

김치유래 *Pichia*속 효모가 생산하는 L-galactono- γ -lactone oxidase의 분리 정제 및 특성

오지영* · 한영숙¹

(주)두산 R&D 센터, ¹성신여자대학교 식품영양학과

Purification and Characterization of L-Galactono- γ -lactone Oxidase in *Pichia* sp. Isolated from *Kimchi*

Ji-Young Oh* and Young-Sook Han

Doosan Corporation Research and Development Center
¹Department of Food and Nutrition, Sungshin Women's University

The purification and characteristics of the biosynthesis enzyme of vitamin C from microorganisms related with *kimchi* fermentation were investigated to define vitamin C biosynthetic pathways in yeast. A yeast strain (*Pichia onychis* 16-4) which synthesizes vitamin C with galacturonic acid as substrate at high rate was isolated from *kimchi*. The enzyme L-galactono- γ -lactone oxidase isolated from the yeast was purified and characterized. The specific activity of the crude enzyme was 7.26 unit/mg protein, which increased to 4,698 unit/mg protein with a chromatography of Sephacryl S-200HR; indicating a 647.1-fold level of purification. The molecular weights of the dissociated enzymes were estimated to be 31,000, 39,000, and 50,000 KD. Among the substrates tested, L-galactono- γ -lactone was the most effective. The enzyme showed optimum activity at pH 7.8 and 35°C. The purified enzyme uses O₂ as the electron acceptor for oxidation of L-galactono- γ -lactone.

Key words: *kimchi*, L-galactono- γ -lactone oxidase, vitamin C, *Pichia onychis*, galacturonic acid

서 론

비타민 C(L-ascorbic acid, L-AA)는 대부분의 생명체에 중요한 대사물질로 비타민 C의 항산화적 특성은 이미 잘 알려져 있다⁽¹⁾. 비타민 C는 모든 고등식물⁽²⁻⁴⁾과 인간, 영장류, 기니아피그, 일부 조류를 제외한 모든 동물에 의해 생합성되며⁽⁵⁻⁷⁾, 비타민 C와 동족체인 D-erythroascorbic acid(D-EASD)는 일부 세균^(8,9)과 효모⁽¹⁰⁻¹²⁾에서도 합성되는 것으로 보고되었다. 동물의 경우는 비타민 C의 합성경로가 이미 밝혀져 있으나 식물의 경우 세포에서 항산화작용, 광합성 조절작용 및 세포막에서 전자 전달체로서 중요한 역할을 하는 물질임에도 불구하고 식물 세포내에서 비타민 C의 대사과정은 아직 까지도 명확하게 규명되지 않았다⁽¹³⁾. 비타민 C의 생합성은 동물과 식물에서 서로 다른 경로를 거치게 된다. 동물에서는 전자수용체로 산소를 이용하는 microsome에 존재하는 효소

가 D-glucose를 비타민 C의 전구체로 이용하여 L-gulono- γ -lactone을 비타민 C로 산화시키는 것으로 L-gulono- γ -lactone oxidase(E.C. 1.1.3.8)이라는 효소에 의해 비타민 C의 합성이 진행된다. 이 효소는 쥐, 염소 및 닭 등에서 분리, 정제되어 그 특성이 확인되었다^(14,15). 반면, 식물에서 비타민 C의 세포내 안정화에 관여하는 중요성에도 불구하고 비타민 C의 생합성 경로가 아직 완전히 밝혀지지 않았으나 몇 가지 경로가 제안되어 왔다⁽¹⁶⁻¹⁸⁾. 식물의 비타민 C의 생합성 경로 중 D-galactose를 전구체로 사용하는 경로로 L-galactono- γ -lactone dehydrogenase(E.C. 1.3.2.3)에 의해 반응이 촉매된다. 이 효소는 식물세포의 미토콘드리아에 존재하는 효소로 NADP를 전자수용체로 하며, 비타민 C 생합성의 마지막 단계에서 L-galactono- γ -lactone의 산화를 촉매하는 것으로 알려져 있다⁽²⁻⁴⁾. 동물과 식물의 비타민 C 생합성 효소만큼 많은 연구가 진행되어 온 것은 아니나, 미생물 중 일부 곰팡이와 효모 및 세균이 비타민 C 또는 D-erythroascorbic acid를 생산한다는 것이 알려져 있는데, 효모의 경우 후 등⁽¹⁹⁾과 Murakawa 등⁽²⁰⁾은 *Candida*속에서 D-erythroascorbic acid가 생합성된다고 하였으며, 효모에서 비타민 C의 생합성에 관여하는 효소에 대한 연구로는 Kenney 등⁽²¹⁾과, Nishikimi 등^(10,11) 및 Bleeg 등⁽¹²⁾에 의해서 효모의 미토콘드리아에서 L-galactono- γ -lactone

*Corresponding author: Ji-Young Oh, Doosan Corporation Research and Development, Surgbok-dong, Yong-in-city, Kyunggi-do 449-795, Korea
Tel: 82-31-260-1223
Fax: 82-31-260-1171
E-mail: jiyoungoh@doosan.com

oxidase(E.C. 1.1.3.24)를 분리, 정제하여 분자량은 56,000 KD 이고 기질로는 L-gulono- γ -lactone과 D-altrono- γ -lactone을 사용하므로 식물의 비타민 C 생합성 효소인 L-galactono- γ -lactone dehydrogenase(E.C. 1.3.2.3)보다 동물의 비타민 C 생합성 효소인 L-gulono- γ -lactone oxidase(E.C. 1.1.3.8)과 더 유사하다고 하였다. 반면, Bleeg 등⁽¹²⁾은 효모에서 L-galactono- γ -lactone oxidase(E.C. 1.1.3.24)를 분리하였으나, 그 특성은 분자량이 74,000KD이고, 기질로는 L-galactono- γ -lactone, D-altrono- γ -lactone, L-fucono- γ -lactone, D-arabino- γ -lactone 및 D-threono- γ -lactone을 사용하기 때문에 동물의 L-gulono- γ -lactone oxidase(E.C. 1.1.3.8)와는 다른 특성을 가지고 있다고 하여, 같은 효소에 대해서도 연구자에 따라 그 특성이 다르게 보고되고 있다.

김치는 한국의 대표적인 복합발효 식품으로 김치의 숙성 적기에는 비타민 C의 함량이 비교적 높은 식품 중의 하나이다⁽²²⁾. 김치에서 비타민 C함량은 담금 조건, 숙성환경 등에 따라 달라지게 되는데, glucose와 galacturonic acid를 첨가한 김치에서 숙성적기에 비타민 C의 함량이 증가되는 것이 보고된 바가 있다⁽²²⁾. 이는 김치 재료 중의 효소가 환원당을 기질로 하여 비타민 C를 합성하는 것으로 이 등⁽²³⁾에 의하면 glucose 첨가시 보다 galacturonic acid 첨가시 그 효과가 높았다고 하였다. 김치 중의 galacturonic acid는 숙성과정에서 김치내의 polygalacturonase(PG)의 작용에 의해 무나 배추에 함유된 pectin에서 분해, 생성되는 물질이다⁽²⁴⁾. 이와 같이 김치의 발효 중 숙성 적기에 비타민 C양이 증가하는 현상에 대하여 연구가 진행되어 왔으나 김치 숙성 후반기 즉, 김치 산패 시에 다시 한번 비타민 C의 양이 크게 증가하는 현상에 대해서는 알려진 바가 없다.

본 연구에서는 김치 후반기에 생육이 되는 일부 미생물에 의한 비타민 C 합성 현상을 밝히고자 김치내 비타민 C 함량 증가를 보이는 시기에 분리된 효모로부터 효소를 분리, 정제하여 그 특성을 조사하였으며, 미생물에서 비타민 C의 합성경로를 밝히는 기초자료로 제시하고자 하였다.

실험 방법

김치 시료의 재료

김치 재료 중 배추(*Brassica pekinensis*), 파(*Allium fistulosum*), 마늘(*Allium sativum*), 생강(*Zingiber officinale*) 및 고춧가루는 2001년 1월 서울 성북구 동선동 소재 재래시장에서 실험 당일 신선한 것을 구입하여 사용하였다.

김치의 제조

배추는 4등분하여 깨끗이 씻어 4.0~5.0 cm 길이로 세절한 후 배추 88.0%, 파 5.5%, 마늘 3.0%, 고춧가루 2.5%, 생강 1.0%의 비율로 NaCl 2.0%의 김치를 제조하여 7.0 L 유리병에 담아 20°C에서 발효, 숙성시키면서 시료로 사용하였다.

김치 발효 중 pH 및 총산함량 측정

김치의 pH는 pH meter(Mettler, Toledo 345)로 측정하였으며, 총산함량의 측정은 시료액 10 mL를 취하여 pH가 8.3에 도달할 때까지 0.1 N NaOH 용액으로 적정하여, 이때의

NaOH 소요량을 다음 식에 적용하여 lactic acid(%) 양으로 환산하였다.

$$\text{Total acid content(\%)} = \frac{0.009008 \times \text{mL of 0.1 N NaOH} \times F}{\text{sample (mL)}} \times 100$$

F: factor of 0.1 N NaOH

총 비타민 C 정량

총 비타민 C의 함량은 2,4-DNP(2,4-dinitrophenylhydrazine) 비색법에 의해 정량하였다⁽²⁵⁾.

김치 발효 중 polygalacturonase(PG) 활성 측정

김치 시료의 PG활성은 효소의 작용으로 유리되는 galacturonic acid의 함량을 DNS(dinitrosalicylic acid)에 의한 비색법으로 측정하였다⁽²⁶⁾. 효소액은 김치의 발효, 숙성 과정 중 PG의 활성을 측정하기 위해 일정 발효 기간의 김치 200 g을 취해 육 등⁽¹⁶⁾의 방법에 따라 측정하였으며, 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/mL 농도로 제조된 α -D-galacturonic acid 표준용액 0.5 mL에 DNS용액 1.0 mL를 넣어 100°C 끓는 물에서 5분간 반응시킨 후 얼음물에서 냉각시키면서 증류수 5.0 mL를 첨가하여 잘 혼합한 후 2500 \times g, 5분간 원심분리하였다. 원심분리한 상등액에 대해 520 nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선을 작성하였다. 이때 PG의 1 unit는 효소액 1 mL가 2시간 동안 1 mg의 환원당을 생성할 때로 정의하였다.

단백질 정량

단백질은 Bradford method⁽²⁶⁾에 근거하여 Bio-Rad protein assay(Bio-Rad Lab. Technical Bulletin)⁽²⁸⁾로 정량하였고, 표준 물질로 BSA(bovine serum albumin)를 사용하였다.

김치에서 효모의 분리, 배양 및 동정

김치는 각 발효일에 채취한 시료 1.0 mL을 0.85% 멸균 식염수로 단계 희석하여 spreading culture method를 사용하였다. 효모의 분리는 10% tartaric acid 1.7 mL/100 mL 첨가한 PDA medium(potato dextrose agar, Difco co.)배지를 사용하여 30°C에서 2~3일간 배양한 후 PDA slant agar에 효모를 순수 분리하였다⁽²⁹⁾. 비타민 C를 합성하는 균주를 선별하기 위해 YPD 액체배지(yeast extract 2.0%, peptone 0.5%, dextrose 0.5%)에 효모 1백금이를 5.0 mL 액체배지에서 180 rpm으로 30°C에서 24시간 배양하여 활성화시킨 후 균주 배양액 1.0 mL를 1.0% L-galactono- γ -lactone을 함유한 10 mL의 액체배지에 옮겨 다시 180 rpm으로 30°C에서 24시간 배양하였다. 이 배양액을 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액에 대해서 비타민 C 생성량을 측정하였다. 액체배양에서 비타민 C 생성량이 높은 균주를 선별하고 MicrologTM system (Biolog, Inc. USA)을 사용하여 동정하였다.

효모에서 조효소액 추출

효모 1백금이를 5.0 mL YPD 액체배지에서 180 rpm으로 25°C에서 24시간 1차 진탕배양하고, 이 배양액을 100 mL

YPD 액체배지에서 180 rpm으로 25°C에서 24시간 2차 진탕 배양을 하였다. 균주 배양액을 1.0 L YPD 액체배지에서 180 rpm으로 25°C에서 24시간 3차 진탕배양을 한 후 4,000×g로 10분간 원심분리하여 균체를 회수하였다. 회수된 균체는 1 mM의 EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid)를 포함한 50 mM Tris-HCl(pH 7.5)로 두 번 세척하였다. 세척한 균체는 50 mM Tris-HCl(pH 7.5, 1 mM EDTA, 5 mM DTT-dithiothreitol, 0.5 mM PMSF(phenyl methylsulfonyl fluoride) 30 mL에 재용해 시켰다. 이 용액을 ice bath에서 sonication(6×15 s, 20 μ , Vibra CellTM, Sonics & Materials Inc. USA)하여 33,000×g으로 30분간 원심분리한 후 상등액을 조효소로 하였다.⁽³⁰⁾

효소활성 측정

효소활성 반응액 1.0 mL는 10 mM potassium phosphate buffer(pH 7.8)에 8.4 mM L-galactono- γ -lactone과 3.2 mM phenazine methosulfate를 첨가한 buffer와 조효소액으로 하였고, 반응액을 37°C에서 20분간 반응시킨 후 100% TCA(trichloroacetic acid) 50 μ L로 반응정지를 시켰다. 이 반응액을 3,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 단백질을 제거한 후 상등액의 비타민 C 생성량을 측정하였다⁽³⁾. 효소 1 unit는 효소액 1 mL가 20분간 생성한 비타민 C양(mg%)으로 정의하였다.

효소 정제

효모에서 추출한 조효소액은 4단계의 column을 통과시켜 정제하였다. 1단계는 조효소액 30 mg를 50 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5, 1 mM EDTA, 5.0 mM DTT, 0.5 mM PMSF)로 안정화시킨 Sephadex G-25 column(1.0×18 cm)으로 추출하여 활성 분획을 얻었으며, 이 분획을 PM-10 membrane(Amicon, USA)으로 농축하였다⁽¹⁰⁾. 1단계에서 얻어진 활성분획은 20 mM Tris-acetate buffer(pH 8.0, 10 mM KCl, 0.1% Tween 20)로 안정화시킨 DEAE- Sephadex A-50 column(2.5×30 cm)에서 20 mM Tris-acetate buffer(pH 8.0, 0.11 M KCl, 0.1% Tween 20, 1 mM EDTA)로 추출하여 활성 분획을 얻은 후 PM-10 membrane(Amicon, USA)으로 농축하였다. 이 농축액은 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0, 0.2 M NaCl, 0.1% Tween 20, 1 mM EDTA)로 24시간 투석하였다⁽¹⁰⁾. 3단계는 투석한 효소용액을 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0)로 안정화시킨 Hydroxylapatite column(1.5×30 cm)에서 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0, 0.1% Tween 20, 1 mM EDTA)로 추출하여 활성 분획을 얻은 후 PM-10 membrane(Amicon, USA)으로 농축하였다⁽¹⁰⁾. 마지막 단계는 농축된 효소액을 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0, 0.1% Tween 20, 1 mM EDTA)로 안정화시킨 Sephacryl S-200 HR column(1.5×30 cm)에서 같은 buffer로 추출하여 활성 분획을 얻었으며 PM-10 membrane(Amicon, USA)으로 최종 농축하였다⁽¹⁰⁾.

분자량 측정

농축된 효소액은 SDS(sodium dodecyl sulfate)가 첨가된 polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE) 10% gel을

사용하여 분자량을 측정하였으며, 분자량 marker는 precision protein standard(25~250 KD, Bio-Rad, USA)를 사용하였다⁽³¹⁾. SDS-PAGE에 의해 band가 확인되지 않는 경우 silver stain⁽³²⁾으로 band를 확인하였다.

효소의 특성

기질 특이성: 효소의 기질 특이성은 8.4 mM의 D-, L-galactono- γ -lactone, D-, L-gulono- γ -lactone, D-galacturonic acid, D-glucuronic acid, D-gluconic acid, D-galactose, D-xylose, D-glucose 10종류의 기질을 이용하여 37°C, 20분간 효소액과 반응시켜 활성을 측정하였다. 사용된 buffer는 10 mM potassium phosphate(pH 7.8)를 이용하였다.

pH 특이성: 효소의 최적 pH 측정은 potassium phosphate buffer를 사용하였고, pH의 범위를 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 7.5, 7.8, 8.0, 8.5, 9.0로 조정하였다. pH에 대한 안정성은 효소액에 각각의 pH의 buffer를 첨가하여 4°C에서 24시간 방치 후 잔존하는 효소의 활성을 측정하였다⁽¹⁹⁾.

온도 특이성: 효소의 반응 최적온도를 결정하기 위해서 4, 10, 20, 25, 30, 35, 37, 40, 45, 50, 55, 60°C에서 각각 효소활성을 측정하였다⁽¹⁹⁾.

산소 소모량: 정제된 효소가 전자수용체로 산소공여와 탈수소 중 어떤 것을 통하여 이용하는지 알아보기 위하여 하나는 반응액 1.0 mL에 0.1 M Tris-HCl(pH 8.2), 0.5 mM NADP⁺, 200 mM L-galactono- γ -lactone과 효소액을 첨가하여 30°C에서 20분간 반응시켜 5분마다 340 nm에서 흡광도를 측정하였다⁽³⁰⁾. 또한, GAGO-20 Kit(Sigma, USA)를 이용하여 효소 반응액 1.0 mL에 assay reagent(39.2 mL peroxidase, 0.8 mL o-dianisidine) 2.0 mL를 첨가하여 37°C에서 30분간 5분마다 12 N H₂SO₄ 2.0 mL로 반응을 정지시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다⁽³³⁾.

결과 및 고찰

김치 발효 중 pH, 총 산함량 변화

김치를 발효 숙성시키면서 pH 및 총 산함량의 변화를 측정한 결과는 Fig. 1에 나타내었다. pH의 경우 김치 담금 직후는 5.29, 숙성 2일까지는 4.12의 값을 나타내었으나 김치의 숙성에 따라 점점 감소되어 숙성 10일 경에는 3.58로 크게 감소되었다. 총 산함량의 경우는 담금 직후 0.24%, 숙성 1일에는 0.27%, 숙성 2일에는 0.55%로 나타났고, 김치의 숙성과 함께 증가되어 발효 10일 경에는 1.43%의 값으로 증가되었다. 또한, 총 산함량의 경우 숙성 22일 까지는 지속적으로 증가되다가 숙성 25일부터 숙성 33일 까지 다소 감소되었다. 이는 김치가 발효될 때 젖산균의 증식으로 다량의 산이 생성되는 발효 초, 중기에는 pH가 감소되나 발효 후반기에는 젖산균이 생성한 산을 이용하여 증식하는 산막효모의 증식으로 김치내 생성된 젖산을 소비⁽³⁴⁾한 결과로 생각되었다.

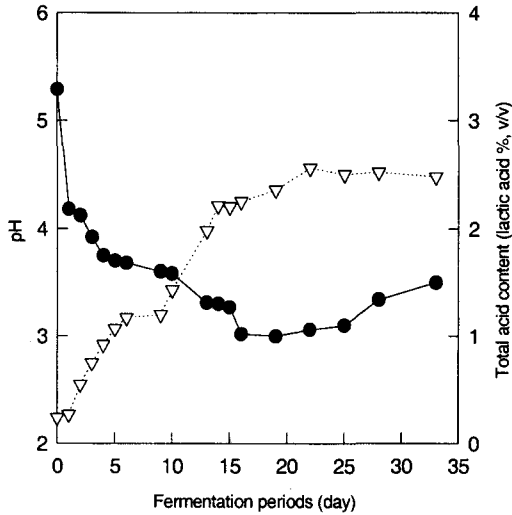


Fig. 1. Change of pH and total acid content during fermentation of kimchi at 20°C.

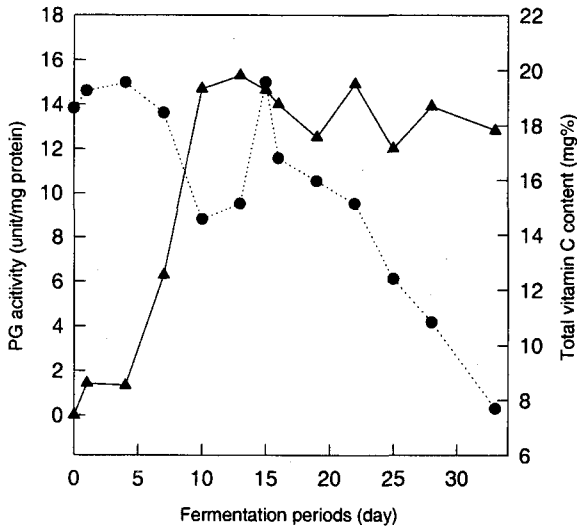


Fig. 2. Change of total vitamin C content and polygalacturonase activity during fermentation of kimchi at 20°C.

김치 발효 중 총 비타민 C 함량 및 polygalacturonase (PG) 활성 변화

김치의 발효 기간별 총 비타민 C의 함량 및 pectin 분해효소 PG의 활성 변화는 Fig. 2에 나타내었다. 김치 발효 중 비타민 C의 함량변화의 경우 김치 담금 직후 18.62 mg%, 8시간 19.57 mg%, 24시간 19.25 mg%, 발효 2일, 3일째는 각각 19.25, 19.56 mg%로 나타나 담금 직후보다 발효 3일째까지는 약간 상승하였고, 숙성 15일째는 19.58 mg%로 초기 비타민 C 함량보다 다소 높게 측정이 되었다. 이 후 김치가 산패되면서 다시 비타민 C 함량의 감소를 나타내어 발효 33일째는 7.70 mg%로 담금 직후의 약 1/3 수준으로 감소되었다. 김치의 숙성 중에 일어나는 비타민 C의 함량 변화에 대한 연구 중 이 등⁽³⁵⁾은 숙성초기에 일단 감소된 후 약간 증가경향을 보이다가 점차 감소되어 산패시에는 30%만이 잔존하였다고 보고하였다. 본 연구에서는 비타민 C의 함량이 숙성 초

Table 1. Identification of yeasts isolated from kimchi

Fermentation time (day)	Code of yeast isolated	Identification
14	1	<i>Pichia onychis</i>
	3	<i>Pichia onychis</i>
15	3	<i>Pichia onychis</i>
16	4	<i>Pichia onychis</i>
19	6	<i>Pichia rabaulensis</i>
22	3	<i>Pichia onychis</i>
24	4	<i>Pichia jadinii</i>
28	2	<i>Candida humilis</i>
33	1	<i>Pichia jadinii</i>
	2	<i>Pichia onychis</i>
	3	<i>Pichia jadinii</i>
	5	<i>Pichia jadinii</i>

기의 일시적인 증가와 함께 숙성 후반기인 산패시에 다시 증가되는 경향을 보였는데 초기의 비타민 C 함량의 증가는 김치 재료내 효소에 기인되는 것으로 생각되었으나, 김치가 산패되는 시기에 비타민 C 함량이 다시 한 번 증가되는 것은 김치에 생육하는 미생물이 분비한 효소가 PG의 작용으로 생성된 galacturonic acid를 기질로 이용하여 비타민 C를 합성하는 것으로 생각되어 PG의 활성을 비타민 C 함량의 변화와 함께 살펴보았다. PG의 초기 활성은 1.43 unit/mg protein으로 낮은 활성을 보였으나, 발효 10일 이후로 PG활성이 증가하여 발효 10일에는 14.7 unit/mg protein, 13일에는 15.3 unit/mg protein으로 증가하였으며, 이 후 점차 감소되었다. 이는 김치의 비타민 C함량이 다시 증가되었던 발효 15일과 유사한 시기에 PG의 활성이 증가되어 김치내 비타민 C 합성 효소가 PG의 활성으로 생성된 galacturonic acid를 기질로 사용하여 비타민 C를 합성한 것으로 생각되었다. PG의 활성증가에 대해서 육 등⁽³⁶⁾은 PG 역가가 김치가 숙성함에 따라 감소하다가 말기에 증가하는 양상을 이라고 하였으며, 후기 활성 증가 현상은 미생물이 분비하는 PG 때문으로 추정하였다. 또한 박 등⁽³⁷⁾은 발효 13일 이후 pH가 3.8~3.9로 안정된 값을 보이는 발효 후기에 김치 즙액과 고형분의 PG 활성이 초기활성과 비교시 현저한 증가를 보인다고 하였으며, 김치 숙성 초기의 김치 국물내의 PG 활성 증가 현상은 김치 고형분에서 유출되는 효과이며 김치 후기의 PG 활성 증가 현상은 미생물이 분비하는 PG에 의한다고 추정하였다.

효모의 분리와 배양 및 동정

김치의 발효, 숙성 기간 중 효모는 총 85균주가 분리되었고, 분리된 효모 중 비타민 C 합성능이 우수한 균주를 선별하였다(Table 1). 진탕 배양한 후 배지에 생성된 비타민 C의 함량은 담금 직후부터 발효 13일까지 분리된 효모에서는 0.76 mg%~2.66 mg%의 값으로 큰 차이 없이 비타민 C의 함량이 낮게 측정되었다. 반면, 발효 14일 이후 증가되어 15일째 분리된 15-3 균주의 경우 9.43 mg%, 16일째 분리된 16-4 균주의 경우 10.62 mg%의 높은 함량을 보였다. 이는 김치의 산패시에 비타민 C함량이 일시적으로 증가한 시기와 일치되는 것으로 김치내 생육하는 효모가 생산하는 비타민 C 합성 효소

Table 2. Purification of L-galactono- γ -lactone oxidase from *Pichia onychis* 16-4 isolated from kimchi

Step	Protein (mg)	Activity (units) ¹⁾	Specific activity (unit/mg protein)	Fold
crude enzyme solution	0.644	4.68	7.26	1
Sephadex G-25	0.046	3.96	86.08	11.86
DEAE-Sephadex A-50	0.032	6.00	188.44	25.96
Hydroxylapatite	0.044	11.26	256.00	35.30
Sephacryl S-200 HR	0.038	178.94	4,698.00	647.10

¹⁾unit: The content of vitamin C produced by enzyme solution 1 mL for 20 min.

가 PG에 의해 생성된 galacturonic acid를 기질로 사용하여 비타민 C를 합성하는데 기인되는 것으로 생각되었다. 진탕 배양시 높은 비타민 C 함량을 나타낸 효모를 동정한 결과 *Pichia*, *Candida* 2종류의 속만 동정되었는데 14-1, 14-3, 15-3, 16-4, 22-3, 33-2균주는 모두 *Pichia onychis*로 나타났고, 19-6균주는 *Pichia rabaulensis*, 24-4, 33-1, 33-3, 33-5 균주는 *Pichia jadinii*, 28-2 균주는 *Candida humilis*로 각각 동정되었다.

효소의 정제

분리, 동정된 효모 중 진탕 배양시 가장 높은 비타민 C를 생성한 *Pichia onychis* 16-4균주로부터 조효소액을 추출하였고, 이 조효소액을 4단계의 column을 사용하여 정제를 하였으며, 그 결과는 Table 2에 요약하였다. 조효소액의 specific activity는 7.26 unit/mg protein이었으며 추출된 조효소액을 Sephadex G-25 column으로 추출한 후 농축한 결과 효소활성은 86.08 unit/mg protein이었고, 이 조효소액을 DEAE-Sephadex A-50 column을 통과시킨 후에는 효소활성이 188.44 unit/mg protein이었으며, Hydroxylapatite column에 통과시킨 조효소액의 활성은 256.00 unit/mg protein으로 농축되었다. 이 농축액을 다시 Sephacryl S-200HR column에 통과시킨 효소활성은 4,698 unit/mg protein으로 나타나 처음보다 647.10배로 농축되었음을 알 수 있었다.

효소의 분자량

SDS-PAGE를 사용하여 분자량을 확인한 결과, 3개의 sub-units를 갖는 효소로 정제된 효소의 분자량은 31,000, 39,000, 50,000 KD으로 확인되었다(Fig. 3). 이는 Bleeg 등⁽¹²⁾이 빵 효모에서 분리, 정제한 효소인 L-galactono- γ -lactone oxidase (E.C. 1.1.3. 24)의 분자량인 74,000 KD으로 확인된 것과 김치생육 효모에서 분리한 효소의 분자량은 차이를 보였다. 그러나 Sugisawa 등⁽⁸⁾이 *Gluconobacter oxydans* DMS 4025에서 분리한 L-gulono- γ -lactone dehydrogenase는 분자량 110,000 KD으로 3개의 subunits(61,000 KD, 32,500 KD, 16,500 KD)을 갖는 효소로 본 연구에서도 정제된 효소가 3개의 band를 나타내어 위 결과와 유사함을 알 수 있었다.

효소의 특성

기질 특이성: 김치에서 분리한 효모 *Pichia onychis* 16-4가 분비하는 비타민 C 합성효소인 L-galactono- γ -lactone oxidase의 기질 특이성 Table 3에 나타내었다.

각각의 기질은 L-galactono- γ -lactone을 기준 기질로 하였을 때 이에 대한 상대적인 활성치로 나타내보면 L-galactono- γ -

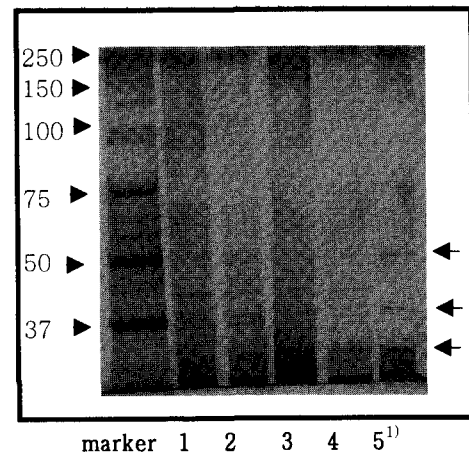


Fig. 3. SDS-PAGE of protein samples from different purification steps of L-galactono- γ -lactone oxidase.

¹⁾Marker: Precision Protein Standards (25~250 KD), Line 1: Supernatant of homogenization (crude enzyme), Line 2: Sephadex-G25 column chromatography, Line 3: DEAE-Sephadex A-50 column chromatography, Line 4: Hydroxylapatite column chromatography, Line 5: Sephacryl S-200 HR column chromatography.

lactone이 100%, D-galacturonic acid는 69.87±4.3%, L-gulono- γ -lactone은 36.88±6.57%를 나타내어 L-galactono- γ -lactone이 가장 좋은 효소의 기질로 사용되었음을 알 수 있었다. 그 외 D-gulono- γ -lactone, D-gluconic acid, D-xylose에서는 효소 활성이 측정되지 않았다. 10종의 기질 중 최대 효소활성을 보인 L-galactono- γ -lactone의 농도를 2, 4, 6, 8, 8.4, 10, 20 mM로 농도를 달리하였을 때 효소의 활성을 측정할 경우 효소의 농도에 따른 효소활성은 기질 농도 8.4 mM에서 100%로 최고 활성을 보였고 L-galactono- γ -lactone의 Km값은 4.75 mM이었으며, 10 mM과 20 mM에서는 기질저해를 받아 95.9%, 66.8%로 효소활성이 감소되었다. Nishikimi 등⁽¹⁰⁾이 빵 효모에서 분리, 정제한 L-galactono- γ -lactone oxidase의 기질로 L-galactono- γ -lactone이 100%, L-gulono- γ -lactone은 32%가 기질로 사용이 된 반면, D-glucono- γ -lactone, D-mannono- γ -lactone 등은 3.0% 미만의 활성을 보여 기질로 사용이 되지 않은 것으로 보고하여 본 연구의 김치에서 분리한 효모의 비타민 C 합성 효소의 기질 특이성은 이와 유사한 결과를 보였다.

pH 특이성: 효모에서 분리한 효소활성에 대한 최적 pH와 pH 안정성을 조사하기 위해 pH 3.0, 4.0 5.0, 6.0, 7.0, 7.5,

Table 3. Substrate specificity of the purified L-galactono-γ-lactone oxidase

Substrate ¹⁾	Relative activity(%)
L-Galactono-γ-lactone	100.00 ± 6.09
D-Galactono-γ-lactone	3.17 ± 3.04
L-Gulono-γ-lactone	36.88 ± 6.57
D-Gulono-γ-lactone	0
D-Galacturonic acid	69.87 ± 4.30
D-Glucuronic acid	3.17 ± 3.04
D-Gluconic acid	0
D-Galactose	3.17 ± 3.04
D-Xylose	0
D-Glucose	3.88 ± 2.48

¹⁾The concentration of each substrate was 8.4 mM.

Table 4. Effects of pH on the activity of the purified L-galactono-γ-lactone oxidase

pH value	Relative activity (%) Buffer used (10 mM)	
	Potassium phosphate buffer (A)	(B)
3.0	0	0
4.0	0	0
5.0	40.46 ± 14.22	39.25 ± 3.88
6.0	29.17 ± 4.36	96.34 ± 8.38
7.0	56.89 ± 10.67	100.0 ± 5.48
7.5	83.58 ± 28.45	64.36 ± 3.88
7.8	100.0 ± 0	70.75 ± 3.17
8.0	41.49 ± 13.07	48.82 ± 15.83
8.5	56.89 ± 0.01	42.42 ± 11.63
9.0	0	4.04 ± 3.88

(A) and (B) for the optimum pH and the pH stability respectively.

7.8, 8.0, 8.5, 9.0의 범위에서 potassium phosphate의 상대적 인 효소 활성과 안정성을 측정하였다(Table 4).

효모에서 분리, 정제된 효소는 potassium phosphate buffer의 경우 pH 3.0~4.0과 pH 9.0을 제외한 영역에서 효소 활성이 측정되었는데 pH 7.5가 상대적인 효소활성이 83.58 ± 28.45%을 나타내어 기준이 되는 pH 7.8과 효소활성과 가장 유사한 활성을 보였다. 효소의 pH 안정성은 최적 pH의 경향과는 다른 결과를 보여 potassium phosphate buffer의 경우 pH 6.0~pH 7.0 범위에서 잔존하는 효소활성이 높게 나타났다. 효소의 최적 pH는 효소의 안정성 pH 범위보다 높은 것을 확인하였다. 김치 발효 중 pH 3~3.5부근에서 비타민 C가 증가됨에도 불구하고 효소의 활성이 pH 4.0이하에서 측정되지 않은 현상은 첫 번째로 정제된 효소의 pH활성을 측정하는데 사용되는 buffer의 종류, 온도 조건등에 따라 효소의 활성이 달라질 수 있으며⁸⁾, 두 번째로 김치의 경우 복잡한 발효현상이 일어나는 매체로 아미노산, 당류등의 발효부산물들에 의한 buffering현상이 일어나 같은 pH조건이라 하더라도 효소 활성에 차이를 보이는 것으로 생각되었다.

Sugigawa 등⁸⁾에 의하면 *Gluconobacter oxydans* DSM 4025균주가 생산하는 L-gulono-γ-lactone dehydrogenase은

Table 5. Effects of temperature on the activity of purified L-galactono-γ-lactone oxidase

Temperature (°C)	Relative activity (%)
4	19.36 ± 3.34
10	6.43 ± 4.99
20	16.46 ± 19.03
25	15.58 ± 7.88
30	36.69 ± 1.92
35	100.00 ± 8.81
37	42.49 ± 8.17
40	18.48 ± 4.75
45	2.84 ± 4.02
50	0
55	0
60	0

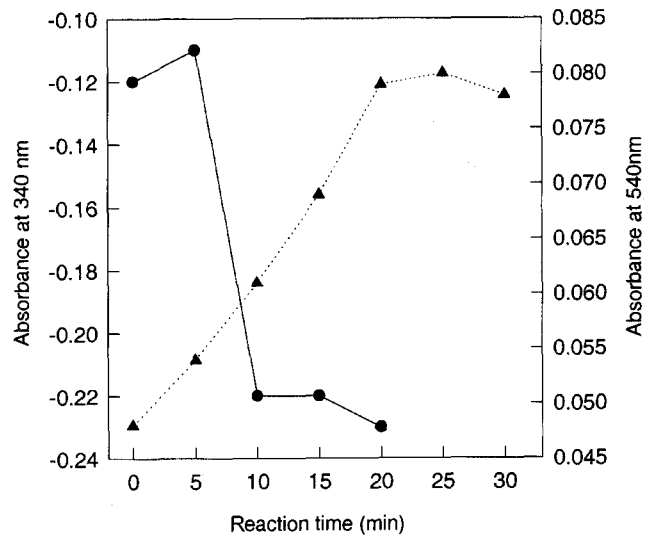


Fig. 4 Absorption spectrum of oxygen consumption due to the enzymic oxidation of L-galactono-γ-lactone oxidase.

MacIlvain buffer에서는 pH 6.5~pH 8.0가 효소의 안정성 범위라고 할 수 있고 potassium phosphate buffer의 경우는 pH 6.0에서 pH 7.5가 안정한 범위로 측정되었다. 또한, Tris-HCl buffer의 경우는 pH 7.0에서 pH 8.0까지가 안정한 범위로 본 연구에서 측정된 pH의 안정성 범위도 위 결과와 유사한 범위에 속함이 확인되었다.

온도 특이성: 효모가 생산하는 비타민 C 합성효소의 반응 온도에 따른 활성을 측정하기 위해서 8.4 mM L-galactono-γ-lactone과 10 mM potassium phosphate buffer(pH 7.8)를 사용하여 37°C에서의 활성을 100%로 하여 상대적인 활성을 나타내었다(Table 5).

효소 반응에 대한 온도 범위는 4~60°C로 50°C 이후에서는 효소 활성이 측정되지 않았고, 35°C 효소활성과 비교시 25°C의 경우 15.58 ± 7.88%이었으며, 30, 37°C의 경우 각각 36.69 ± 1.92% 와 42.49 ± 8.17%로 나타나 35°C가 효소 반응의 최적 온도임을 알 수 있었다. Sugigawa 등⁸⁾에 의하면 *Gluconobacter oxydans* DSM 4025균주가 생산하는 L-gulono-γ-lac-

tone dehydrogenase은 55, 60°C에서는 효소 활성의 각각 50%와 80%를 상실한다고 하였으며, 최적 온도는 30°C인 것으로 나타나 본 연구의 최적 온도는 위 연구결과 보다 다소 낮게 나타났다.

산소 소비도: 비타민 C와 hydrogen peroxide는 L-galactono- γ -lactone oxidase에 의해 촉매되는 반응에 의해 생겨나는 것으로 hydrogen peroxide는 산소로부터 생성이 되는 것이다⁽¹⁰⁾. 본 연구에서 분리, 정제된 효소가 전자수용체로 산소공여와 탈 수소 중 어떤 것을 통하여 이용하는지 알아보기 위해 정제된 효소액에 200 mM L-galactono- γ -lactone과 0.5 mM NADP*를 첨가하여 흡광도를 측정 한 결과(Fig. 4) 반응 시간 동안 340 nm에서는 흡광도의 증가를 볼 수 없었다. 즉, 효소가 전자 수용체로 수소를 활용하지 않는다는 것을 알 수 있었으며 정제 된 효소액에 8.4 mM L-galactono- γ -lactone과 peroxidase reagent를 첨가한 후 시간이 지나면서 반응이 진행 될수록 540 nm에서 흡광도가 상승되었으며, 반응 25분 이후에는 흡광도가 다소 감소되는 것을 보여 산소를 전자수용체로 함을 알 수 있었다.

이 결과로부터 김치에서 분리한 효모는 호기성 미생물이며 이 효모가 생산하는 효소는 산소를 전자 수용체로 하여 비타민 C와 H₂O₂를 생성하는 L-galactono- γ -lactone oxidase라고 생각되었다.

요 약

본 연구는 김치의 발효 말기에 비타민 C의 증가 현상을 조사하였으며, 이는 김치 발효 후기에 생육하는 효모에 의한 현상으로 미생물인 효모에서 비타민 C 생합성 경로를 밝히기 위해 수행된 것으로 그 결과는 다음과 같았다. 김치의 숙성에 따른 pH와 총 산함량의 변화는 김치가 숙성되면서 pH는 담금 초기 5.29에서 숙성 33일에 pH 3.50으로 감소되었고, 총 산함량은 담금 초기 0.24%에서 숙성 33일에 2.48%로 증가되었으며, 비타민 C의 함량을 측정 한 결과 발효 3일째 까지 점점 상승하다 감소되었으나, 발효 15일째는 19.58 mg%로 초기 함량보다 다소 높게 측정되었다. 김치의 PG 활성은 김치 숙성초기에는 낮았으나, 김치 숙성 10일 이후부터 증가되어 발효 13일에는 15.4 unit/mg protein으로 PG활성이 증가하는 경향을 보였다. 김치에서 분리된 효모 중 배양액의 비타민C의 함량이 높게 측정된 효모를 선별하였으며, 동정결과 *Pichia onychis*, *Pichia rabaulensis*, *Pichia jadinii*, *Candida humilis*로 각각 동정되었다. 분리, 동정된 효모 중 비타민 C생성량이 가장 높았던 *Pichia onychis* 16-4 균주로부터 비타민 C 합성 조효소액을 추출하였으며, specific activity는 7.26 unit/mg protein로 나타났다. 최종 정제 시 효소활성은 4,698 unit/mg protein으로 나타나 처음보다 647.10배로 농축되었음을 알 수 있었다. 정제된 효소액의 분자량은 31,000, 39,000, 50,000 KD으로 3개의 subunits를 갖는 것이 확인되었다. 정제된 효소는 L-galactono- γ -lactone를 최적 기질로 사용하였으며 35°C에서 pH 7.8일때 최적활성을 나타내었다. 본 연구에서 정제된 효소는 산소를 전자수용체로 하는 L-galactono- γ -lactone oxidase임을 알 수 있었다.

감사의 글

이 연구는 한국학술진흥재단 2000년도 신진연구인력장려금(D00039) 지원으로 수행된 연구로 연구비 지원에 감사드립니다.

문 헌

- Ostergaard, J., Persiau, G., Davey, M.W., Bauw, G. and Van Montagu, M. Isolation of cDNA coding for L-galactono- γ -lactone dehydrogenase, an enzyme involved in the biosynthesis of ascorbic acid in plants: purification, characterization, cDNA cloning, and expression in yeast. *J. Biol. Chem.* 272: 30009-30016 (1997)
- Wheeler, G.L., Jones, M.A. and Smirnoff, N. The biosynthesis pathway of vitamin C in higher plants. *Nature* 393: 365-369 (1998)
- Mapson, L.W. and Breslow, E. Biological synthesis of L-ascorbic acid: L-galactono- γ -lactone dehydrogenase. *J. Biochem.* 68: 395-406 (1958)
- Oba, K., Ishikawa, S., Nishikawa, M., Mizuno, H. and Yamamoto, T. Purification and properties of L-galactono- γ -lactone dehydrogenase, a key enzyme for ascorbic acid biosynthesis, from sweet potato roots. *J. Biochem.* 117: 120-124 (1995)
- Sakano, K. and Asahi, T. Biochemical studies on biogenesis of mitochondria in wounded sweet potato root tissue I. Time course analysis of increase in mitochondria enzyme. *Plant Cell Physiol.* 12: 417-426 (1971)
- Burns, J.J. Missing step in man, monkey and guinea pig required for the biosynthesis of L-ascorbic acid. *Nature* 180: 533-538 (1957)
- Chaudhuri, C.R. and Chatterjee, I.B. L-Ascorbic acid synthesis in birds: The phylogentic trend. *Science* 164: 435-436 (1969)
- Sugisawa, T., Ojima, S., Matzinger, P.K. and Hoshino, T. Isolation and characterization of a new vitamin C producing enzyme (L-galactono- γ -lactone dehydrogenase) of bacterial origin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59:190-196 (1995)
- Takahashi, T., Murakawa, S. and Masataka, B. Ascorbic acid analogs as indirect products of *Serratia marcescens*. *Agric. Biol. Chem.* 40:1255-1256 (1976)
- Nishikimi, M., Noguchi, E. and Yagi, K. Occurrence in yeast L-galactonolactone oxidase which is similar to a key enzyme for ascorbic acid biosynthesis in animals, L-gulonolactone oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 191: 479-486 (1978)
- Nishikimi, M., Noguchi, E. and Yagi, K. Redox properties of L-galactonolactone oxidase purified from baker's yeast. *Biochem. Int.* 1: 155-161 (1980)
- Bleeg, H. and Christensen, F. Biosynthesis of ascorbate in yeast. *Eur. J. Biochem.* 127:391-396 (1982)
- Alexander, A.G., David, A.B. and Alan, B.B. Ascorbate free radical reductase mRNA levels are induced by wounding. *Plant Physiol.* 108: 411-418 (1995)
- Kiuchi, K., Nishilimi, M. and Yagi, K. Purification and characterization of L-gulonolactone oxidase from chicken kidney microsomes. *Biochemistry* 21: 5076-5082 (1982)
- Nishikimi, M., Tolbert, B.M. and Udenfriend, S. Purification and characterization of L-gulonolactone oxidase from rat and goat liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 175: 427-435 (1976)
- Smirnoff, N. The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Ann. Bot.* 78: 661-669 (1996)
- Mapson, L.W. and Isherwood, F.A. Biological synthesis of L-ascorbic acid: the conversion of derivatives of D-galacturonic acid to L-ascorbic acid in plant extracts. *J. Biochem.* 64: 13-22 (1956)
- Isherwood, F.A. and Mapson, L.W. Ascorbic acid metabolism in plants. Part II. Biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 13: 329-350 (1962)
- Huh, W.K., Kim, S.T., Yang, K.S., Seok, Y.J., Hah, Y.C. and

- Kang, S.O. Characterization of D-arabinono-1,4-lactone oxidase from *Candida albicans* ATCC 10231. *Eur. J. Biochem.* 225: 1073-1079 (1994)
20. Murakawa, S., Sano, S., Yanashita, H. and Takahashi, T. Biosynthesis of D-erythroascorbic acid by *Candida*. *Agric. Biol. Chem.* 41: 1799-1800 (1977)
21. Kenney, W.C., Edmonson, D.E., Singer, T.P., Nishikimi, M., Noguchi, E. and Yagi, K. Identification of the covalently bound flavin of L-galatonolactone oxidase yeast. *FEBS Lett.* 97: 40-42 (1979)
22. Lee, J.W. The study of factor on biosynthesis of vitamin C during *kimchi* fermentation. M.S. thesis, Seoul National Univ., Seoul, Korea (1973)
23. Lee, T.Y. and Lee, J.W. Effects of galacturonic acid added and vitamin C contents of *kimchi* during fermentation. *Agricultural Chem. Biotechnol.* 24: 139-144 (1981)
24. Postlmary, H.L., Luh, B.S. and Leonard, S.J. Characterization of pectic changes in freestone and clingstone peaches during ripening and processing. *Food Technol.* 10: 618-623 (1966)
25. Ju, H.K. and Cho, K.S. *The Analysis of Food*. Hack-Moon Press, Seoul, Korea (1995)
26. Miller, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31: 426-431 (1959)
27. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254 (1976)
28. Bio-Rad Laboratories. *Bio-Rad Protein Assay*. Bio-Rad Corp., Hercules, USA (1997)
29. Difco Laboratories. *Difco Manual*, 10th ed. Becton Dickinson Co., Sparks, USA (1984)
30. Hancock, R.D., Galpin, J.R. and Viola, R. Biosynthesis of L-ascorbic acid (vitamin C) by *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 186: 245-250 (2000)
31. Bollag, D.M. and Edelstein, S.J. *Protein Methods*. 2nd ed., pp. 95-127. Wiley-Liss, Inc., New York, USA (1991)
32. Promega Laboratories. *Silver Staining Protocol*. Promega Co., Madison, USA (1999)
33. Sigma Laboratories. *Glucose(GO) assay Kit GAGO-20*. Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA (1997)
34. Choe, G.J. The study of yeast isolated from *kimchi*. *Korean J. Appl. Microb. Biotechnol.* 16: 1-10 (1970)
35. Lee, H.S., Ko, Y.T. and Lim, S.J. Effects of protein sources on *kimchi* fermentation and on the stability ascorbic acid. *Korean J. Nutr.* 17: 101-107 (1984)
36. Yook, C., Chang, K., Park, K.H. and Ahn, S.Y. Pre-heating treatment for prevention of tissue softening of radish root *kimchi*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 17: 447-453 (1985)
37. Park H.O., Kim, Y.K. and Yoon, S. Study of enzyme system during *kimchi* fermentation. *Korean Soc. Food Cooking Sci.* 7: 1-7 (1991)

(2003년 6월 2일 접수; 2003년 12월 12일 채택)