하여 반응온도를 20° C에서 60° C 까지 5~10° C 간격으로 조절하면서 각각 50분간 반응시킨 후 환원당을 측정하여 활성 최적 온도를 구하였다.

효소의 안정성

pH

정제효소를 pH 4.0에서 pH 11.0까지의 각 완충액에서 60분간 투석시킨 후 효소액 0.1ml와 0.4% 기질용액 2.0ml를 혼합하여 37° C에서 50분간 반응시킨 후 잔류활성을 측정함으로써 효소 안정성에 미치는 pH의 영향을 실험하였다.

온도

정제효소를 0~80° C의 각 온도대에서 30분간 교반하면서 가온한 후 잔류활성을 측정하여 온도에 대한 안정성을 측정하였다.

효소의 활성에 미치는 첨가물의 영향

NaCl 농도

0.4% 기질용액에 NaCl 농도를 0~3.0M로 달리하여 첨가하고, 효소활성에 미치는 NaCl의 영향을 측정하였다.

금속이온

염화물(Cl)형의 1,2가 이온과 0.3M NaCl을 기질과 혼합하여 효소와 반응시켰을 때 활성에 미치는 영향을 측정하였다. 즉, 정제효소 0.1ml, 50mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) 0.99ml와 0.2M 금속용액 0.01ml를 혼합하여 37° C에서 전(前)반응시킨 후 이 혼합액에 0.8% 기질용액 (0.3M NaCl 함유) 1.0ml를 가하여 37° C에서 50분간 반응시켜 환원당을 측정하여 0.3M NaCl만 첨가된 것을 대조실험으로하여 금속이온의 영향을 조사하였다.

화학약제

화학약제에 대한 영향은 각 약제의 농도별 용액과 효소액을 혼합하여 전(前)반응을 시킨 후 기질을 첨가하여 활성을 측정하였다. 즉, SH화합물인 L-cysteine,

dithiothreitol과 SH 차단제인 o-phenanthroline, p-chloromercuribenzoate, S-S 결합 절단제인 2-mercaptoethanol 및 금속 chelate제인 EDTA, iodoacetate를 각각 0.1M 되게 조제하였다. 전체 반응액에 대해 각각 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0mM 농도가 되게 첨가하고 효소액과 전(前)반응시킨 후(37° C, 30min), 0.4% 기질용액 1.0ml를 가한 다음 37° C에서 50분간 반응시켜 활성을 측정하여 영향을 조사하였다.

반응속도 정수(Km) 및 최대반응속도(Vmax) 측정

효소농도를 고정하고 기질농도를 0.1~2.0%로 달리하여 반응시킨 후 반응시간당 생성되는 환원당을 측정하여 Lineweaver-Burk plot로부터 반응속도 정수(Km)와 최대반응속도(Vmax)를 구하였다.

다당류에 대한 정제효소의 분해활성

Na-alginate와 동일하게 soluble starch, carrageenan, carboxymethyl cellulose, pectic acid 및 dextrin을 각각 0.4%되게 제조하고, 동일 반응조건에서 정제효소 0.1ml와 각 기질 2.0ml를 반응시켜 생성되는 환원당을 측정하여 그 활성을 Na-alginate를 기질로 하였을 때와 비교하였다.

결과 및 고찰

활성 최적조건

정제된 효소의 활성 최적 pH 조건을 실험한 결과는

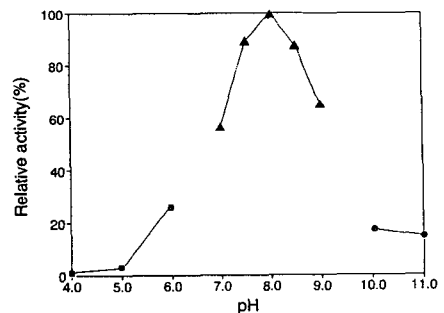


Fig. 1. pH dependence of the extracellular enzyme (alginate) activity.

The used buffers in the mixtures were 0.1M sodium acetate-acetate (pH 4.0~6.0), 0.1M Tris-HCl (pH 7.0~9.0), 0.1M sodium carbonate-sodium hydroxide carbonate (pH 10.0~11.0).

Substrate concentration : 0.8%Na-alginate contained 0.3M NaCl

Reaction condition : substrate soln. 1.0ml, buffer soln. 1.0ml, enzyme 0.1ml, temp. 37° C, reaction time 50min

Fig. 1과 같다. pH 8.0에서 최대 활성을 보였으며, pH 7.0이하와 pH 9.0이상의 pH 조건에서는 활성이 급격히 저하하였고, pH 5.0 부근에서는 활성이 거의 소실됨을 알 수 있었다. 이러한 결과로 균체의 효소는 pH 특히 산성영역의 pH에서 매우 민감한 효소임을 알 수 있었다. Sawabe 등¹¹⁾이 분리한 *Alteromonas* sp.의 alginate lyase의 최대 활성은 pH 7.5라고 보고한 것과 安藤 和 井上¹²⁾이 분리한 *Vibrio* sp. SO-20이 생성하는 효소의 최대 활성 pH가 7.0~7.2라고 보고한 것보다 약간 높은 pH 영역임을 알 수 있었다. 이와는 달리 조개의 중장선에서 분리한 alginate lyase는 pH 8.8~9.2에서 최대 활성을 나타낸다고 하였는데¹³⁾, 이는 미생물 유래

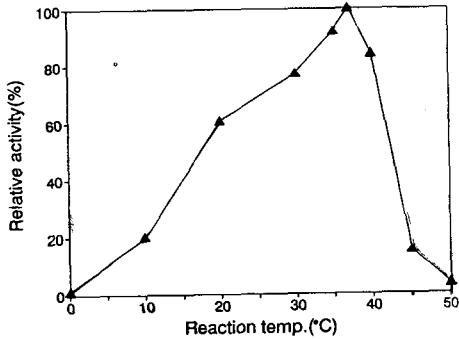


Fig. 2. Temperature dependence of the extracellular enzyme (alginate) activity.
 The used buffer in the reaction mixture was 50mM Tris-HCl, pH 8.0
 Substrate concentration : 0.4% Na-alginate contained 0.3M NaCl
 Reaction condition : substrate soln. 2.0ml, enzyme soln. 0.1ml reaction time 50min

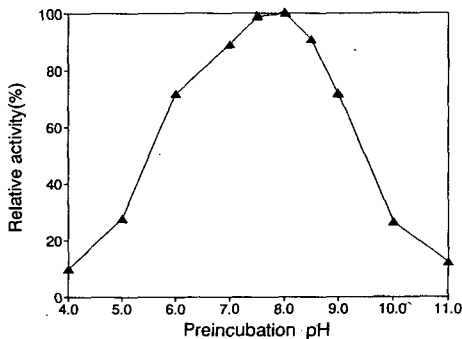


Fig. 3. Stability of the extracellular enzyme (alginate) at the different pH under preincubation condition.
 The enzymes were preincubated for 60min by dialysing in the various buffer (Fig. 1) solution of the different pH.
 Substrate concentration : 0.4% Na-alginate contained 0.3M NaCl
 Reaction condition : substrate soln. 2.0ml, enzyme soln. 0.1ml, temp. 37°C, reaction time 50min

효소와는 다소 차이가 있는 것으로 생각되었다.

한편, 활성 온도는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 35~37°C에서 최대 활성을 나타내었다. 이 결과는 Tseng 등¹⁴⁾이 *Vibrio* sp. AL-128 균주로부터 얻은 alginate lyase와 비슷한 결과를 보여 주고 있으며, 이러한 활성 온도 범위는 NaCl농도나 기타 금속이온 등의 존재나 그 정도에 따라 영향을 받을 수 있다고 하였다.

효소의 안정성

정제효소의 pH에 대한 안정성을 측정된 결과 (Fig. 3), pH 6.5이하 pH 9.5이상의 영역에서 불안정한 것으로 나타났고, 최적 pH 영역인 중성이나 미알칼리성 영역에서는 어느 정도 안정하였다.

온도에 대한 안정성을 상대 활성으로 나타낸 결과는 Fig. 4와 같다. 이 효소의 경우 가온 온도 30°C까지는 안정하였고, 40°C이상의 온도에서는 급격한 활성의 소실을 가져왔다. Min 등¹⁵⁾도 *Pseudomonas* sp.로부터 분리한 alginate lyase도 온도에 상당히 민감하다고 보고한 바 있다. 한편, Tseng 등¹⁶⁾도 비슷한 결과를 얻었으며, 반응액에 5mM의 NaCl 첨가로 열에 훨씬 안정하게 된다고 하였다.

효소활성에 미치는 첨가물의 영향

NaCl 농도

효소활성에 미치는 NaCl의 영향을 측정된 결과 (Fig. 5), NaCl이 전혀 첨가되지 않을 경우는 효소 활성이 거의 나타나지 않았으며, NaCl농도가 높아질수록 효소 활성은 증대되어 0.5M 농도에서 최대 활성을 나타내

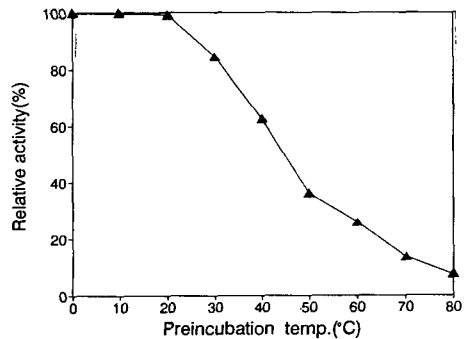


Fig. 4. Stability of the extracellular enzyme (alginate) at the different temperature under preincubation condition.
 The enzymes were preincubated for 30min at different temperature.
 Substrate concentration : 0.4% Na-alginate contained 0.3M NaCl
 Reaction condition : substrate soln. 2.0ml, enzyme soln. 0.1ml, reaction time 50min

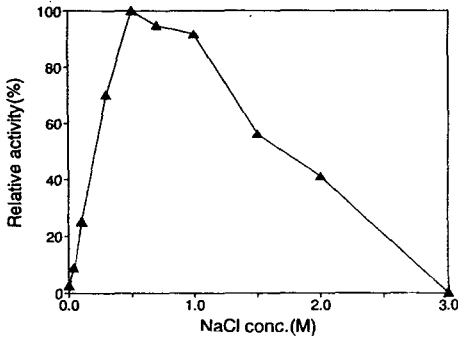


Fig. 5. Effect of NaCl concentration on the extracellular enzyme(alginase) activity.

The used buffer in the reaction mixtures was 50mM Tris-HCl pH 8.0
 Substrate concentration : 0.4%Na-alginate
 Reaction condition ; substrate soln. 2.0ml, enzyme soln. 0.1ml, temp. 37°C, reaction time 50min

Table 1. Effect of metal ions on the extracellular enzyme(alginase) activity

Metal ion*	Relative activity(%)
Control	100.0
K ⁺	86.8
Li ⁺	87.8
Ba ²⁺	70.1
Ca ²⁺	122.6
Co ²⁺	55.2
Cu ²⁺	69.7
Hg ²⁺	8.1
Mg ²⁺	111.2
Mn ²⁺	69.2
Zn ²⁺	27.2
NH ₄ ⁺	92.7

* Chloride form (2mM)

었다. 그 이상의 농도가 첨가되면 서서히 활성이 감소하다가 3.0M 농도에서는 활성이 나타나지 않았다. 일정 농도의 NaCl 요구는 Tseng 등¹⁴⁾의 보고에서도 지적하고 있으며, Baxter¹⁷⁾는 호염효소의 활성에 1g 양이온이 요구되는데 이는 효소 분자내의 정전기적 반발력을 감소시키는 역할을 하기 때문인 것으로 보고한 바 있다. 본 연구의 정제효소도 해양 환경에서 분리한 균이 생성한 효소이기 때문에 균체의 성장 뿐만 아니라 효소의 활성에도 적정 농도의 NaCl이 필수적으로 요구되는 것으로 판단되었다.

금속 이온

금속이온의 효소활성에 미치는 영향을 실험한 결과 (Table 1) 0.05% 농도의 Hg²⁺, Co²⁺ 및 Zn²⁺이온에 의해서는 80~90%의 활성이 저해되었다. 반면, Ca²⁺에 의해서는 20% 정도 활성이 증대되었다. Kaneko 등¹⁸⁾

Table 2. Effect of chemical reagents on the extracellular enzyme (alginate) activity

Reagents	Conc.(mM)	Relative activity(%)
Control	0	100.0
L-Cysteine	0.05	100.0
	0.1	100.0
	0.5	110.8
	1.0	121.5
	5.0	289.2
	10.0	411.4
EDTA	0.05	58.8
	0.1	7.6
	0.5	8.0
	1.0	7.7
	5.0	2.5
	10.0	1.3
Dithiothreitol	0.05	51.9
	0.1	53.8
	0.5	68.4
	1.0	79.1
	5.0	81.0
	10.0	114.2
Iodoacetate	0.05	94.7
	0.1	95.6
	0.5	90.9
	1.0	43.0
	5.0	22.4
	10.0	0.6
p-CMB	0.05	11.4
	0.1	8.2
	0.5	2.5
	1.0	8.9
	5.0	17.0
	10.0	-
o-Phenanthroline	0.05	108.3
	0.1	94.9
	0.5	91.8
	1.0	82.9
	5.0	18.4
	10.0	26.6
2-Mercaptoethanol	0.05	84.8
	0.1	88.9
	0.5	94.2
	1.0	98.7
	5.0	177.2
	10.0	155.1

¹⁹⁾, Min 등¹⁵⁾도 HgCl₂에 의해서는 활성이 크게 저해되고, 저농도의 CaCl₂에 의해서는 활성이 증대되는 것으로 보고한 바 있는데, 일반적으로 thiol-효소와 serine-효소는 대개의 2가 금속이온에 의해 활성을 잃게되는데 이는 효소활성 부위에 있는 SH기와 OH기에 이들 금속이온이 높은 친화성을 가져 기질과의 반응을 억제하기 때문인 것으로 판단되며, 저농도의 Ca²⁺는 알긴산을 분해하는 효소의 경우 활성을 증가시키는데^{11,14)}

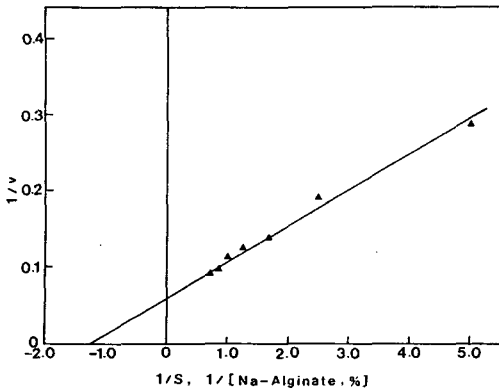


Fig. 6. Lineweaver-Burk plots of Na-alginate lysis by extracellular enzyme(alginase).

Table 3. Alginolytic activity on several polysaccharides of extracellular enzyme(alginase)

Substrate	Enzyme activity
Na-alginate	11.81*
Carboxymethyl cellulose	-
Soluble starch	-
Pectic acid	0.02
Carrageenan	-
Dextrin	-

* Specific activity (U/mg)

²⁰⁾ 이는 효소활성의 cofactor로 작용하는 요소일 것으로 판단되며, 과다한 Ca²⁺는 기질인 알긴산의 영김에 의해 활성이 저해되었던 것으로 생각되었다.

화학 약제

화학약제의 효소 활성에 미치는 영향을 측정된 결과는 Table 2와 같다. SH 화합물인 L-cysteine과 S-S 절단제인 2-mercaptoethanol에 의해서는 현저하게 활성이 증대되었다. 반면, SH기 차단제인 o-phenanthroline, p-CMB와 금속 chelate제인 EDTA와 iodoacetate에 의해서는 현저하게 활성이 억제되었다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 효소의 활성 부위에 SH기를 갖는 SH-enzyme 인 것으로 생각된다.

반응속도 정수(Km)와 최대반응속도(Vmax)

기질 농도에 따른 반응속도를 Lineweaver-Burk plot로 측정하였으며 (Fig. 6), 그 때의 반응속도식은 Y=0.04658X+0.0650(r=0.9885)이었다. 이 때의 반응속도 정수(Km)는 0.717%였으며, 최대반응속도 Vmax는 15.39U/mg이었다.

다당류에 대한 분해 활성

정제효소의 Na-alginate 이외의 다른 다당류에 대한 분해 활성을 측정된 결과 Table 3에서 확인할 수 있듯이 다른 다당류에는 전혀 분해 활성을 나타내지 않는 것으로 나타났으며, 이 효소는 알긴산 (alginic acid)에만 작용하는 alginate lyase 종류의 효소인 것으로 판단되었다²¹⁾.

요 약

정제효소의 최대활성 pH는 8.0이고, 최대활성온도는 37°C였으며, pH 6.5이하 9.5이상의 영역에서는 상당히 불안정하였고, 30°C이상의 온도에서도 불안정한 효소였다. NaCl이 첨가되지 않을 경우 효소 활성이 나타나지 않았고, NaCl 0.5M일 때 최대활성을 보였다. 미량의 CaCl₂ 첨가로 활성의 증대를 가져왔고, HgCl₂, CoCl₂ 및 ZnCl₂ 등에 의해서는 활성이 현저히 억제되었다. L-cysteine과 2-mercaptoethanol에 의해서는 활성이 증대되었고, o-phenanthroline, p-CMB, EDTA 및 iodoacetate에 의해서는 활성이 현저히 저해되었다. 정제효소의 Km(반응속도 정수)은 0.717%였고, Vmax(최대 반응속도)는 15.39U/mg 이었다. 본 정제효소는 알긴산 (alginic acid)에만 특이적으로 작용하는 alginate lyase 계열의 효소였다.

감사의 글

본 연구는 1991년 한국과학재단 연구비 지원(과제번호 ; 91-07-00-14)으로 수행된 연구 결과의 일부이며, 이를 깊이 감사드립니다.

문 헌

- 金子俊之, 河本高伸, 福井史生, 秋葉哲生, 鈴木重紀, 平尾昭法, 中鶴修一, 蟹澤成好: イソマルトオリゴ糖의 급성·慢性毒性及び變異原性試驗並びにラント末梢血リンパ球腸内フローラニ及ぼす影響について. 食品衛生學會誌, 31(5), 394(1990)
- 齊藤忠夫, 中澤勇二: 含ピフィズ스活性オリゴ糖の研究成果とその利用性. New Food Industry, 30(4), 73(1988)
- 磯貝彰: 酵素阻害活性を有するオリゴ糖, アロサミン. 日本農藝化學會誌, 62(8), 1256(1988)
- 日高秀昌, 築田利章, 足立暁, 齊藤安弘: フラクトオリゴ糖의 工業生産とその利用開發. 日本農藝學會誌, 61(8), 915(1987)
- 正井輝久: 大豆オリゴ糖의 開發と今後の展望. New

- Food Industry*, **32**(5), 5 (1990)
6. 岡田巖太郎, 海野剛裕, 中久喜輝夫: ゲンチオオキ糖の性状と食品への應用. *New Food Industry*, **32**(10), 28(1990)
 7. 菅野智榮: イソマルトオリゴ糖の生理機能とその應用. *New Food Industry*, **31**(6), 9(1989)
 8. 주동식, 이응호: *Vibrio* sp. AL-145가 생산하는 균체의 효소의 정제 (I). *한국영양식량학회지*, **22**(2), 234 (1993)
 9. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
 10. 日本食品工業學會: 食品分析法. 光琳, p.170(1984)
 11. Sawabe, T., Ezura, Y. and Kimura, T.: Purification and characterization of an alginate lyase from marine *Alteromonas* sp. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**(3), 521 (1992)
 12. 安藤芳明, 井上勝弘: 微生物によるアルギン酸の分解-V. *Vibrio* sp. SO-20 のアルギン酸について. *日本水産學會誌*, **27**(4), 342 (1961)
 13. Muramatsu, T., Hirose, S. and Katayose, M.: Isolation and properties of alginate lyase from the mid-gut gland of wreath shell *Turbo cornutus*. *Agric. Biol. Chem.*, **41**(10), 1939 (1977)
 14. Tseng, C. H., Yamaguchi, K. and Kitamikado, M.: Isolation and some properties of alginate lyase from a marine bacterium *Vibrio* sp. AL-128. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**(3), 533 (1992)
 15. Min, K. H., Sasaki, S. F., Kashiwabara, Y., Suzuki, H. and Nisizawa, K.: Multiple components of endopolyguluronide lyase of *Pseudomonas* sp. *J. Biochemistry*, **81**, 539 (1977)
 16. Tseng, C. H., Yamaguchi, K. and Kitamikado, M.: Two types of alginate lyase from a marine bacterium *Vibrio* sp. AL-9. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**(4), 743 (1992)
 17. Baxter, R. M.: An interpretation of the effects of salts on the lactic dehydrogenase of *Halobacterium salinarium*. *Can. J. Microbiol.*, **5**, 47(1959)
 18. Kaneko, Y., Yonemoto, Y., Okayama, K., Kimura, A. and Murata, K.: Symbiotic formation of alginate lyase in mixed culture of bacteria isolated from soil. *J. Fermentation Bioengineering*, **69**(3), 192 (1990)
 19. Kaneko, Y., Yonemoto, Y., Okayama, K., Kimura, A. and Murata, K.: Bacterial alginate lyase properties of the enzyme formed in a mixed culture bacteria isolated from soil. *J. Fermentation Bioengineering*, **70**(3), 147 (1990)
 20. Min, K. H., Sasaki, S. F., Kashiwabara, Y. and Nisizawa, K.: Substrate specificity of endopolyuronide lyases from *Pseudomonas* sp. on the basis of their kinetic properties. *J. Biochemistry*, **81**, 547 (1977)
 21. Sawabe, T., Ezura, Y. and Kimura, T.: Characterization of an alginolytic marine bacterium from decaying Rishiri-kombu *Laminaria japonica* var *ochotensis*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**(1), 141 (1992)

(1993년 2월 27일 접수)