Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.
Vol. 6, No. 2, 65~73 (1978).

*Aspergillus nidulans*가 生産하는 Naringinase에 관한 硏究

(제 2 보) Naringinase의 精製 및 物理化學的 性質

卞 裕 亮·文 順 玉·柳 洲 鉉

延世大學校 工科大學 食品工學科

(1978년 5월 8일 수리)

Studies on the Naringinase Produced by *Aspergillus nidulans*

(Part I) Purification and Characteristics of Naringinase

Yu Ryang Pyun·Soon Ok Moon and Ju Hyun Yu

Department of Food Engineering, College of Engineering, Yonsei University

(Reecived May 8, 1978)

Abstract

Naringinase extracted from the culture media of *Aspergillus nidulans* was purified, and the activity was proved to be stronger by 781 fold in the part of precipitation with ammonium sulfate, and column chromatography using DEAE-Sephadex A-25 and Sephadex G-100. Two fractions which had the same enzyme activity were isolated by the purification. Both fractions showed the highest enzymes activity under the reaction conditions of pH 5.0 and 40°C. Molecular weight of fraction Ⅰ and fraction Ⅱ were estimated as 78,000 and 26,000 respectively. This indicated that fraction Ⅰ would be trimer of fraction Ⅱ. The enzyme was inhibited by glucose and rhammose, and the Km value was calculated to be 2.3×10^{-6}g/ml.

緖 論

여러 硏究者들이 naringinase를 精製하기 爲하여 노력하여 왔다. 1963年 岡田등이 *Aspergillus niger*의 naringinase를 DEAE-Cellulose, Duolite A-2 수지 및 DEAE-Sephadex로 精製하였고[1,2,3] 1973年 奇등은 같은 酵素를 starch gel electrophoresis, $(NH_4)_2SO_4$ 분별침전, Sephadex G-200, DEAE-Cellulose 등으로 精製한 바 있다.[4]

前報[5]에서 著者들은 *Aspergillus nidulans*로부터 naringinase를 추출하여 그 生産條件을 檢討하였다.

本報에서는 이 粗酵素를 多量生産한 後 精製하여 精製酵素의 일반 物理化學的 性質을 檢討한 結果에 對하여 보고한다.

實驗材料 및 方法

1. 粗酵素의 調製

前報에서 선별한 *Aspergillus nidulans*를 밀기울 배지에 接種하여 30°C에서 6日間 培養한 後 4倍의 증류수로 추출하여 粗酵素液을 取하였다.

2. Naringinase의 活性測定法

Naringinase의 活性은 Davis法[6]의 中林 및 井上등의 變法[7,8]에 의하여 前報와 同一方法으로 測定하였다.

3. 蛋白質의 濃度測定法

Hitachi Model 101 Spectrophotometer를 利用하여 280nm에서 吸光度를 測定하였다.

4. 酵素의 精製

증류수로 추출하여 얻은 粗酵素液을 硫安沈澱, DEAE-Sephadex A-25 및 Sephadex G-100 columm을 使用하여 용출시켰으며 모든 酵素의 分劃은 fraction collector (Toyo SF-160K)를 利用하였다. 음이온 교환수지인 DEAE-Sephadex A-25는 증류수로 침윤시킨 후 0.5N NaOH에 30分間 담그고 증류수로 中性이 될 때까지 씻어준 뒤 0.5N HCl에 30分間 담갔다가 증류수로 中性이 될 때까지 씻어 주었다. 위의 조작을 수차례 행한 뒤 사용하였고 溶出用 buffer는 0.2M acetate buffer (pH 5.2)와 0.5 M NaCl(0.5 M acetate buffer pH 5.2에 녹인)를 siphon으로 연결시키므로써 식염농도가 일정비율로 增加하면서 溶出되도록 하였다.[9~14]

結果 및 考察

1. 酵素의 精製

酵素를 精製하기 위하여 밀기울 2kg과 물 1.8 *l*를 섞은 밀기울 배지에 菌을 接種한 後 30°C에서 6日間 培養한 後 8 *l*의 증류수로 추출하여 7,255 m*l*의 粗酵素液을 調製하였다.

(1) 酵素의 沈澱

1) Ethanol 沈澱 : 粗酵素液을 ethanol의 濃度를 달리하여 沈澱시켰을 때 Fig. 1과 같은 結果를 얻었다. Ethanol 濃度가 60% 일 때 比活性은 가장 높았으며 한편 酵素의 수율은 70%일 때 가장 높았다. (Fig. 1)

2) 硫安沈澱 : 粗酵素液을 硫安의 濃度를 달리하여 沈澱시켰을 때 Fig. 2와 같은 結果를 얻었다. 硫安濃度를 75% 飽和되게 添加하였을 때 가장 높은 比活性을 나타내었으며 酵素의 수율도 가장 좋았다.

Ethanol 沈澱과 硫安沈澱을 比較하여 보면 수율은 ethanol 沈澱이 높으나 比活性은 硫安沈澱이 높으므로 酵素를 硫安 75% 飽和로 沈澱시켜 冷藏庫에 하룻밤 방치한 後 10,000 rpm (International Centrifuge, model HT Centrifuge)에서 10분간 원심분리하여 沈澱부분을 125 m*l*의 0.2M acetate buffer (pH 5.2)에 溶解시킨 후 冷凍庫에서 凍結保存하였다. (Fig. 2)

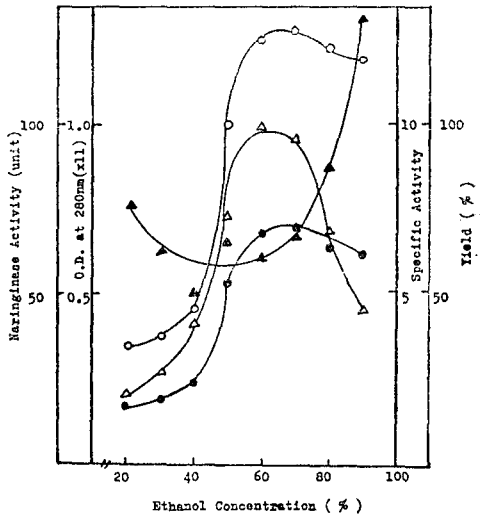

Fig. 1. Effect of Ethanol Concentration on Preciptation of Naringinase.
—●— : Enzyme activity
—▲— : O. D. 280 nm
—○— : Yield of enzyme
—△— : Specific activity

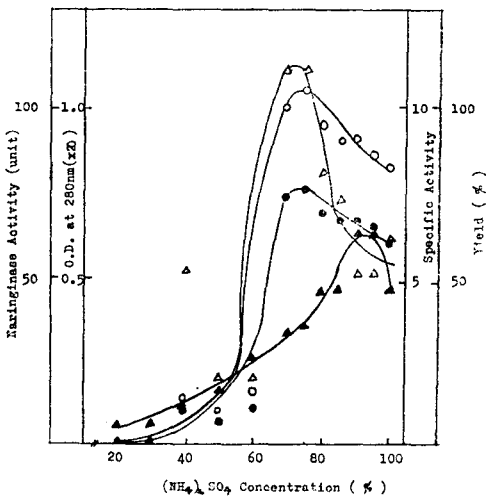

Fig. 2. Effect of Ammonium Sulfate Concentration on Precipitation of Naringinase.
—●— : Enzyme Activity
—▲— : O. D. 280 nm.
—○— : Yield of enzyme
—△— : Specific activity

(2) Column chromatography

凍結保存한 酵素液을 冷藏庫에서 녹인 후 2 m*l*를 취하여 미리 0.2 M acetate buffer (pH 5.2)로

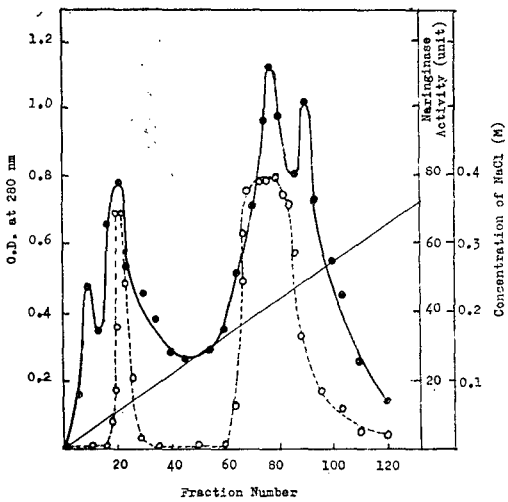

Fig. 3. Column Chromatogram of Naringinase on DEAE-Sephadex A-25 (2.4×30 cm)
—●— : . O. D. 280 nm
—○— : Naringinase activity
— : NaCl concentration, elution buffer, 0.2 M
Acetate buffer (pH 5.2), eluted volume: 5 m*l*.

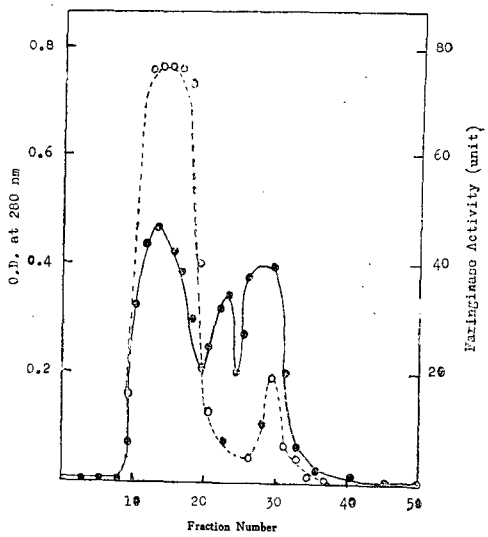

Fig. 4. Column Chromatogram of Naringinase on Sephadex G-100 (2.4×30 cm).
—●— : O. D. 280 nm
—○— : Naringinase activity
Elution buffer: 0.2 M acetate buffer (pH 5.2)
Eluted volume: 5 m*l*

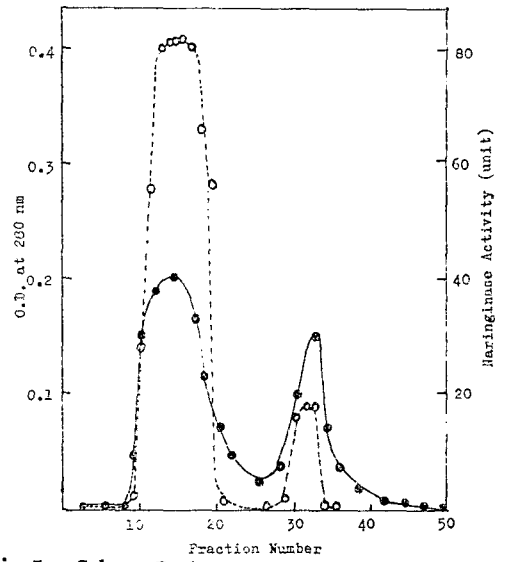

Fig. 5. Column Rechromatogram of Naringinase on Sephadex G-100 (2.4×30 cm).
—●— : O. D. 280 nm
—○— : Naringinase activity
Elution buffer: 0.2M acetate buffer (pH 5.2)
Eluted volume: 5 m*l*

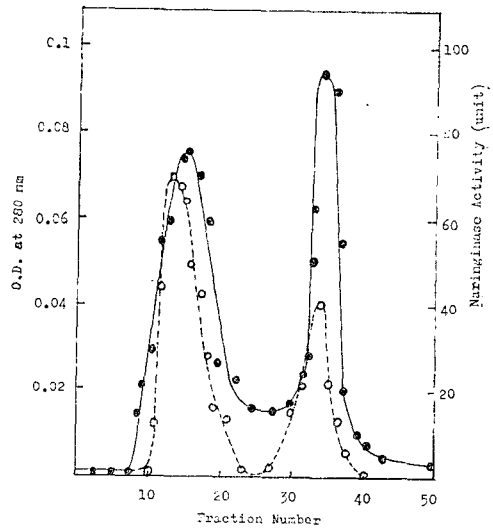

Fig. 6. Column Rechromatogram (3) of Naringinase on Sephadex G-100 (2.4×30 cm).
—●— : O. D. 280 nm
—○— : Naringinase activity
Elution buffer: 0.2 M acetate buffer (pH 5.2),
Eluted volume: 5 m*l*

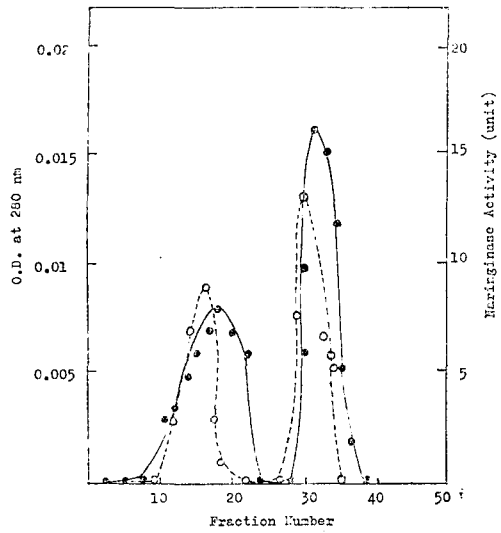

Fig. 7. Column Rechromatogram (4) of Naringinase on Sephadex G-100 (2.4×30 cm).
—●— : O. D. 280 nm
—○— : Naringinase activity
Elution buffer: 0.2M acetate buffer (pH 5.2),
Eluted volume: 5 m*l*

平衡化한 DEAE-Sephadex A-25 column (2.4×30 cm)에 吸着시켜 0.5 M NaCl를 使用하여 gradient chromatography를 하였다. 이 결과는 Fig. 3에서 보는 바와 같이 No. 19~24 와 No. 65~86의 두 부분에 酵素活性이 나타났다. 이것은 奇[15]등의 實驗結果에서 두 개의 酵素가 分離된 結果와 類似하였다. 그러므로 이 酵素中에 酵素量이 많은 酵素의 性質을 알기 위하여 No. 65~86 部分 110 m*l* 를 모아 위와 같은 方法으로 75% 硫安沈澱시키고 원심분리하여 얻은 沈澱物에 0.2M acetate buffer (pH 5.2) 2 m*l* 를 가하여 溶解시킨 후 위와 동일조건으로 Sephadex G-100 column (2.4×30 cm)으로 1次 chromatography를 行하였다. 1次 chromatography의 活性이 높은 No. 10~19 (Fig. 4)部分 50 m*l*를 2次 chromatography 하였으며, 2次 chromatography의 No. 10~19 (Fig. 5) 45 m*l*를 다시 3次 chromatography 하였다. 3次 chromatography 의 No. 12~21 部分 (Fig. 6) 40 m*l*의 酵素液을 4次 chromatography 行한 결과 No. 11~17 部分 28 m*l* 의 精製 酵素液을 얻을 수 있었다. (Fig. 7)

以上의 精製過程에서 보는 바와 같이 活性이 높은 Fraction I 酵素(앞의 부분)만을 擇하여 4次 chromatography 를 하였는데도 계속 두 개의 蛋白質 peak와 活性 peak 를 나타내었으며 chromatography를 反復할 수록 Fraction II 酵素(뒷 部分)가 相對的으로 增加하는 傾向을 보였다. 精製는 活性이 높은 Fraction I 酵素를 中心으로 行하였다. 4次 chromatography 결과 처음 추출한 粗酵素液에 比해 比活性이 781倍 增加한 精製酵素를 얻을 수 있었고 이때 수율은 3.0%이었다. (Table 1)

2. 精製酵素의 物理化學的 性質

(1) 酵素의 反應에 미치는 pH와 溫度의 影響

앞의 정제과정에서 分離된 두 부분의 酵素性質을 비교 검토하기 위하여 두 酵素의 反應 最適 pH와 反應 最適溫度를 조사하였다.

酵素의 反應最適 pH를 조사하기 위하여 pH

Table 1. Purification of Naringinase from *Aspergillus nidulans*.

Purification step	Total volume (m*l*)	Activity (unit)	O. D. (280 nm)	Specific activity	Yield (%)
1. Extraction	7255	526713	380162	1.4	
2. Ammonium sulfate precipitation	125	487500	48125	10.1	93
3. DEAE Sephadex A-25 column chromatography	110 (×62.5)	414906	4356	95.2	79
4. Gel filtration with Sephadex G-100 (1)	50 (×62.5)	240625	1266	190.1	49
5. Gel filtration with Sephadex G-100 (2)	45 (×62.5)	204188	577	353.9	38
6. Gel filtration with Sephadex G-100 (3)	40 (×62.5)	117500	147	799.0	22
7. Gel filtration with Sephadex G-100 (4)	28 (×62.5)	15500	14	1094.0	3

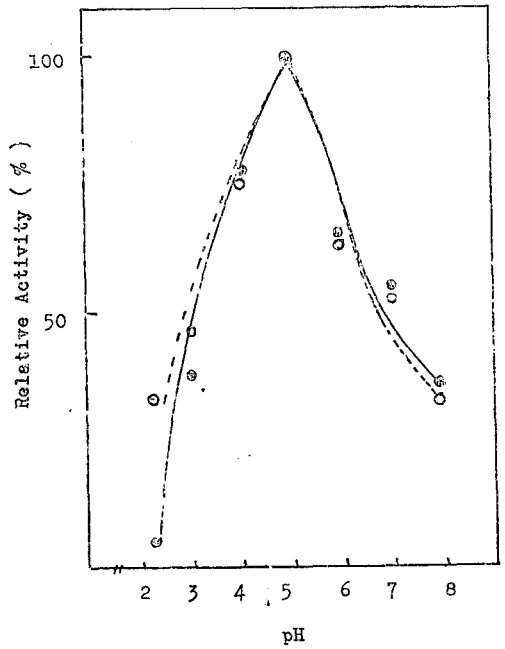

Fig. 8. Effect of pH on the Activity of Naringinase.
—●— : Fraction I, —○— : Fraction II, at 40°C, for 1 hr. incubation.

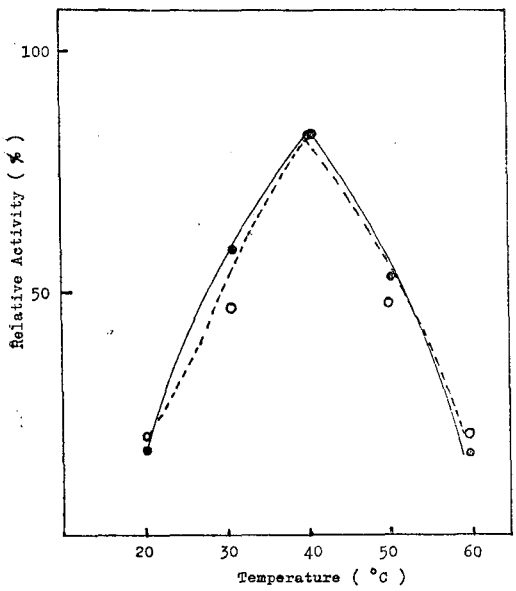

Fig. 9. Effect of Temperature on the Activity of Naringinase.
—●— : Fraction I
—○— : Fraction II
at pH 4.0, for 1 hr. incubation.

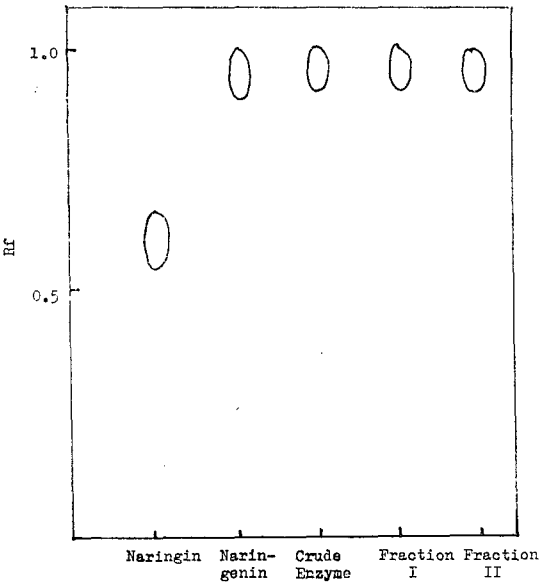

Fig. 10. Paper Chromatogram of Naringin Hydrolyzate by Naringinase.
Solvent: *n*-butanol : acetic acid : water (4 : 1 : 5)
Paper: Toyo filter No. 50
Spray: Diazotized sulfanilic acid

2.2~8.0 사이를 McIlvaine buffer로 조절하여 40°C에서 한 시간 反應시킨 結果 Fig. 8에 나타난 바와 같이 Fraction Ⅰ과 Fraction Ⅱ의 각 酵素의 最適 pH는 pH 5.0으로 일치하고 있었고 pH에 따른 活性의 경향도 유사하였다. 이 結果는 Bram[16]과 岡田등[2,17,18,19]이 보고한 4~4.5 보다 약간 높은 最適 pH이나 *Asp. tamarii*, *Ophiobolus miyabeanus*가 生産하는 naringinase와는 같은 結果이었다.[20]

반응의 pH를 4.0으로 조절한 후 20°C~60°C 범위의 각 溫度에서 1時間 反應시킨 結果 Fig. 9에 나타난 바와 같이 Fraction Ⅰ과 Fraction Ⅱ 酵素는 40°C에서 最高活性을 나타내었으며 경향도 유사하였다. 이것은 Bram[16]과 岡田등[2,17,18,19]이 보고한 50°C 보다 낮은 最適溫度이었다.

(2) 分解産物의 確認

3% naringin 3 m*l*와 粗酵素液, Fraction Ⅰ과 Fraction Ⅱ 1 m*l*를 40°C에서 時間 反應시킨 후 反應液, naringin과 naringenin 標準溶液을 동양여지 No. 50에 spot하여 실온에서 n-butanol : acetic acid : water (4 : 1 : 5)의 전개제로 전개후 diazotized sulfanilic acid 로 발색시킨 結果[21] Fig. 10과 같이 分解産物로 naringenin이 確認되었다. 또한

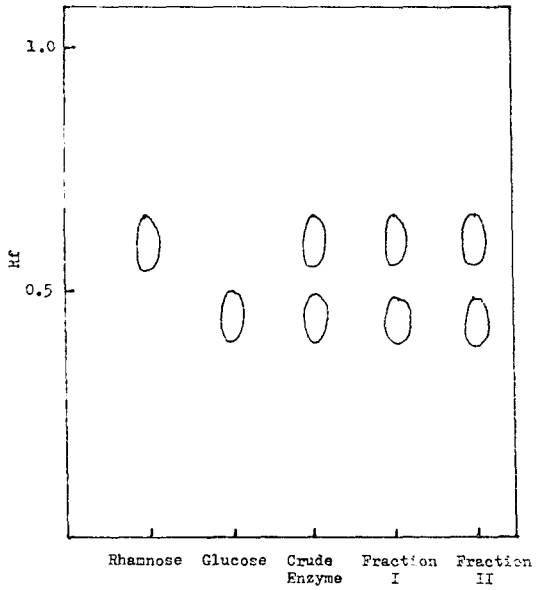

Fig. 11. Paper Chromatography of Naringin Hydrolyzates by Naringinase.
Solvent: isopropanol : water(160 : 40)
Paper: Toyo filter No. 50
Spray: Aniline diphenylamine phosphate

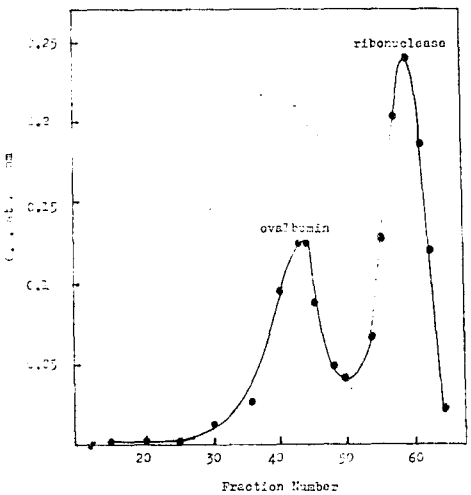

Fig. 12. Column Chromatogram of Ovalbumin and Ribonuclease on Sephadex G-100(2.4×50 cm)
Elution buffer: 0.05M Tris-HCl buffer, pH 7.5 (containing 0.1M KCl), eluted volume: 3 m*l*.

위의 反應液, glucose와 rhamnose 標準溶液을 isopropanol : water (160 : 40)의 전개제로서 전개후 diphenylamine phosphate로 발색시킨 결과 Fig. 11에서와 같이 分解産物로 rhamnose, glucose가 確認

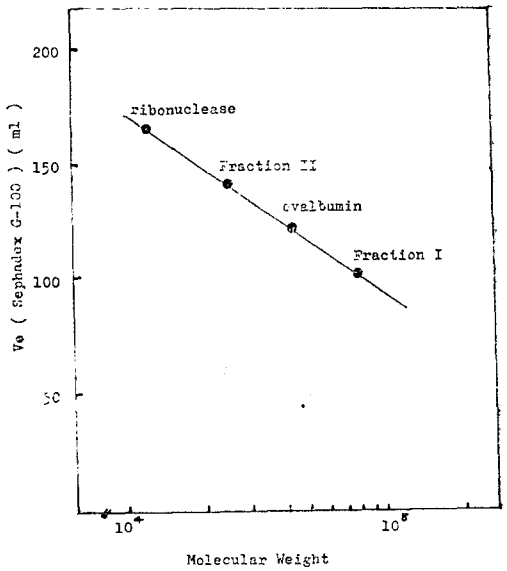

Fig. 13. Estimation of Molecular Weight by Gel filtration.

되었다. 이것으로 Fraction Ⅰ 및 Fraction Ⅱ는 naringin을 完全分解하는 酵素로 같은 性質을 가진 것으로 생각 되었다.

(3) 分子量의 測定

두 Fraction의 分子量을 비교하기 위하여 分子量을 測定하였다. 分子量의 測定은 Andrew의 gel filtration法에 따라 하였다.[22] 標準物質로는 ribonuclease(M. W. 13,700, Sigma)와 ovalbumin (M. W. 45,000, Sigma)을 사용하였다. 이 標準物質을 Sephadex G-100 column (2.4×50 cm)에 흡착시켜 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 7.5(0.1M KCl 용액)로 용출(30 m*l*/hr)하여 fraction collector에서 3 m*l* 씩 分離하였다. (Fig. 12) 이 結果 ovalbumin은 120 m*l*의 elution volume에서 peak를 나타내었고 ribonuclease는 165 m*l*의 elution volume에서 peak를 나타내었다. 각각의 elution volume과 分子量을 semilog graph에 作成한 후 精製酵素를 용출하면 Fraction Ⅰ은 100 m*l*의 elution volume에서 Fraction Ⅱ는 140 m*l*의 elution volume에서 각각 peak를 나타내었다. 이 結果를 앞서 作成한 分子量 換算線에 나타낸 結果 Fraction Ⅰ은 약 78,000, Fraction Ⅱ는 약 26,000의 分子量을 가진 것으로 推定되었다. (Fig. 13)

이 結果에 나타난 바와 같이 Fraction Ⅰ은 Ⅱ에 비해 3배의 分子量을 가졌으며 이것으로 미루어 보아 이 酵素는 分子量 26,000의 단백질이 3개

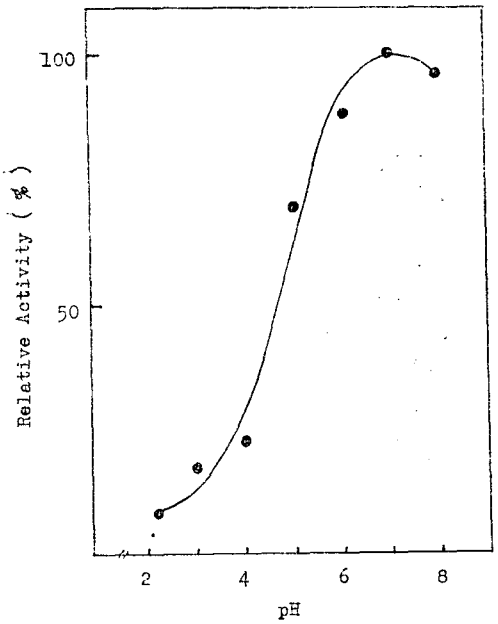

Fig. 14. Effect of pH on the Stability of Naringinase. The enzyme was treated at various pH (McIlvaine buffer) for 2 hrs. and the residual activity was measured after readjusting to pH 5.0.

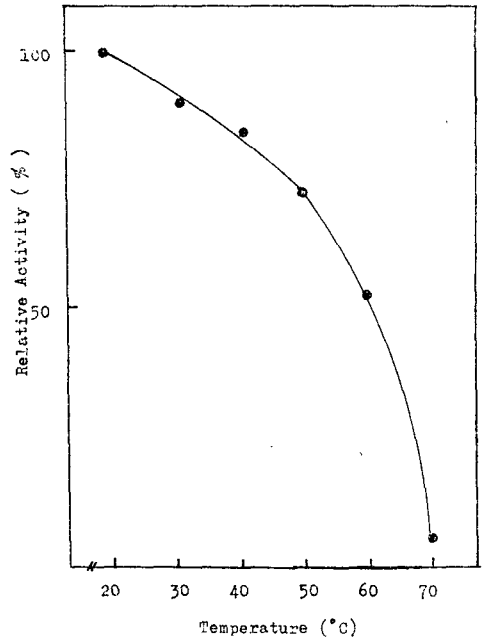

Fig. 15. The Effect of Temperature on the Stability of Naringinase.
The enzyme suspended on 0.2 M acetate buffer (pH 5.2) was heated at various temperature for 15 minutes.

모여 이루어진 複合體로 되어 있으며 gel filtratration을 行하는 동안 일부분의 Fraction Ⅱ의 monomer로 분리되는 것으로 推定할 수 있었으나 여기에 대해서는 더욱 자세한 硏究가 必要하다고 생각된다. 또한 分離되지 않은 상태의 Fraction Ⅰ의 分子量은 78,000으로 奇등이 *Asp. niger* 生産 naringinase의 分子量을 100,000 이상으로 推定한 것보다[23] 적은 값이었다.

이상의 硏究結果 Fraction Ⅰ과 Ⅱ는 같은 性質의 酵素로 생각되었기에 다음의 實驗은 酵素活性이 높은 Fraction Ⅰ의 여러 物理學的 性質을 檢討하였다.

(4) 酵素의 安定度에 미치는 pH와 溫度의 影響

酵素의 安定度에 미치는 pH의 影響을 보기 위하여 酵素液을 0.2M McIlvaine buffer를 사용하여 pH 2.2~8.0에서 각 pH로 調節하여 40°C에서 2時間 방치 후 그 殘存活性을 測定한 結果 Fig. 14에 나타난 바와 같이 pH 7.0에서 가장 높은 安定度를 나타내었다.

酵素液을 pH 5.2(0.2M acetate buffer)에서 20°C~70°C 범위로 각 溫度에서 15분간 가열한 후 그 殘存活性을 測定한 結果 Fig. 15에 나타난 바와 같이 50°C에서 70%, 60°C에서 50%의 酵素活性이 남았으며 70°C에서는 酵素가 거의 失活되었다.

(5) 酵素의 反應에 미치는 金屬이온의 影響

0.02% naringin 溶液(0.2M McIlvaine buffer, pH 5.0) 4 m*l*에 各種 金屬이온 10 mM을 0.5 m*l* 씩 가하고 酵素液 0.5 m*l*를 가하여 最終濃度를 1 mM로 한 후 40°C에서 한 時間 反應시킨 結果 Fe^{2+}에 의해 약간 活性이 減少될 뿐 다른 金屬 이온에 대해서는 별로 影響을 받지 않음이 나타났다. (Table 2)

(6) 酵素活性에 미치는 糖의 影響

糖에 의한 naringinase의 阻害作用에 대해서는 이미 알려져 있으므로[24,16,19] 본 硏究에서도 glucose와 rhamnose에 의한 阻害作用을 알아보기 위하여 각각의 濃度를 1%~4%로 하여 40°C에서

Table. 2. Effect of Metal Ions on the Activity of Naringinase.

Metal ion	Relative activity (%)	Metal ion	Relative activity (%)
$AlCl_3$	100	$MnSO_4$	102
$CaCl_2$	90	$NiSO_4$	104
$CoCl_2$	104	$NaSO_4$	96
$FeCl_3$	102	EDTA	100
$PbCl_2$	104	$CuSO_4$	96
$MgCl_2$	90	$FeSO_4$	87
KCl	100	$ZnCl_2$	106
$SnCl_2$	106	None	100

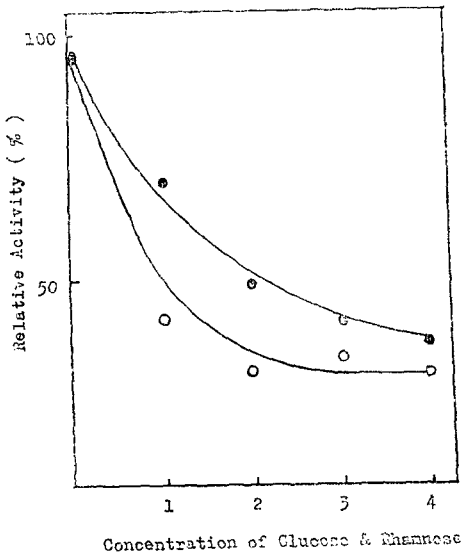

Fig. 16. Effect of Glucose and Rhamnose Concentation on the Activity of Naringinase.
—●— : Glucose, —○— : Rhamnose

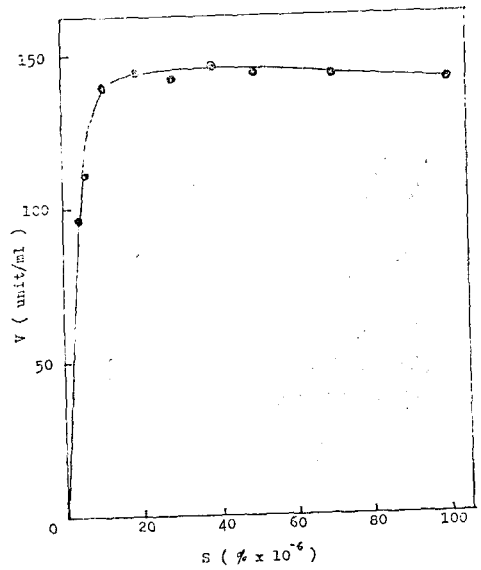

Fig. 17. Graphic Representation of Michaelis-Menten Equation.

한 時間 反應後 活性을 測定해 본 結果 Fig. 16과 같은 結果를 얻었다. Naringinase는 glucose와 rhamnose에 의해 阻害를 받고 있었으며 rhamnose에 의한 阻害作用이 더 强한 것으로 나타났다. 또한 glucose에 의한 阻害는 Thomas 등의 實驗[25]에서 보다 약간 낮은 것으로 나타났다. 岡田 등의 實驗

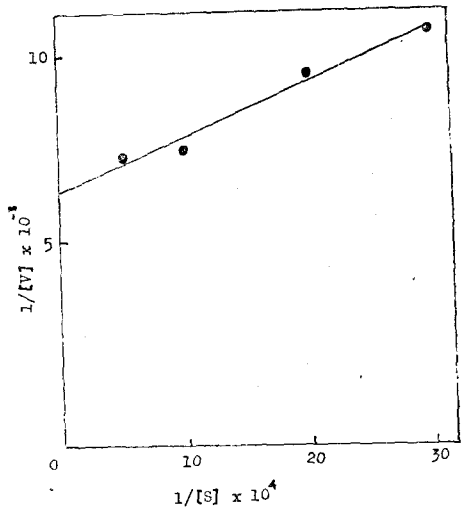

Fig. 18. Graphic Representation of Linewever-Burk Plot.

에 의하면 rhamnose는 naringin을 prunin으로 分解하는 酵素作用을 阻害하며 glucose는 prunin으로부터 naringenin으로 分解하는 酵素作用을 阻害하는 것으로 나타났다[19]. 이 結果에 따르면 본 酵素는 위의 두 反應에 관여하는 것임이 밝혀졌다.

(7) 酵素의 기질에 대한 親和性

기질濃度 3×10^{-6}~10^{-4}% 범위로 하여 酵素溶液(O. D. at 280 nm 0.07)을 反應시킨 結果 기질濃度 10^{-5}% 以上에서는 反應速度의 變化는 없었다. (Fig. 17). 이를 Lineweaver-Burk plot에 의해[26] graph를 作成하고 (Fig. 18) Km치를 求한 結果 2.3×10^{-6}g/ml (3.96×10^{-3}mM)였다.

要 約

*Aspergillus nidulans*로부터 추출한 naringinase를 精製하여 物理化學的 性質을 검토하였다.

1) 酵素는 유안침전, DEAE-Sephadex A-25, Sephadex G-100 column chromatography를 사용하여 精製하였으며 精製結果 두 개의 fraction이 나타남을 發見하였고 Fraction Ⅰ의 比活性은 粗酵素의 781배 증가함을 나타내었다.

2) 酵素의 反應 最適 pH와 溫度는 위의 두 fraction에서 같은 結果를 나타내었다. 最適 pH는 5.0이었으며 最適溫度는 40°C이었다.

3) 粗酵素液, Fraction Ⅰ 및 Fraction Ⅱ의 分解産物은 paper chromatography를 통해 조사한 結

果 naringenin, glucose 및 rhamnose 임이 밝혀졌다.

4) Andrew의 gel filtration 法에 의한 分子量을 測定한 結果 Fraction Ⅰ은 약 78,000, Fraction Ⅱ는 약 26,000으로 推定되었다.

5) 酵素의 安定性에 미치는 pH의 影響은 pH 5.2에서 15分間 처리로 60°C에서 50%가 失活되었으며 70°C에서는 거의 다 失活되었다.

6) 酵素反應에 미치는 金屬이온의 影響은 Fe^{2+}가 약간의 活性을 阻害하였을 뿐 별로 影響이 없었다.

7) 酵素의 기질에 대한 親和性에서 Km 값이 2.3×10^{-6} g/ml로 推定되었다.

參考文獻

1) Shintaro Kamiya, Sachiko Esaki and Misao Hama: *Agr. Biol. Chem.*, **3I**, (2), I33 (1967).

2) 岡田茂孝, 岸淸, 東原昌孝, 福本壽一郎 : 日農化, **37** (2), 84 (1963).

3) 岡田茂孝, 岸淸, 東原昌孝, 福本壽一郎 : 日農化, **37** (3), 142 (1963).

4) B. V. Chandler and K. J. Nicol: *CSIRO Fd Res.* Q., **35**, 69 (1975).

5) 柳洲鉉, 文順王, 梁隆, 卞裕亮 : 산업미생물학회지, **6**, 59 (1978).

6) W. B. Davis: *Anal. Chem.*, **19**, 476 (1947).

7) 松原良, 土井信明, 河村洋治, 森下淑郎 : 日本食品工業學會誌, **21** (8), 24 (1974).

8) 井上雅資, 岡田茂孝 : 科工, **43**, 642 (1969).

9) Mitsuo Yagisawa, Koso Kato, Yojiro Koba and Seinosuke Veda: *J. Ferment. Technol.*, **50** (9), 372 (1972).

10) Kei Arima, Ju Hyun Yu, Shinjiro Iwasaki and Gakuzo Tamura: *Appl. Microbiol.*, **16** (11), 1727 (1968).

11) Shigetaka Ishii and Tamotsu Yoktsuka: *Agr. Biol. Chem.*, **39** (2), 8313 (1975).

12) Masayuki Sato and Akira Kaji: *Agr. Biol. Chem.*, **39**(4), 819 (1975).

13) R. M. C. Dawson and Daphne C. Elliott et. al. : *Data for Biochem. Reserch*, 615 (1969).

14) Wilbert F. Steele and H. Y. Yang: *Food Technology*, March, p 121 (1960).

15) 기우경 : 한국산업미생물학회지, **2** (2), 111 (1974).

16) B. Bram and G. L. Solomons: *Appl. Microbiol.* **13** (6), 842 (1965).

17) 岡田茂孝, 岸淸, 東原昌孝, 福本壽一郎 : 日農化, **37** (3), 146 (1963).

18) 岡田茂孝, 板谷公和, 福本壽一郎 : 日農化, **38** (5), 242 (1964).

19) 岡田茂孝, 도野眞弓, 福本壽一郎 : 日農化, **38** (5), 246 (1964).

20) 瀧口洋 : 日農化, **39** (5), 194 (1965).

21) *Hand Book of Chromatography*; Vol. I, CRC Press, p312 (1972).

22) P. Andrew: *Biochem. J.*, **91**, 222 (1964).

23) 기우경, 김종규, 김명찬, 한국식품과학회지, **5** (2), 78 (1973).

24) 기우경, 성낙계 : 한국농화학회지, **13** (3), 237 (1970).

25) D. W. Thomas, C. V. Smythe and M. D. Labbee: *Food Research*, **23**, 591 (1959).

26) Lahdler and Buting: *The Chemical Kinetics of Enzyme Action*, p 68 (1973).