

Streptococcus faecium M₇₄·LC에 의한 L- α -Glycerophosphate Oxidase의 생산

이인애 · 이은숙* · 이준우**†

경북대학교 농업과학기술연구소

*경산대학교 한의예과

**경북전문대학 식품가공조리과

Production of L- α -Glycerophosphate Oxidase by *Streptococcus faecium* M₇₄·LC

In-Ae Lee, Eun-Sook Lee* and June-Woo Lee**†

Institute of Agricultural Science and Technology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

*Dept. of Preparatory Oriental Medicine, Kyungsan University, Daegu 712-240, Korea

**Dept. of Food Processing and Cooking, Kyungbuk College, Youngju 750-712, Korea

Abstract

The objective of this study was to search for the best strain as a source of L- α -glycerophosphate oxidase (GPO) production and to establish the process technology for the purification of GPO on an industrial scale. The GPO was produced by culturing *Streptococcus faecium*, and purified by ammonium sulfate, DEAE-cellulose and hydroxyapatite chromatography. The relative activity was 60 units/L for *S. faecium* ATCC 12755, 65 units/L for *S. faecium* ATCC 19634, and 67 units/L for *S. faecium* M₇₄·LC, respectively. The optimum condition for fermentation was 37°C for temperature, 300 rpm for stir rate, 0.5 L/min for aeration rate and 17 hours. The main culture medium prepared by the modified AC medium. AC medium consists of 0.1% glucose, 0.2% glycerol, 1.0% tryptone and 1.0% yeast extract, 0.5% K₂HPO₄, pH 7.0. The GPO was purified by ammonium sulfate fractionation and ion exchange column chromatography. The yield and purity were 17.2% and 5.3 fold, respectively.

Key words: L- α -glycerophosphate oxidase, GPO production, *Streptococcus faecium*, triglycerides

서 론

L- α -Glycerophosphate oxidase(glycerol-3-phosphate: O₂-oxidoreductase, E.C. 1.1.3.21, GPO)는 flavin adenine dinucleotide(FAD)를 함유한 flavo-protein으로 알려져 있다(1). 이것은 인간의 체내에는 존재하지 않으며 주로 돼지의 뇌나 근육에 존재하고(2), 미생물의 경우에 효모 중에는 *Candida utilis*, 세균 중에는 *Escherichia coli* K-12(3), *Lactobacillus casei*, *Streptococcus faecium*(4), *Pediococcus* 속, *Aerococcus* 속(5), *Leuconostoc* 속 및 *Propionbacterium* 속(2,6) 등 주로 유산균들에서 많이 존재한다고 보고되었다. 세균성 GPO는 세포내 효소로서 dihydroxyacetonephosphate에서 L- α -glycerophosphate로 산화반응을 촉매하는 것으로 알려졌다(1). 이러한 성질을 이용하여 triacylglycerols(7), glycerol(8) 및 phospholipids를 측정하는데 이용되고 있다(9). 미생물의 세포 내에 존재하는 GPO는 지질대사에 매우 중요한 역할을 수행하고 있으며, 이들의 대부분은 glycerol에 의해 유도되는 것으로 알려졌다(2). 또한 다양한 미생물들에서 유래된 GPO

는 양수 내의 α -glycerophosphate, 혈청내의 마그네슘, 혈청 triglyceride, 포도주에 함유된 glycerol을 정량하는 등 다양한 목적에 이용되고 있으며, 임상적으로는 동맥경화증 위험요인의 진단을 위해 이용되고 있다(7,10,11).

Triglyceride 함량 증가는 심각한 동맥 경화증, 요독증, 갑상선질환, 신장질환, 간 폐색, 당뇨병 등의 내과 질환과 관련되기 때문에 혈액에 존재하는 triglyceride의 양(8)을 측정하는 것은 lipidemia를 진단한다는 의미에서 볼 때 매우 중요한 일이다. 혈액 중에 있는 triglyceride의 함량을 측정하는 방법에는 종래의 임상 화학적 방법인 Van Handel과 Zilversmit 방법 또는 Hantgch 농축 반응법 등이 이용되었으나, 이들의 방법은 혈액을 용매로 추출하고 비누화 반응, 산화를 거쳐야 하므로 복잡하고 많은 시간이 소요되는 단점을 갖고 있기 때문에 기질 특이성을 갖고 있는 효소를 사용하여 간편하게 triglyceride량을 측정하는 방법(12)이 개발되었다. 그 중 L- α -glycerophosphate oxidase 효소를 이용하는 방법은 가시광선 범위 내에서도 측정이 가능할 뿐만 아니라 사용되는 염료 시약의 가격도 저렴하여 간편하게 이용될 수 있는 장점

†Corresponding author. E-mail: jwlee@kbc.ac.kr
Phone: 82-54-630-5185, Fax: 82-54-630-5180

이 있어 많은 연구들이 진행되어 왔다(12,13).

따라서 본 연구에서는 혈액 중에 존재하는 triglyceride의 양을 측정하는 kit를 개발하기 위해, 산업적으로 유용한 미생물 유래 GPO를 생산하는 균주를 확보하고, 미생물 배양법을 통하여 GPO의 생산을 위한 배양 기술, 효소 분리 및 정제 등에 대한 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

우수 균주 선별 및 배지

Glycerol phosphate oxidase(GPO)를 생산하는 미생물 중에서 널리 연구되어지고 있는 *Streptococcus* 속을 선택하여 변형된 AC 액체 배지에서 통기, 진탕 배양하였다. 이때 사용한 *Streptococcus*속 균주로는 KCTC 2011, KCTC 2012, KCTC 2022와 ATCC 6057, ATCC 11576, ATCC 12755, ATCC 19634 및 본 연구실에서 분리한 *Streptococcus faecium* M74·LC 등의 8가지 균주를 사용하였다. GPO 생산을 위해 사용한 변형된 AC 배지의 조성은 0.1% glucose, 0.2% glycerol 0.1% yeast extract, 1.0% tryptone 10 g, 0.5% K₂HPO₄ 이고 pH는 7.0이다.

배양 조건 및 방법

일차 선별된 균주의 배양 조건에 대한 조사는 500 mL용 삼각플라스크에 100 mL의 배지를 넣고 멸균시킨 다음 3%의 종균을 접종하였다. 30°C 및 37°C에서 각각 배양한 균체는 660 nm에서 흡광도를 측정하여 세포증식 정도를 측정하였고, GPO의 역가를 비교하여 온도의 영향을 검토하였다.

발효조 배양

발효조에서의 배양조건을 확립하기 위해 3 L와 5 L 발효조(Korea Fermentor Co., Korea)를 이용하였다. 종균 접종량에 따른 영향은 접종량을 1, 3, 5 및 7%(v/v, %)씩 접종한 다음 균의 증식정도를 알아보았다. 발효조에서의 교반속도의 영향은 100, 200 및 300 rpm, 통기량의 영향은 0, 0.5, 1.0 및 1.5 (L/min)로 다르게 하여 배양을 실시한 다음, 흡광도를 이용한 미생물 증식도와 GPO 역가를 측정하였다.

균체량 측정

균의 증식정도의 측정은 배양액 1 mL를 취하여 spectrophotometer를 이용하여 660 nm에서 흡광도(OD)를 측정하였고, 습윤 중량의 경우는 10 mL의 배양액을 원심분리관에 넣고, 6,000×g에서 15분 동안 원심분리한 다음 측정하였다.

GPO 역가 측정

본 연구에서는 GPO의 역가를 측정하기 위해서 Koditschek 과 Umbreit가 사용한 염료 감색법을 적절히 변형시켜 2,6-dichlorophenol-indophenol을 사용하여 600 nm에서의 흡광도 변화를 시간에 따라 측정하였다. 또한 표준 GPO(Sigma chemical Co.)를 사용하여 1분간 감소한 흡광도량에 따라 표

준곡선을 작성하였고, 이 표준 곡선에 의거하여 시료의 GPO 역가를 측정하였다. 간략하면, 200 μ L의 1 mM 2,6-dichlorophenol-indophenol 용액, 100 μ L의 1 M α -glycerol phosphate 용액, 2.6 mL의 0.2 M 인산칼륨 완충용액(pH 7.0)을 순서대로 넣은 다음, 여기에 시료 용액이나 표준효소 용액을 100 μ L씩 넣고 잘 섞은 후 37°C에서 흡광도 변화를 측정하였다. 이러한 방법은 초기 반응 20초가 지난 뒤부터 100초 동안에 변화되는 흡광도를 측정하므로 2분 이내에 역가를 측정할 수 있다. 효소의 역가는 1분동안 1 μ M의 L-glycerol-3-phosphate를 산화시키는 양으로 정하였다.

효소의 추출 및 정제

효소의 추출은 배양이 완료된 배양액을 4°C에서 6,000×g로 15분간 원심분리하여 균체를 회수한 다음, 0.1 M 인산 칼륨 완충용액(pH 7.0)으로 세척한 다음, 초음파 파쇄기(Fisher, Model 300)로 파쇄한 시료액을 조효소액으로 이용하였다. 초음파 파쇄시간에 따른 영향을 알아보기 위하여 각각 6, 9, 12, 15, 18 및 21분 동안 초음파 처리한 후 GPO 역가를 측정하였다. 초음파 파쇄한 액에 1 M의 MnCl₂ 용액을 가하여 최종 농도가 10 mM 되도록 하여 4°C에서 1시간 동안 교반한 후 36,000×g로 10분간 원심 분리하여 상등액을 회수하였다.

효소의 정제는 6 mM EDTA가 함유된 50 mM 인산칼륨 완충용액(pH 7.0)에서 하룻밤 동안 투석시켜 36,000×g로 10분간 원심분리하여 침전물을 제거하였다. 투석이 완료된 시료액에 45% 황산암모늄을 첨가하고 1시간 동안 교반하여 20,000×g로 20분 동안 원심분리한 후 상등액에 다시 80% 황산암모늄을 가하여 4°C에서 1시간 교반, 원심분리하여 침전물을 회수한 다음 100 mM 인산칼륨 완충용액으로 2~3회 교환하여 투석한 다음, 원심분리하여 상등액을 얻어 DEAE-cellulose 이온 교환 수지에 통과시켰다. DEAE-cellulose 수지(resin)에 흡착시킨 GPO를 인산칼륨 완충용액으로 염도 구배용액(0.1~0.3 M KCl)을 만들어 용출시켜 GPO 역가가 있는 분획을 농축한 다음, 10 mM 인산칼륨 완충용액으로 2~3회 교환하며 투석하였다. 이것을 hydroxyapatite column에 가한 후, 10~100 mM 인산 완충 용액(pH 7.0)으로 구배 용출시켜 GPO 역가가 있는 분획을 모아서 동결건조하였다.

단백질 정량

단백질 정량은 Bradford 분석법(14)을 이용하였으며, 표준품으로는 BSA(bovine serum albumin)를 사용하였다. 단백질의 농도 결정은 280 nm와 260 nm에서의 흡광도를 측정하여 아래의 공식으로부터 구하였다.

$$\text{단백질(mg/mL)} = 1.55 \times A_{280} - 0.76 \times A_{260}$$

결과 및 고찰

우수 균주 선별

Streptococcus 속에 해당하는 8종의 미생물 균주로부터

우선적으로 GPO 생산성이 높은 균주를 선별하였다. 변형된 AC 액체배지에서 8가지 균주의 성장 상태를 비교하여 본 결과는 Fig. 1 및 2에 나타내었다. 이 결과로부터 대부분의 균주들에서는 접종 7시간 후에 가장 높은 균체성장을 나타내었으며, 이들 중 *S. faecium* M74·LC, *S. faecium* ATCC 19634 및 *S. faecium* ATCC 12755 순으로 나타났다. 또한 이들의 습윤 중량을 알아보기 위해, 원심분리에 의해 측정된 습윤 중량은 배양액 10 mL당 *S. faecium* M74·LC가 0.91±0.2 g, ATCC 12755는 1.26±0.2 g, ATCC 19634는 1.07±0.1 g으로 나타났다. GPO 생산을 위해서 사용되는 배지는 inducer로서 glycerol이 많이 이용되고 있는 것으로 알려졌다(15), 탄소 원으로는 lactose가 유리한 것으로 알려졌으나 본 연구의 경우는 glucose가 양호한 것으로 나타났다.

균주별 GPO의 역가를 측정해 본 결과는 Table 1에 나타내었다. 각각의 균주별 배양액 1 L당 GPO의 생성량은 *S. fae-*

cium M74·LC는 67 units, ATCC 19634는 65 units, ATCC 12755는 60 units를 생산하는 것으로 나타났다. ATCC 19634 균주의 경우는 균체의 습윤중량이 다른 두 균주보다 많으나, GPO의 생성량은 다소 떨어지는 현상을 보였다. 즉, *S. faecium* M74·LC의 경우가 단위 균체당 생산하는 GPO양이 ATCC 12755나 ATCC 19634보다 많은 것으로 나타났으며 8가지 중 ATCC 19634, ATCC 12755, *S. faecium* M74·LC가 GPO를 생산하는 목적에 적합한 균주임을 알 수 있었다. 따라서 이후에 수행되는 실험에는 *S. faecium* M74·LC의 균주를 이용하였다.

GPO 생산 조건

균체증식과 효소활성이 우수한 균주로 선발된 *S. faecium* M74·LC의 배양 온도에 대한 영향을 알아본 결과, 37°C에서 배양할 때 7~8시간이 경과되면 최고의 배양 상태에 도달하고 11~12시간까지 정지기가 지속되는데, GPO의 생산은 정지기 초기에서 가장 높게 나타났다(Fig. 3, 4). 30°C에서 배양하였을 경우는 정지기에 도달하는 시간이 37°C에서보다 4~5시간 더 소요되는 것으로 나타났다. 이와 같이 30°C와 37°C에서의 균 증식 및 GPO 생산량은 커다란 차이가 없었으나, 30°C에서 배양한 경우에는 많은 시간이 소요될 뿐만 아니라, 균체 생산량, GPO 생산량 모두 감소하는 현상을 보이므로 효소생산을 위한 배양온도는 37°C가 적합할 것으로 여겨진다.

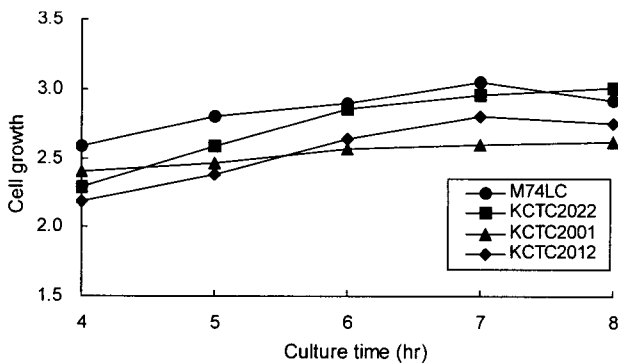


Fig. 1. Growth curve of *S. faecium* KCTC 2001, 2012, 2022 and *S. faecium* M74·LC. Cells were grown in modified AC medium at 37°C.

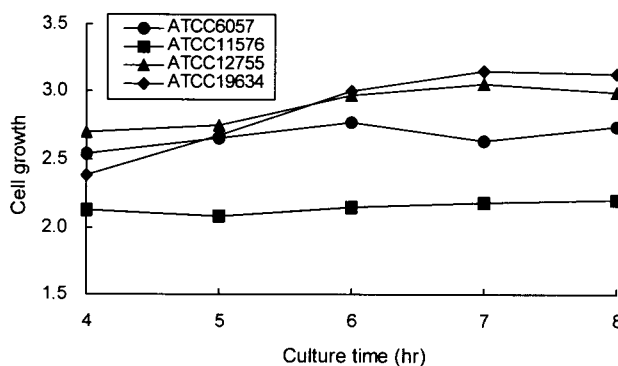


Fig. 2. Growth curve of *S. faecium* ATCC 6057, 11576, 12755, and 19635. Cells were grown in modified AC medium at 37°C.

Table 1. Production of L-α-glycerophosphate oxidase with various strain

Microorganisms	GPO activity	
	Flask culture	Fermentor culture
<i>S. faecium</i> ATCC 12755	60 units/L	91 units/L
<i>S. faecium</i> ATCC 19634	65 units/L	175 units/L
<i>S. faecium</i> M74·LC	67 units/L	256 units/L

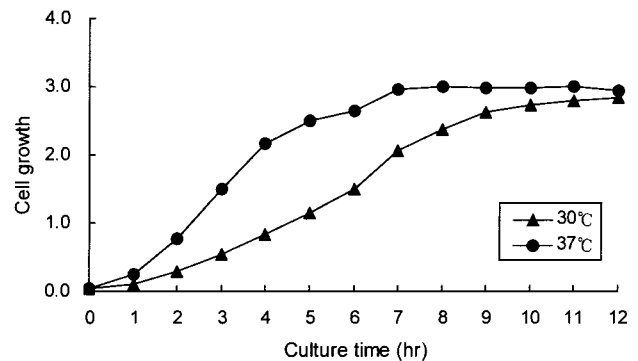


Fig. 3. Effect of temperature on the growth of *S. faecium* M74·LC.

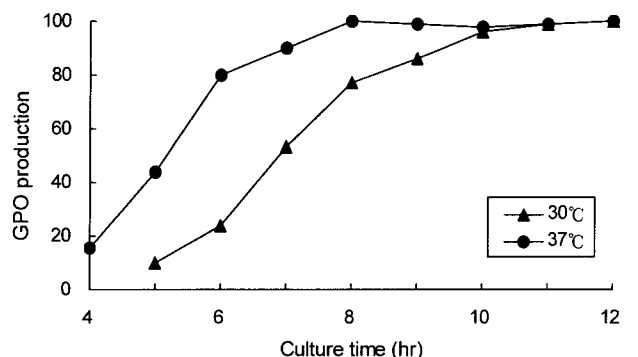


Fig. 4. Effect of culture temperature on GPO production.

발효조 배양

효소의 상업적 이용을 위해서는 발효조 배양이 이루어져야만 한다. 발효조에서 GPO생산을 최적화할 수 있는 조건을 찾기 위해 배지의 양을 3 L로 첨가한 후, 접종량, 교반속도, 통기속도 등의 조건을 변화시키면서 배양한 결과 종균의 접종량은 3%, 교반속도는 300 rpm, 통기량은 0.5 L/min일 때 가장 많은 균체가 생성되었으며, 이 때에 GPO의 생산량도 가장 높은 것으로 조사되었다(data not shown). 발효조의 크기에 따른 영향의 경우는 3 L 배양하였을 때는 17시간, 5 L 배양액에서는 22시간 배양 후에 정지기에 들어갔다(Fig. 5). 효소의 생산에 있어서는 발효조에서 배양했을 때 *S. faecium* M₇₄·LC는 배양액 1 L당 256 units의 GPO를 생산했는데, Mackova 등(5)에 의하면 삼각플라스크에서 배양한 경우보다 fermentor를 이용하여 배양한 경우, GPO의 활성이 20배 이상 증가하였다고 보고하였으나, 본 연구의 경우는 삼각 flask(L당 67 units)에서보다 약 4배정도 많은 GPO를 생산하는 것으로 나타났다(Table 1).

GPO의 정제

배양한 균액의 효소 추출조건을 알아보기 위해 초음파 파쇄기를 이용하여 파쇄시간에 따른 영향을 알아본 결과, 파쇄 시간에 따라 효소의 유리가 많아지는 것으로 나타났으나 18분 이후에는 오히려 감소하는 경향을 나타내었다(Table 2). 이후 MnCl₂와 황산암모늄을 첨가한 침전법을 이용하여 100 mM 인산칼륨 완충액(pH 7.0)으로 투석한 후 원심분리하여 얻은 상등액을 이온교환 크로마토그래피를 실시하였다. DEAE-cellulose에 흡착시킨 GPO를 인산칼륨 완충용액으

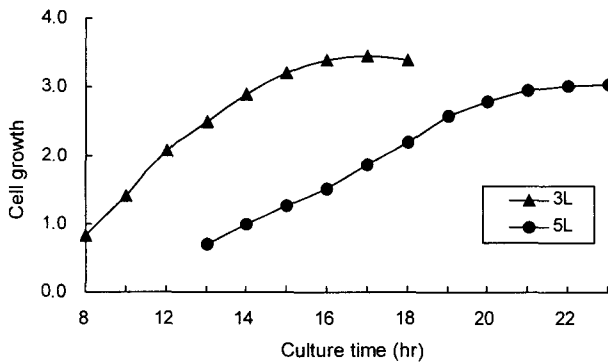


Fig 5. Cultivation of *S. faecium* M₇₄·LC in fermentor. Cell was cultivated modified AC medium at 37°C, 300 rpm and 0.5 L/min.

Table 2. Comparison of L- α -glycerophosphate oxidase activity at various sonication time

Sonication time (min)	GPO unit/100 μ L
6	0.33
9	0.46
12	0.52
15	0.57
18	0.65
21	0.60

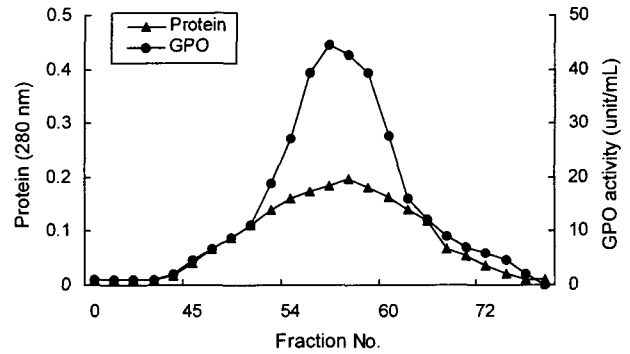


Fig. 6. The elution profile and the GPO activity of each fraction obtained from hydroxyapatite column chromatography.

로 염도구배 용액(0.1~0.3 M KCl)을 만들어 용출시켜, GPO의 활성이 높은 분획을 농축한 다음 hydroxyapatite column에 가하여 50 mM의 인산완충용액으로 용출시킨 결과는 Fig. 6과 같으며, 본 연구에서 시행한 GPO의 단계별 정제도를 요약하면 Table 3과 같다. DEAE-cellulose 칼럼을 이용한 정제수율은 약 47%이고, 효소의 비활성은 4배정도 증가하는 것으로 나타났다.

요 약

L- α -glycerophosphate oxidase(GPO)는 L- α -glycerophosphate를 산화시켜 dihydroxyacetone phosphate와 과산화수소의 생성을 촉매시켜 주는 효소로서 혈중에 존재하는 triglyceride의 양을 측정하는 kit를 개발하는데 이용할 수 있으며 본 연구 결과로 종균을 개발 및 확보하였으며, 이 종균의 사용으로 GPO의 발효공정기술을 확립하였고, 또한 이들 조효소로부터 순수한 효소를 생산할 수 있는 정제공정기술을 확립하였다. 먼저 ATCC에서 네 가지 균주와 KCTC에서 세 가지 균주, 그리고 본 연구실에서 분리한 *Streptococcus faecium* M₇₄·LC 균주 등 8가지 균주의 성장상태를 비교하고

Table 3. Summary of purification of L- α -glycerophosphate oxidase obtained from *S. faecium* M₇₄·LC

Step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)
Crude extract	210.0	2180.0	10.38	100.0
MnCl ₂	190.1	2058.0	10.83	94.4
45% (NH ₄) ₂ SO ₄ Supernatant	171.2	1921.5	11.22	88.1
80% (NH ₄) ₂ SO ₄ Precipitation	93.9	1066.0	11.35	48.9
DEAE-cellulose	24.8	1023.0	41.25	46.9
Hydroxyapatite	6.8	375.3	55.19	17.2

GPO의 역가를 측정해 본 결과, 배양액 1 L당 ATCC 19634는 65 units, ATCC 12755는 60 units, *S. faecium* M₇₄·LC는 67 units로 *S. faecium* M₇₄·LC가 제일 높은 역가를 생산하였다. 또한 발효조에서 배지의 양을 3 L로 하여 배양온도는 37°C, 교반속도는 300 rpm, 통기량은 0.5 L/min, 17시간 배양하였을 때 가장 많은 양의 균체가 생성되었으며, GPO의 생산량도 가장 많았다(256 units/L). 이때 배지 조성은 glucose 0.1%, glycerol 0.2%, tryptone 1.0%, yeast extract 1.0% 및 K₂HPO₄ 0.5%로 하여 배양하였고 GPO의 정제공정은 염투석 분획과 이온 교환수지 공정으로 대별할 수 있으며, 이온교환수지는 DEAE-cellulose 칼럼을 이용한 정제수율은 약 47%를 얻을 수 있었다.

문 헌

- Mackova M, Kost AI, Demnerova K. 2000. Properties and stability of glycerophosphate oxidase isolated from a mutant strain of *Aerococcus viridans*. *Letters in Applied Microbiology* 30: 188-191.
- Ince JE, Knowles CJ. 1990. NAD-independent α -glycerol-3-phosphate-dehydrogenase production. EP 353049.
- Sekula BC. 1986. Microbial production of triglyceride rich fats & oils. *J Am Oil Chem Soc* 63: 462-465.
- Suchova M, Demnerova K, Bond K, Kralova B. 1992. Production of L- α -glycerol phosphate oxidase by lactic acid bacteria. *Enzyme Microb Technol* 14: 917-922.
- Mackova M, Kostal J, Demnerova K. 1995. Effect of cultivation conditions on glycerophosphate oxidase production by mutant strain of *Aerococcus viridans*. *Microbiologia SEM* 11: 337-342.
- Ince JE, Macadam AM, Knowles CJ. 1987. L- α -glycerophosphate oxidase from *Propionibacterium freudenrichii*. *FEMS Microbiological Letters* 44: 185-191.
- McGowan MW, Artis JD, Strandbergh DR, Zak B. 1984. A peroxidase-coupled method for the colorimetric determination of rum triglycerides. *Clinical Chemistry* 29: 538-652.
- Tietg NW. 1986. *Textbook of clinical chemistry*. Elsevier Science, New York. p 889-890.
- Suchova M, Demnerova K, Valentova O, Ruml T. 1993. Purification of glycerophosphate oxidase isolated from mutant strain of *Aerococcus viridans*. *Biotechnol Tech* 7: 435-438.
- Efstratios RK, Miltiaes IK, Stella MT-K. 1998. Enzymatic methods for the determination of α -glycerophosphate and α -glycerophosphate oxidase with an automated FIA system. *Talanta* 45: 1015-1021.
- Wimmer MC, Artiss JD, Zak B. 1986. A kinetic colorimetric procedure for quantifying magnesium in serum. *Clin Chem* 32: 629-632.
- Sano T, Touda M, Aoyama T. 1993. Dry microbial cell fragments containing polyunsaturated triglycerides. EP 522470.
- Emi S, Kojima Y, Ando M. 1984. A process for producing α -glycerophosphate oxidase. USP 4463095.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Esders TW, Michrina CA. 1979. Purification and properties of L- α -glycerophosphate oxidase from *Streptococcus faecium* ATCC 12755. *J Biol Chem* 254: 2710-2715.

(2002년 12월 18일 접수; 2003년 7월 4일 채택)