

*Aspergillus nidulance*가 생산하는 Naringinase에 관한 연구

제 3 보 固定化 Naringinase의 제조 및 그 성질

裴 東 薰 · 卞 裕 亮 · 柳 洲 鉉

延世大學校 工科大學 食品工學科

(1978년 4월 1일 수리)

Studies on Naringinase Produced from *Aspergillus nidulance*

Part III. Preparation and Properties of Immobilized Naringinase

by

Dong-Hoon Bai, Yu-Ryang Pyun and Ju-Hyun Yu

Department of Food Engineering, College of Engineering,

Yonsei University, Seoul

(Received April 1, 1978)

Abstract

Naringinase produced from *Aspergillus nidulans* was immobilized in acrylamide gel by the entrapping method and its characteristics were studied.

Optimum acrylamide concentration was 10%, but N,N'-methylene bisacrylamide concentration had no influence on the final enzyme gel activity. The suitable amount of enzyme dissolved in the polymerization reaction mixture was 126 units/ml.

Optimum pH of immobilized enzyme was 5.0 which was the same as that of free enzyme. However, immobilized enzyme showed a higher optimum reaction temperature, markedly increased pH and temperature stability.

In a packed-column reactor, the observed reaction rate was increased proportionally to flow rate up to 5ml/min., but independent above 6ml/min.. Activation energy of the immobilized enzyme was 13.01 Kcal/mole, and the energy required for the thermal inactivation was 39.4 Kcal/mole. The apparent Km for 100 mesh gel was 7.23×10^{-3} mole.

서 론

밀감류의 쓴맛을 내는 주요 물질은 naringin으로서, 이를 제거하기 위한 여러가지 방법이 제안되어 있으며 그중에서 naringinase에 의한 효소가수분해 방법이 가장 유망한 방법으로 이에 대한 많은 연구가 진행되었다. (1-3)

그러나 공업적으로 naringinase를 사용하는 데는 여러

가지 제약이 따르게 되므로, 최근에 와서는 naringinase의 固定化가 연구되고 있으며 이에 대한 몇몇 報告 (4-6)가 있으나 아직 활용되지 못하고 있다.

Naringinase를 생산하는 가장 유력한 미생물은 *Aspergillus niger*인 것으로 알려져 있으나, 본 연구자들은 naringinase의 생산능이 우수한 *Aspergillus nidulance*를 분리하고, 효소의 생산 조건 및 효소의 물리, 화학적 성질에 대해 보고한 바 있다. (7) 本報에서는 acryla-

mid gel을 이용한 naringinase의 고정화 조건 및 고정화 효소의 성질에 관하여 보고 하고자 한다.

실험 방법

1. 효소의 調製

밀기물에 *Aspergillus nidulance*을 접종, 배양하여 前報⁽⁷⁾에서와 동일방법으로 효소를 조제하였다.

2. 효소의 固定化

Acrylamide 10g, N,N'-methylene bis 1g을 증류수 100ml에 녹인 것에 효소액을 넣은 다음에 5% β-dimethylaminopropionitrile 1ml, 2.5% K₂S₂O₈ 1ml를 넣어서 자외선등 아래서 photopolymerization시켰다. 이때 반응액 중에 산소가 존재하면 重合反應이 방해되므로 증류수를 끓여 용존산소를 제거한 후 사용하였다.

Gel이 형성되면 이를 플로렌러형 균질기로 분쇄한 후에 數回 세척하고 채로 쳐서 일정한 크기로 만들어 固定化酵素를 반응에 사용하였다.

3. 효소의 活性 측정

Naringinase의 활성은 David법⁽⁸⁾을 변형시킨 中林 및 井上의 變法⁽⁹⁾으로 측정하였다. 즉, 0.02% naringine 용액 5ml에 고정화한 naringinase 1g을 가하여 40°C에서 1시간 반응시킨 후 측정하였다.

4. 固定化酵素의 연속반응

고정화효소의 연속반응에는 Fig.1의 장치를 사용하였다. 즉 반응기로는 C와 같이 자켓이 설치된 column을

사용하였으며 반응온도를 일정하게 유지하기 위하여 thermostat circulator(Mitamura Riken Kogyo)로 일정 온도의 물을 자켓에 통과시켰다. 0.01% naringine 용액은 peristaltic pump(New Brunswick Scientific, model PA-60)를 사용하여 일정한 流速으로 column에 공급하였다.

결과 및 고찰

1. 고정화효소의 제조조건

(1) Acrylamide의 농도의 영향

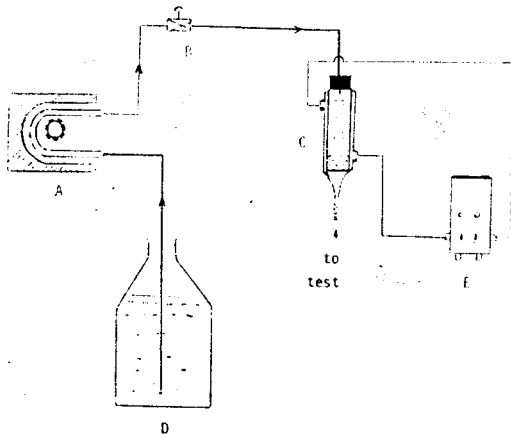
Acrylamide gel형성에 있어서 acrylamide의 농도가 효소의 활성에 미치는 영향은 Fig.2와 같다.

Acrylamide농도 10%에서 가장 높은 활성을 보였으며 그 이상의 농도에서는 감소하였다.

Acrylamide 5% 의gel은 硬度가 너무 낮아 반응에 사용하기 부적당하였으며, 농도가 높을수록 硬度가 강해졌다. Acrylamide의 농도가 높아질수록 효소활성이 감소하는 것은 gel의 硬度가 강하여 pore size가 적어지고 기질의 internal diffusion이 영향을 받기 때문인 것으로 생각된다.

(2) N, N'-methylene bis의 농도의 영향

Acrylamide농도를 10%로 고정하고 가교제인 N,N'-methylene bis acrylamide의 농도의 영향을 살펴 본 결과 Fig.3과 같다. 그림에서 보는 바와 같이 NN'-methylene bisacrylamide의 농도는 효소의 활성에 큰 영향



- A : Peristaltic pump
- B : Velocity adjusting valve
- C : Jacket type packed bed reactor
- D : Feed reservoir
- E : Thermostat circulator

Fig. 1. Schematic diagram of packed bed reactor system.

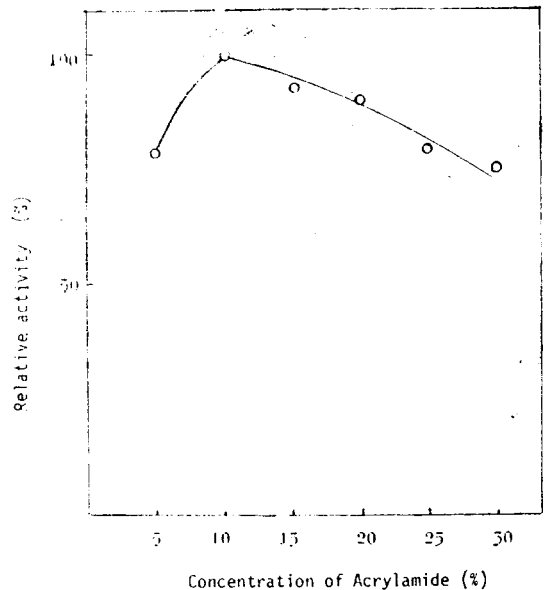


Fig. 2. Effect of acrylamide concentration on the activity of immobilized naringinase.

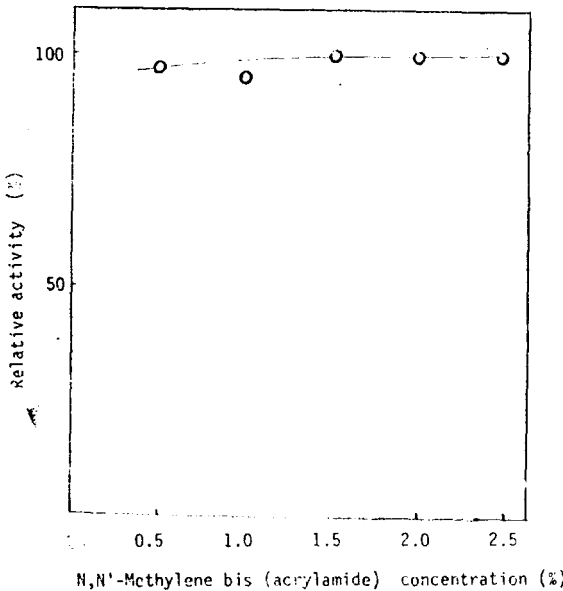


Fig. 3. Effect of N, N'-Methylene bis(acrylamide) concentration on the activity of immobilized naringinase.

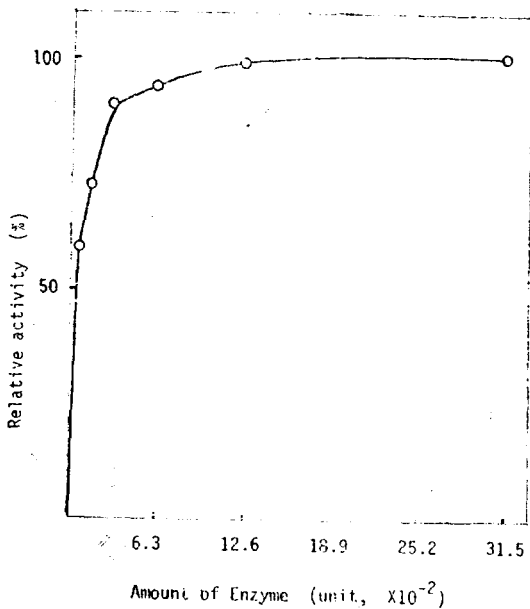


Fig. 4. Effect of the amount of enzyme added to the gel solution on the activity of immobilized naringinase. (Total volume: 10ml)

을 주지 않는 것으로 나타났다.

(3) 효소농도의 영향

Acrylamide 10%, N,N'-methylene bisacrylamide 1%의 농도로 하여 전체 액량을 10ml로 하고, 여기에첨

가한 효소의 농도를 변화시켜 고정화 효소를 조절하여 활성을 측정한 결과 Fig. 4와 같다. 1260 unit/10ml이상의 농도에서는 활성에 큰 차이를 나타내지 않은 것으로 보아 이 이상의 농도의 효소는 gel에 포함되지 않는 것으로 생각된다. 최적조건에서 효소활성의 entrapping yield는 약 69%로 계산 되었다.

2. 固定化 naringinase의 성질

(1) 효소반응에 미치는 pH의 영향

McIlrairie buffer를 사용하여 각 pH의 naringin용액을 만들고 여기에 1g의 효소 gel을 가하여 반응시켜 효소활성을 측정하고 수용성 효소와 비교하였다. Fig. 5에서와 같이 고정화효소의 최적반응 pH는 수용성 효소와 같은 5.0이었다. Ono⁽⁶⁾ 등은 *Aspergillus niger*가 생산하는 naringinase를 DEAE Sephadex에 이온결합으로 고정화시킨 고정화효소의 최적 pH는 수용성효소의 최적 pH 4.5에 비하여 산성쪽으로 0.5 이동한 4.0였다고 보고하였다.

(2) 효소반응에 미치는 온도의 영향

고정화효소의 최적반응 온도는 Fig.6에서 보는 것과 같이 50°C이었다. 이는 수용성효소에 비하여 10°C 상승된 것이며, 온도에 따른 효소활성의 영향도 수용성 효소에 비하여 많이 둔화되어 40~60°C의 범위에서 고정화효소의 활성은 큰 변화를 보이지 않았다.

(3) pH안정성

고정화효소의 pH안정성을 검토하기 위하여 각 pH로

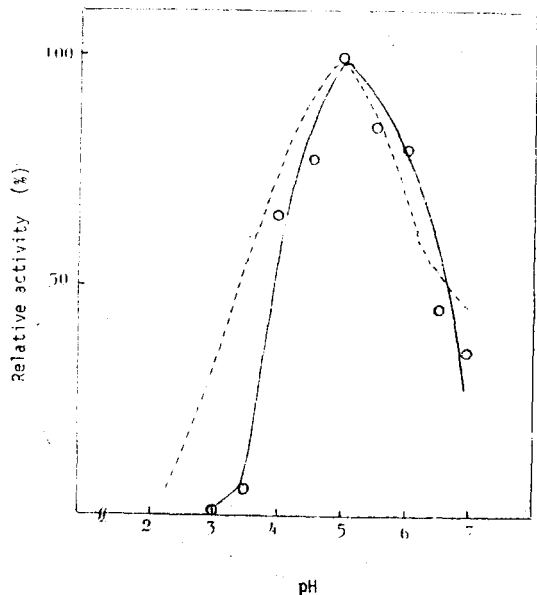


Fig. 5. Effect of pH on the activity of immobilized naringinase.

—Immobilized enzyme,..... : Free enzyme

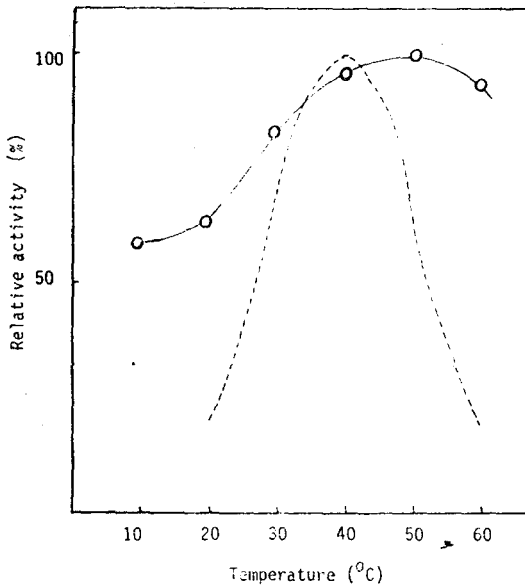


Fig. 6. Effect of reaction temperature on the activity of immobilized naringinase

— : Immobilized enzyme, : Free enzyme

조절한 McIlvaine buffer에 효소 gel을 90분간 정치시킨 후에 세척한 것을 pH 5.0의 0.02% naringin-용액에 반응시키고 그 잔존활성을 비교하였다.

Fig. 7에 나타낸 바와 같이 고정화효소의 pH안정성은 전 pH에 걸쳐 수용성 효소보다 향상되었으며, 특히 pH

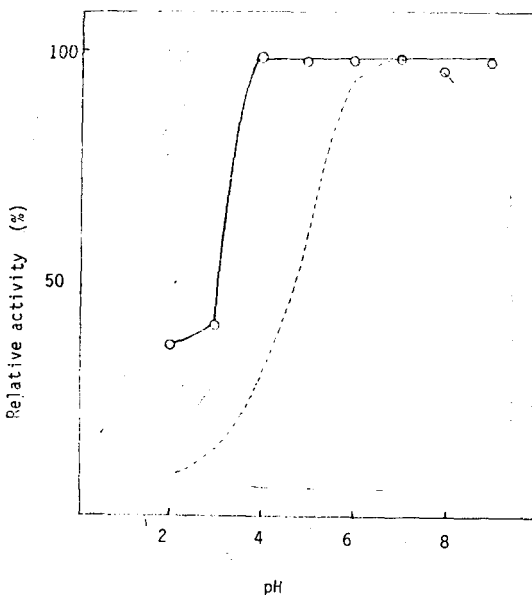


Fig. 7. Effect of pH on the stability of immobilized naringinase.

— : Immobilized enzyme : Free enzyme

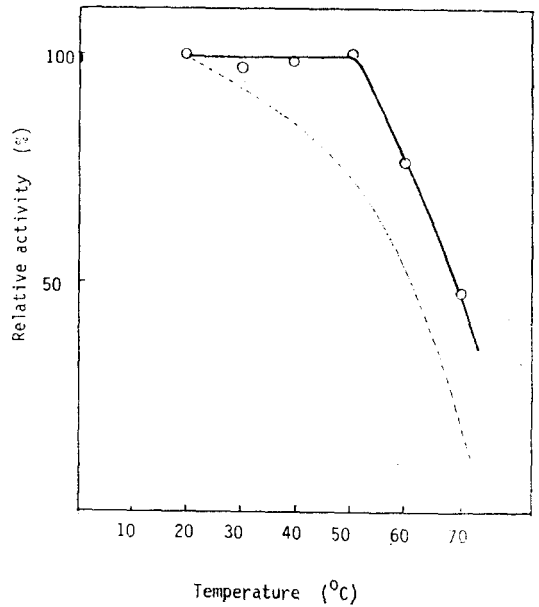


Fig. 8. Effect of temperature on the stability of immobilized naringinase.

— : Immobilized enzyme, : Free enzyme

4.0이상에서는 pH에 관계없이 안정한 것으로 나타났다.

(4) 열안정성

각 온도에서 30분간 처리한 효소 gel 1g을 0.025% naringin-용액에 가하여 50°C에서 1시간 반응시킨 후의 잔존활성을 측정하여 열안정성을 검토하였다.

고정화효소의 활성은 50°C까지는 변화가 없었으며, 50°C이상부터 감소하였다. 한편 수용성 효소의 활성은 20°C이상에서는 현저히감소하므로 고정화시키므로서 효소의 열 안정성이 상당히 증가되었음을 알 수 있다.

(5) 고정화효소의 저장성

효소 gel을 5°C에 보관하면서 일정한 간격으로 그 효소활성을 측정하여 고정화효소의 저장성을 검토하였다.

Fig.9에 나타낸 것과 같이 효소의 변성은 1次反應速度式에 따르지 않고 오히려 저장日數의 對數값에 비례하였다. 이는 pepsin의 不活性化와 비슷한 결과이며⁽¹⁰⁾, 저장 10일 후의 잔존활성은 70%였다.

3. 고정화효소의 연속반응

(1) 流速의 영향

Fig. 1과 같은 column reactor에서 기질용액의 流速이 반응속도에 미치는 영향은 Fig. 10과 같으며, 이때의 효소 gel의 粒子크기는 120mesh이고 기질액의 naringin함량은 0.01%이었다.

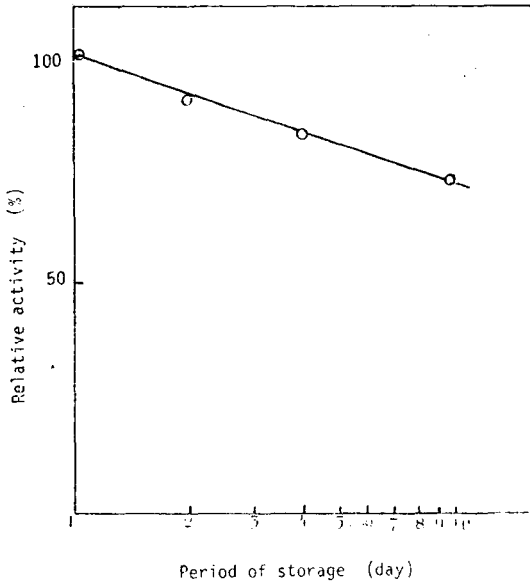


Fig. 9. Effect of period of storage on the activity of immobilized naringinase.

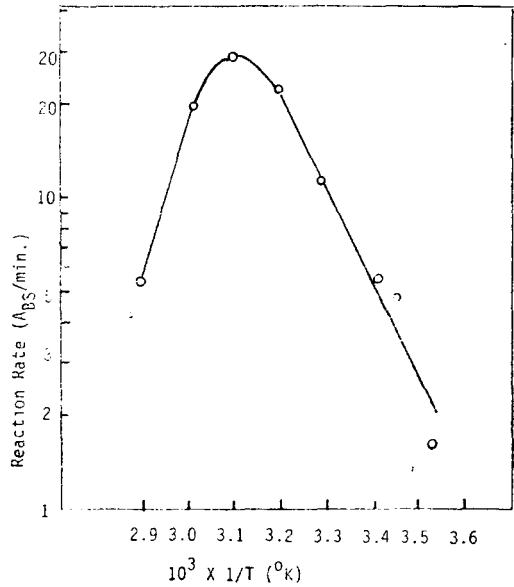


Fig. 11. Arrhenius plot of reaction rate vs. temperature for 100 mesh gel.

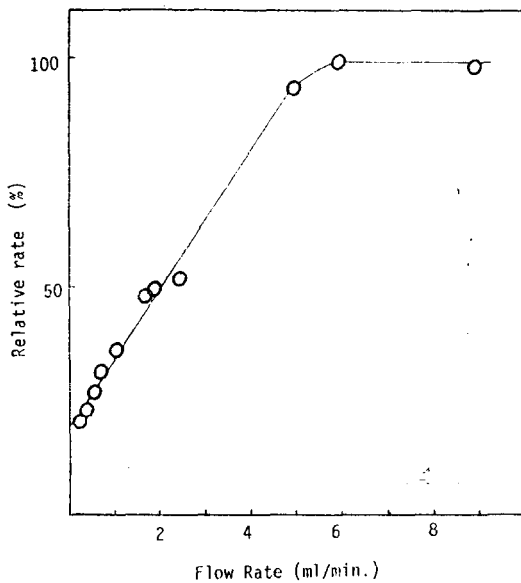


Fig. 10. plot of reaction rate vs. feed flow rate.

유속 5ml/min까지는 반응속도는 유속에 거의 비례 하였으나, 6ml/min이상에서는 유속에 관계 없이 반응 속도는 일정하였다. 이와 같이 유속이 큰 범위에서 반응속도가 일정한 것은 external diffusion의 영향이 제거 되었기 때문인 것으로 생각되며 이는 Korus등⁽¹¹⁾의 결과와 유사하다.

(2) 온도의 영향

Column reactor에서 온도가 반응속도에 미치는 영향

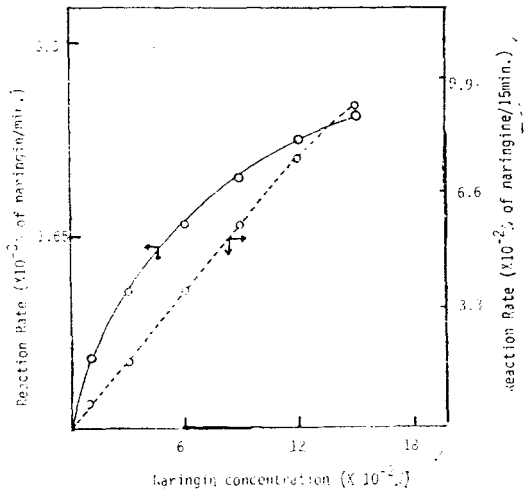


Fig.12. Effect of concentration of naringin on the reaction rate of immobilized naringinase and the native enzyme.

은 Arrhenius plot를 하여 Fig.11에 나타내었다.

고정화효소의 活性化 energy는 13.1kcal/mole이었으며, 不活性化에 필요한 energy는 39.4kcal/mole이었다 수용성 효소의 경우 40°C이하에서 活性化 energy는 약 23kcal/mole이었던 바 이는 고정화효소의 약 2배이다. 이 결과로 미루어 보아 고정화효소는 수용성 효소에 비해 반응온도에 민감하지 않으므로 낮은 온도에서 수용성 효소에 비해 큰반응 속도를 나타낸다는 것을 알 수

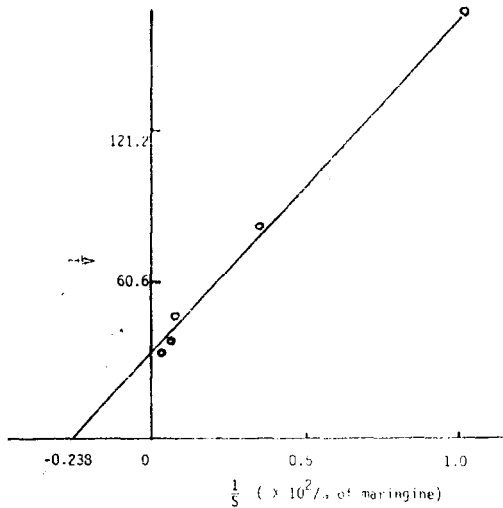


Fig. 13. Lineweaver-Burk plot of $1/v$ against $1/s$ for naringin by the immobilized naringinase.

있으며, Fig.6의 결과와 잘 일치된다. 또한 Korus⁽¹¹⁾ 등이 지적한 바와 같이 효소 gel은 低温에서 반응시키므로서 미생물의 번식을 방지할 수있다.

(3) 기질농도의 영향

기질의 농도가 반응속도에 미치는 영향은 Fig.12와 같다. 고정화효소의 경우에 기질농도가 증가함에 따라 곡선을 그리는 것은 internal diffusion의 영향인 것으로 생각된다.

한편 기질농도가 낮은 범위에 대해 Lineweaver-Burk plot를 대하여 고정화효소의 apparent Km을 구한 결과 7.23×10^{-3} mole였다 Ono⁽⁶⁾ 등은 *Aspergillus niger*에 의해 생산된 naringinase의 Km은 6.4×10^{-4} mole이며 고정화효소의 Km은 4.8×10^{-4} mole이라고 보고하였는 바⁽⁶⁾ 이들 보다 약간 높은 농도이다.

요 약

*Aspergillus nidulance*가 생산하는 naringinase의 acrylamide gel을 이용한 固定化의 조건과 고정화효

소의 성질 및 column reactor의 반응조건을 연구 검토하였는 바 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 고정화효소를 제조하는데 acrylamide의 농도는 10%가 적합하였으며, N,N'-methylene bis acrylamide의 농도는 0.5%이상에서 영향이 없었다. 이 조건에서 효소농도는 126 unit/ml가 적합하였다.

2. 고정화효소의 최적반응 pH는 5.0으로서 수용성 효소와 동일하였으며, 최적반응온도는 50°C로서 수용성 효소에 비해 10°C상승하였다.

3. Naringinase는 acrylamide gel에 고정시키므로서 pH안정성과 열안정성은 현저히 향상되었다.

4. 고정화효소의 활성화에너지는 수용성 효소보다 약 1/2적은 13.01 kcal/mole이었으며, apparent Km값은 7.23×10^{-3} mole이었다.

참 고 문 헌

- (1) Okada, S., Kishi, K., Higashihara, M. and Fukumoto, J.: *J. Agric. Chem. Soc.*, **37**, 84(1963)
- (2) Griffith, F. P. and Lime, B. J.: *Food Technol.*, **13**, 430 (1959)
- (3) Nomura, D.: *Enzymologia*, **29**, 202(1965)
- (4) Goldstein, L., Lifshitz, A. and Sokolovsky, M.: *Int. J. Biochem.*, **2**, 448(1971)
- (5) Matsubara, M., Doi, M., Kawamura, Y. and Morishita, S.: *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkai-shi*, **21**, 390(1974)
- (6) Ono, M., Tosa, T. and Chibata, I.: *J. Ferment. Technol.*, **55**, 493(1977)
- (7) 문순옥, 유주현, 변유량 : 산업미생물학회지, 발행중.
- (8) Daris, W. B.: *Anal. Chem.*, **38**, 726(1966)
- (9) 井上雅資, 岡田茂孝 : 科工, **43**, 642(1969)
- (10) Laidler, K. J. and Bunting, P. S.: *Chemical Kinetics in Enzyme Action*, Clarendon Press, pp. 422(1973)
- (11) Korus, R., Hinberg, I. and O'driscoll, K. F.: *Biotech. Bioeng.*, **16**, 943(1974)