

## 사상균 Naringin 분해효소에 관한 연구

### 제 2 보 *Aspergillus* 속 Naringin 분해효소의 정제에 관하여

기우경 · 김종규 · 김명찬

경상대학 농화학과

(1973년 1월 11일 수리)

## Studies on Naringinase of Mold

### Part 2. Purification of *Aspergillus* Naringinase

by

Woo Kyung Ki, Jong Kyu Kim and Myung Chan Kim

Department of Agricultural Chemistry, Kyung Sang College

(Received January 11, 1973)

#### Abstract

The naringin hydrolyzing enzyme has been purified from the culture filtrate of the mold *Aspergillus* S-1 which selected to remove the bitter test of the orange or citrus fruits industrially.

In a view of purity naringinase was more effectively purified in order of molecular sieving on Sephadex G-200, starach gel electrophoresis, chromatography or a DEAE-Cellulose column and fractional precipitation by ammonium sulfate.

The purified enzyme is homogeneous in paper electrophoresis from a culture filtrate by treatment fractional precipitation with ammonium sulfate, DEAE-Cellulose treatment and Sephadex-200 column chromatography and it hydrolyse only naringin to purunin.

#### 서 론

*Aspergillus* 속 중 naringin 분해력이 강하고 耐酸性, 耐糖性이며 비교적 고온에도 잘 작용하는 naringinase를 생산하며 pectin 분해 효소를 적게 생산하는 산업적 이용<sup>(1)</sup>에 적합한 균주인 *Aspergillus* S-1을 분리하여 조효소의 성질에 관하여는 전보<sup>(2)</sup>에서 보고한 바 있다. 여기서는 *Aspergillus* S-1 균주의 naringinase를 여러 방법으로 정제하여 이에 따른 결과와 이 효소의 몇 가지 성질에 관하여 조사한 바를 보고한다.

Naringin 분해 효소에 관해서는 岡田, 福本<sup>(3-9)</sup> 등의 *Aspergillus niger*의 naringin 분해 효소의 결정화와 耐糖性 기구에 관한 연구는 있으나 이 균을 제외한 다른 결과<sup>(10)</sup>는 많지 않다. 그리고 효소 자체에 관한 연구는

적기 때문에 본 연구는 이러한 naringin 분해효소 자체의 규명에 의의가 있는 것은 물론 夏蜜감의 재배에 기 후 조건이 적합한 우리나라에 있어 夏蜜감의 苦味를 감소시키므로써 가공에 많은 도움이 될 것이라 기대되므로 본 연구를 착수한 것이다.

#### 실험 방법

##### 1. 효소액의 조제

밀기울과 수도물을 같은 비율(w/v)로 배합하여 고압 살균한 배지에 *Aspergillus* S-1의 포자를 현수 접종하고 30°C 국실에서 3일간 배양하였다. 배양 진물에 대해 4배의 0.85% 식염수를 가하여 실온에서 30분간 침출시켜 가아제로 착즙하고 여과보조제 Celite 503을 사용, 여과하여 ① 粗酵素液으로 하거나 ② 이 粗酵素液을 환

산암모늄으로 완전포화 시킨 후 투석하고 이 투석액에 냉각한 acetone 을 85%되게 가한 후 침전물을 건조시켜 粗粉末 酵素로 하거나 ③ 이 粗酵素 粉末을 증류수에 용해하여 황산암모늄으로 분획 침전시켜 황산암모늄 0.75~ 완전 포화 분획물을 column chromatography 한 황산암모늄 분획효소로 나누어 각각 공시 효소로 사용하였다.

## 2. Naringin 분해효소의 역가 측정

### 1) 효소의 반응

0.625% naringin 기질액(McIlvaine buffer pH 4.0) 2ml와 효소액 0.5 ml를 加하여 최종 농도가 0.5% naringin 용액이 되게 한 다음 50°C에서 30분간 효소반응을 시켰다.

### 2) Naringinase의 역가

전보에서와 같이 Davis<sup>(11)</sup>법에 의한 flavonoid 정량을 이용한 것으로 위의 반응액 0.2 ml를 90% diethylen glycol 10 ml에 가하고 6 N NaOH 0.2 ml를 추가한 후 정확히 10분 후에 420 mμ(Spectrosomic 20)에서 흡광도를 측정하여 naringin 과 naringenin의 표준 발색도와 비교하여 0.5% 상기 기질액의 분해도를 구하고 10% 기질액을 분해한 것을 naringinase 역가로서 1 unit로 나타내었다.

## 3. 총 단백질 정량

Folin-Ciocalteu 법<sup>(12)</sup>으로 시료 1 ml를 2% NaCO<sub>3</sub> (0.1 N NaOH에 용해) 10 ml에 가한 후 30분~2시간 이내에 750 mμ에서 흡광도를 측정하여 표준 egg albumin의 발색도와 비교하여 단백질량을 구하였다.

## 4. 효소의 정제

### 1) Starch gel electrophoresis<sup>(13)</sup>

Starch gel 전기영동에 사용한 효소는 분말효소로서 이 粗酵素 50 mg을 전기영동 cell (0.7×2.1×31 cm)의 cathod 쪽 4 cm 지점의 starch gel에 주입하고, 전기영동기(Toyo Model DR-65)로 700 mv, 10 mv에서 63 시간, 3°C에서 전기영동 하였다. Starch gel은 potato starch(關東化學, extra pure)를 인산완충액 pH 5.4(이온강도 0.1 μ)에 24시간 팽윤시킨 후 사용하였으며 영동 후 0.5 cm씩 starch gel을 잘라 시험관에 넣고 McIlvaine buffer solution (pH 4.0) 2.0 ml를 가하여 3°C에서 24시간 용출시켜 이 용출액으로 총 단백질 정량과 naringinase 역가 측정에 사용하였다.

### 2) 황산암모늄 분별 침전

분말효소를 증류수에 용해하고 이 용액에 황산암모늄을 0.25 포화 되게 가하여 침전을 모아 투석하고 이를 황산암모늄 0.25 포화 분획으로하고 다시 여액에 황산암모늄을 0.5 포화 더 가하여 침전을 모아 소량의 증

류수에 용해하여 투석한것을 0.75 포화 분획으로 하였으며 다시 여액에 황산암모늄을 완전포화 되게 가한 후 침전물을 소량의 증류수에 용해 시킨 후 투석한 분획을 완전 포화분획으로 하여 각각의 분획의 효소활성과 단백질 함량을 구하여 정제도를 검토 하였다.

### 3) Column chromatography에 의한 정제

사용한 효소는 완전 포화 분획의 효소(1의③)로 이 효소액을 polyethylene glycol로 3°C에서 24시간 농축한 것으로 각 column에 적당량씩 사용하였다.

#### ㉔ Sephadex G-200에 의한 정제<sup>(14)</sup>

Sephadex G-200 3.5 g을 1 M acetate buffer solution (pH 4.0)에 24시간 충분히 팽윤시키고 이를 2.4×27 cm column에 채운 다음 3.8 mg/2 ml의 양의 효소(4의 2)를 가하고 같은 buffer로서 용출시켜 각각 4분 간에 4 ml씩 test tube에 받아 각 fraction별 총단백 정량과 효소역가 측정의 시료로 하였다.

#### ㉕ DEAE-Cellulose column chromatography<sup>(15)</sup>

DEAE-Cellulose 10 g을 2 M, pH 4.0 acetate buffer solution에 24시간 완충시키고 내경 2.4 cm column에 27 cm 되게 채운 다음 황산암모늄 완전포화 fraction의 농축효소(4~3) 2 ml를 가한 후 pH 4.0, 2 M acetate buffer solution 60 ml, 4 M acetate buffer 60 ml, 6 M acetate buffer 60 ml, 8 M acetate buffer 60 ml, 10 M acetate buffer 150 ml씩 차례로 완충액의 농도를 높혀 가며 sept wise elution 시켰다. Elute 되는 용액은 4 ml/sec 속도로 받아 총단백정량과 효소 역가 측정에 사용하였으나 이때 총단백 정량에 있어서는 Bolin B액의 NaOH 농도를 1 normal로 높혀 정량 하였다.

#### ㉖ DEAE-Column chromatography에 의해 정제한 효소의 Sephadex G-200에 의한 재 정제

Sephadex G-200의 처리 법은 4의 3), ㉔와 동일하게 하여 1.8 cm×17 cm 되게 column에 채운것으로 효소액은 DEAE-Cellulose column 통과 후 naringinase 활성이 높은 fraction number 29~30번으로 fraction 후 황산암모늄으로 염석하여 냉은 보관 한 것이었다. 용출 완충액은 acetate buffer pH 4.0으로 0.1 M농도 이었고 fraction량은 3 ml이었고 다른 조작법은 상기 방법과 동일 하였다.

## 5. 효소단백의 여지 전기영동

### 1) 粗酵素

사용한 효소는 acetone 분말효소(1-②)로서 100 μg/ml 농도로 0.01 ml 정도씩 Toyo 여지 No. 51 여지(폭 1.5 cm)에 유리 모세관으로 각각 spotting 하고 인산 완충액 (pH 5.4, 0.1 μ이온 강도) 하에서 여지 전기 영동기(Model DR-65)로 120 mA, 5 mA로 9시간 영동하였다 영동

후 단백 이동의 확인은 bromophenol blue 에 의한 물색法<sup>(16)</sup>으로 paper strip 를 bromophenol blue : acetic acid : HgCl<sub>2</sub>의 용액에 15분 담근 후 2% 초산용액으로 3~4회 세척하고 암모니아 증기에서 진한 청남색의 단백 band를 확인하였다.

1) 정제 효소

효소 단백질은 DEAE-Cellulose chromatography 후 Sephadex G-200에 의하여 정제한 4-3)의 ⊕ 효소 중 fraction No. 13, 14, 15의 것으로 폭 2.1 cm 의 두개의 paper strip 에 0.1 ml/씩 spotting 하고 pH 4.0의 0.1 μ 이온 강도의 초산 완충액 위에서 610 mv, 5mA 로 하여 3 시간과 7시간 영동하여 단백질이동을 확인 하였다.

6. Thin layer chromatography<sup>(17)</sup>에 의한 반응생성물의 확인

사용한 반응용액은 starch gel 전기영동중 anode 방향으로 16.5, 17, 17.5 cm 이동된 fraction 의 것과 DEAE-Cellulose column 용출효소 27~32 번 fraction, DEAE-Cellulose 정제 후 Sephadex G-200에 의해 재정제한 12~18번 fraction number 의 반응액 들로 각 0.05 ml/를 spot 하였다. Thin layer 는 Kiesel gel G.(Merk 劑) 30 g 의 중류수 60 ml/를 혼합한 후 glass plate에 (20 cm×20 cm) 0.25 mm 되게 apply 한 후 활성화시켜 사용하였고 전개용 solvent 는 pyridine : butanol : water=15 : 30 : 15의 용액으로 하여 3시간 정도 실온에서 상승 전개시

켰다. 전개 후 90°C 에서 건조시키고 AgNO<sub>3</sub>-alkaline solution<sup>(18)</sup>으로 spray 하여 105°C 에서 발색시켜 갈색반점의 환원당을 확인하고 이를 standard rhamnose 와 glucose 의 Rf 치를 비교하였다.

결과 및 고찰

Crude 한 naringin 분해효소를 정제한 결과 Sephadex G-200, starch gel 전기영동, cellulose column chromatography 분획 황산암모늄의 순위로 순수하게 정제되었으며 각 정제에 따른 결과는 다음과 같다.

1. Starch gel electrophoresis

粗酵素의 starch gel 전기영동 결과는 Fig. 1과 같다. 상기 Fig. 1 에서 보는바와 같이 대부분의 단백질은 anode 방향으로 1~3cm 이동된 것을 볼 수 있다. 이는 5.4보다 조금 낮은 등전점을 가지는 많은 단백질이 있음을 시사한다고 하겠다. 그리고 naringinase 는 이와는 달리 anode 방향으로 17~18 cm 까지 이동된 것으로 보아 그보다 상당히 낮은 pH에서 등전점을 가진다고 볼 수 있다.

2. 황산암모늄 분별침전

황산암모늄 분별침전 결과 각 fraction 의 total activity 와 단백질 mg 및 naringinase 활성은 Table 1과 같다.

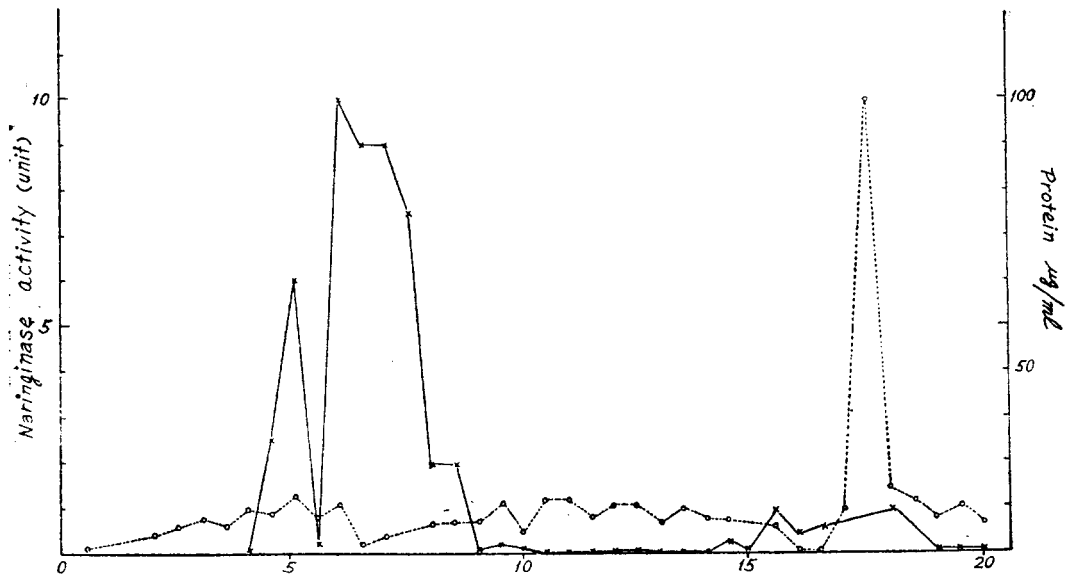


Fig. 1. Starch gel electrophoresis of crude naringinase  
 Starch was wetted with phosphate buffer pH 5.4 (0.1 μ ion strength) and electrophoresis was carried out on the Toyo model, DR 65 at 700 mv, 10 mA, with 50 mg of naringinase for 63 hr at 3°C  
 ..... : naringinase, ——— : protein

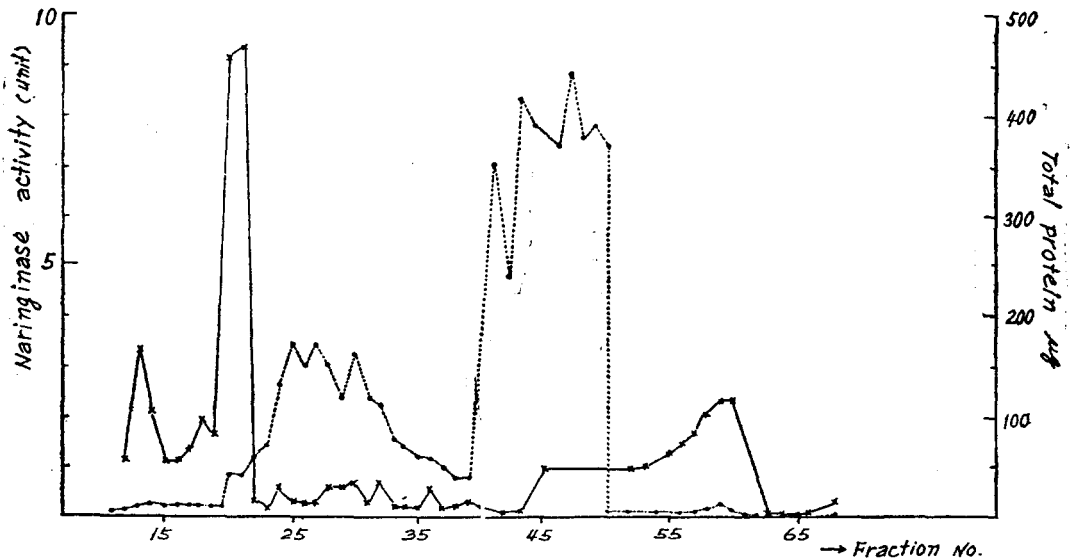


Fig. 2. Fractionation of crude naringinase

0.75~1 saturated ammonium sulfate fraction on a Sephadex G-200 column (2.4×27 cm, effluent ; acetate buffer pH 4.0 (1M), each fraction ; 4 ml, enzyme weight ; 3.8 mg)  
 ..... : naringinase, — : protein

Table 1. Fractional precipitation of crude naringinase by ammonium sulfate

Activity	Total activity (unit)	Protein per mg activity (unit)
Treating method		
Crude enzyme solution	7,300	0.365
Ammonium sulfate 0.25 soln	30	3
Ammonium sulfate 0.25~0.75 soln	1,220	12
Ammonium sulfate 0.75~1 soln	1,025	34

상기 Table 1에서 보면 0.25 황산암모늄 포화에서는 거의 효소가 침전하지 않음을 알 수 있고 황산암모늄 0.25~0.75 포화와 0.75 포화 이상 완전포화 분획에 대부분의 효소가 회수되는 것을 알 수 있다. 즉 회수되는 총 역가는 0.25~0.75 fraction에 더 좋으나 효소의 정제도로 봐서는 황산암모늄 0.75 포화 이상 분획에서 2배 이상의 정제효과를 얻었다. 그러므로 회수율과 정제도를 고려한 최적 황산암모늄 분획의 농도가 더 검토되어야 할 것으로 생각된다.

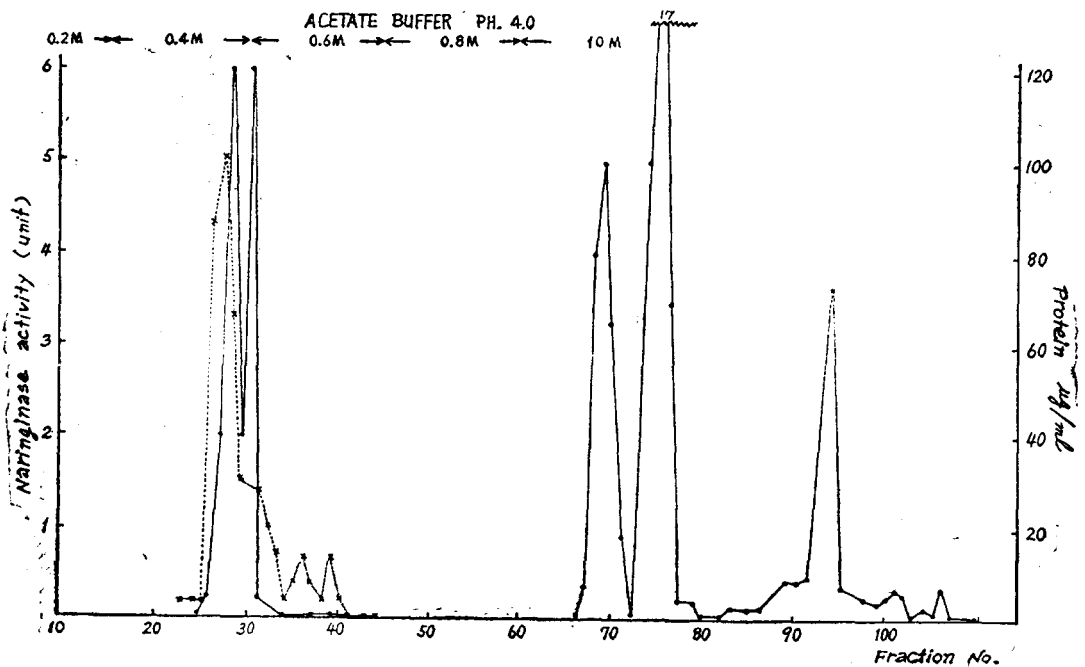


Fig. 3. Fractination of partially purified naringinase

0.75~1 saturated ammonium sulfate fraction on a DEAE-Cellulose column (2.4×27 cm, effluent ; 2~10 M acetate buffer pH 4.0, each fraction 4 ml)

..... : naringinase, — : protein

3. Coloum chromatograpyh

1) Sephadex G-200에 의한 column chromatography naringin 분해효소의 Sephadex G-200에 의한 column chromatography 결과는 Fig. 2와 같다.

Fig. 2에서 보는 바와 같이 naringinase 의 용출부위는 fraction number 19 (76 ml 용출부위)로서 역가는 1,137 unit/protein mg 이었다. Sephadex G-200에 의한 용출 부위를 보면 이 효소의 분자량은 100,000이상의 고분자 단백질인 것으로 추정된다.

2) DEAE-Cellulose column chromatography

일부 정제된 naringin 분해 효소의 DEAE-Cellulose column chromatography 한 결과는 Fig. 3과 같다.

Fig. 3의 peak A 에서 fraction number 27~29까지 대부분의 naringinase 가 용출 되었으며 No. 27 에서는 protein mg 당 430 unit 로서 가장 정제도가 높았다. 단백질 peak 로서는 5개가 나타났고 2개의 peak 는 naringinase 의 용출 peak 와 유사한 지점이었다.

2) DEAE-column chromatography 후 Sephadex G-200에 의한 정제

DEAE-Cellulose column 에서 정제된 것을 다시 Sephadex G-200에 의해서 정제한 결과는 Fig. 4와 같다. 아래의 Fig. 4에서 보는 바와 같이 fraction number 12~18에서 한개의 peak 를 나타 내었다. 그리고 이 12~18 부위의 효소를 paper electrophoresis 한 결과도 한개의 단백질로 나타났기 때문에 순수한 naringinase 라고 생

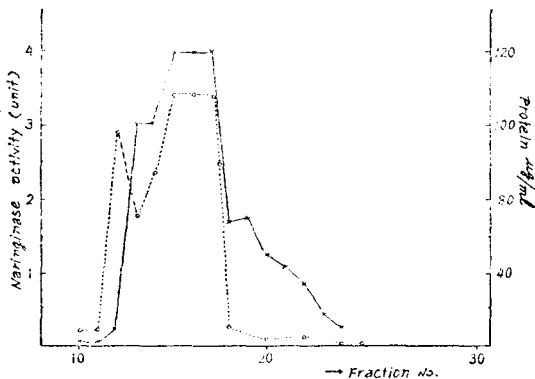


Fig. 4. Rechromatogram on a Sephadex G-200 purified naringinase on a DEAE-Cellulose column

effluent : acetate buffer pH 4.0, column ; 1.8×17 cm, each fraction 3 ml

..... : naringinase — : protein

각되었다. 이때 protein/mg 역가는 높지 못하였는데 이는 정제 과정에서 실활에 기인된 것으로 고려된다.

4. Naringinase 의 paper electrophoresis

Crude 한 naringinase 의 황산암모늄 침전 효소는 pH 5.4의 인산 buffer(0.1 μ)에서 Fig. 5의 1)과 같이 음극 쪽에 3개의 단백질 band 를 확인할 수 있었으나 황산암모늄 0.75 프화 fraction 을 다시 DEAE-Cellulose column과 Sephadex G-200에 의한 정제 결과는 Fig. 5의 2)-2와 Fig. 5의 2)-6에서 보는 바와 같이 1개의 단백질 band 만 나타났다. 이로서 이 효소는 여지 전기영동으로도 단일 단백질인 것으로 생각된다.

5. 反應生成物의 thin layer chromatography

Naringinase 에 의한 기질분해 결과를 thin layer chromatography 로 검토해본 결과는 Table 2와 같다. Table 2에서의 결과 DEAE-Cellulose 나 starch gel electrophoresis 결과 反應生成物은 glucose 와 rhamnose가 生成된다. 이는 naringin 분해효소의 등전점은 flavonoid 배당체 분해효소 purinin 분해효소와 등전점이 비슷하기 때문에 정제과정중 혼입된 것에 연유하는 것 같다.

Table 2. Identification of reaction mixture by thin layer chromatography

Treating method	Fraction number	Glucose	Rhamnose
Starch electrophoresis	33~35	+	+
DEAE-Cellulose column	27~32	+	+
Sephadex column after DEAE-Cellulose	12~18	-	+

Rf : Glucose : 0.63, Rhamnose : 0.76

그러나 DEAE-Cellulose 로 정제한 효소를 다시 Sephadex G-200에 의한 정제결과를 thin layer chromatography 한 것은 glucose 의 존재가 인정되지 않는 것은 naringin 분해효소와 purinin 분해효소의 분자량이 틀리는 효소로서 비슷한 등전점을 가지는 효소로 추론된다.

요 약

선별된 Aspergillus 속의 한 균주인 S-1의 粗 naringin 분해효소의 정제에 관하여 검토한 결과 정제도의 관점에서 Sephadex G-200, starch gel electrophoresis, DEAE-Cellulose column chromatogram, 황산암모늄분획의

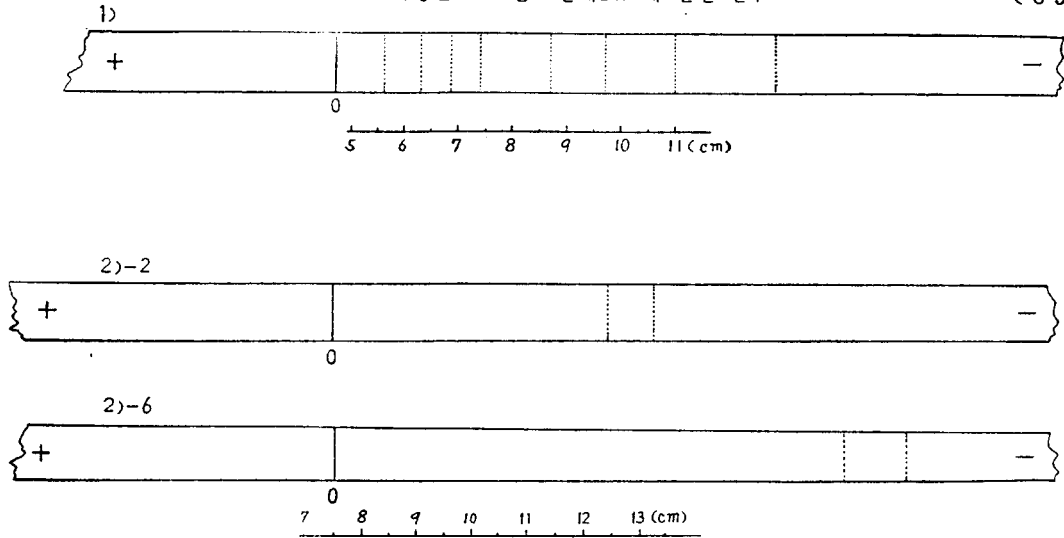


Fig. 5. Drawing of paper electrophoresis of naringinase

- 1) After ammonium sulfate precipitation of dialyzed cultrue filtrate (620 mv, 5 mA, 9 hr, phosphate buffer, pH 5.4 (0.1 $\mu$ ) paper strip 1.5 cm
- 2) Naringinase after purified ammonium sulfate fractional precipitation, DEAE column chromatography, and Sephadex G-200 column chromatography (610 mv, 5 mA, acetate buffer pH 4.0(0.1 $\mu$ ) paper strip 2.1 cm
- 2)-a Electrophoresised 3 hr, 2)-b electrophoresised 7 hr

순위로 좋았으며 각 정제법에 따른 결과는 다음과 같다.

1. 粗酵素를 starch gel electrophoresis 한 결과 단백질 mg 당 naringinase 활성이 1,000 unit 로 정제되었다.
2. 단백질 mg 당 0.37 unit, naringinase 활성인 粗酵素를 황산암모늄분획한 결과 0.25포화 이하에서는 protein per mg 3 unit, 0.75포화 이하에서는 12 unit, 0.75포화 이상 완전포화 fraction 에서는 34 unit 로 정제되었으며 회수율로 볼때는 황산암모늄 0.75포화 이하에서 가장 좋았다.
3. Sephadex G-200에 의해 정제한 결과 protein per mg 1,337 unit 였으며 DEAE-Cellulose column chromatography 한 결과는 430 unit per protein mg 으로 정제되었다.
4. DEAE-Cellulose column chromatography 후 Sephadex G-200에 의해 정제한 결과는 여지전기영동에 의해 단일 단백질로 나타났으며 이 단일 단백질은 naringin 을 purunin 까지만 분해하였다.

참 고 문 헌

- 1) 富田二缺男: 食品工業, 62 (12), 12 (1970).
- 2) 기우경, 성낙제: 한국농화학회지, 13 (3), 237 (1970).
- 3) 岡田茂孝, 岸清, 東原昌孝, 福本壽一郎: 日本農芸化學會誌, 37 (2), 84 (1963).
- 4) 岡田茂孝, 岸清, 東原昌孝, 福本壽一郎: 日本農芸

- 化學會誌, 37 (3), 142 (1963).
- 5) 岡田茂孝, 岸清, 板谷公和, 福本壽一郎: 日本農芸化學會誌, 37 (3), 146 (1963).
- 6) 岡田茂孝, 板谷公和, 福本壽一郎: 日本農芸化學會誌, 38 (5), 242 (1964).
- 7) 岡田茂孝, 矢野眞弓, 福本壽一郎: 日本農芸化學會誌, 38 (5), 246 (1964).
- 8) 岡田茂孝, 矢野眞弓, 福本壽一郎: 科學と工業, 39, 42 (1965).
- 9) 岡田茂孝, 北畑壽美雄, 東原昌孝, 福本壽一郎: Agr. Biol. Chem., 33, 900 (1969).
- 10) 瀧口洋: 日本農藝化學會誌, 39 (5), 194 (1965).
- 11) Davis, W. B.: Anal. Chem., 19 (7), 476 (1947).
- 12) Lowry, O. H. Rosebrough, N. J. Farr, A. L. Randall R. J.: J. Biol. Chem., 193, 265 (1951).
- 13) 安藤銳郎, 寺山宏, 面澤一俊, 山川民夫: 生化學研究法 I: 朝倉書店, 東京, 481 (1968).
- 14) Pettersson. G.: Arch. of Biochem. and Biophys., 123, 307 (1968).
- 15) Yagisawa M, Kato K, Koba Y, Ueda S.: J. Ferment. Technol., 50 (9), 572 (1972).
- 16) 赤堀四郎: 酵素研究法 I, 朝倉書店, 東京, 476 (1956).
- 17) 福井作藏: 還元糖の定量法, 東京大學出版會, 159 (1971).
- 18) 安藤銳郎, 寺山宏, 西澤一俊, 山川民夫: 生化學研究法 I, 朝倉書店, 東京, 410 (1968).