

Aspergillus屬이 生成하는 Pectin Esterase의 酵素學的 性質

宋亨翼·俞大植*·鄭基澤

慶北大學校 農科大學·啓明大學校 理工大學*

Enzymatic Properties of Pectin Esterase from *Aspergillus* sp.

Hyung Ik Song, Tae Shick Yu* and Ki Taek Chung

College of Agriculture, Kyungpook National University, Dae-gu 630 and

College of Science and Engineering, Keimyung University*, Dae-gu 630, Korea

Abstract: The enzymatic properties of pectin esterase from *Aspergillus* sp. were studied. The optimum conditions for the enzyme reaction were pH 4.2 and temperature of 45°C. The crude enzyme was very stable at pH range of 2.2~4.6, but about 20 percent of activity was lost at the range of pH 5.4~8.0. The crude enzyme was very stable at 50°C for one hour, however almost 100 percent of enzyme activity was lost at 70°C for 30 minutes. The pectin esterase activity of crude enzyme was greatly inhibited by addition of sodium chloride at lower pH range. That is, the inhibition rates of enzyme activity at pH 3.0 and 4.0 were 47% and 28% in concentration of 1M sodium chloride, respectively. The enzyme activity was not affected by sodium chloride at pH 7.0 at different concentration of sodium chloride. Although the enzyme activity was not affected by addition of sucrose, it was slightly inhibited at higher concentration of sucrose.

緒 論

Pectinase는 微生物을 비롯해서 果實 등의 高等植物界와 下等植物에 이르기까지 自然界에 널리 分布되어 있으며 (Mill *et al.*, 1961; Phaff *et al.*, 1956) 微生物에서는 곰팡이(Hasegawa *et al.*, 1962; Linker *et al.*, 1956; Ludowieg *et al.*, 1961; 徐 등, 1967), 細菌(小澤, 1952; Patel *et al.*, 1958), 酵母(Lineweaver *et al.*, 1951)로부터 얻어질 수 있다. 특히 곰팡이에서 由來하는 pectinase는 酵素生産量이 많고 果汁의 澄清力이 강하며 효소학적 성질이 基質의 條件과 類似的한 點(Reed, 1954) 등으로 pectinase製劑로 1930年代(全國 清凉飲料研究會, 1962) 부터 果汁, 果實酒의 澄清化에 널리 利用되고 있다.

天然에 存在하는 pectin은 galacturon酸의 1,4-glucoside結合으로 이루어진 高分子의 물질로서 carboxyl基의 약 75%가 methyl ester로 되어 있다(長谷川 등, 1975). Pectin分解酵素는 pectin의 加水分解에 관여하

는 酵素群의 총칭으로 여러 종류의 효소가 존재한다. 즉, 不溶性의 天然 pectin을 可溶化하는 단계에서 作用하는 protopectinase, pectin의 methyl ester를 加水分解하여 pectin酸을 生成시키는 pectin esterase (P.E.) 및 pectin酸에 作用하여 galacturon酸의 1,4-glucoside結合을 가수분해하는 polygalactronase(P.G.)로 크게 나눌 수 있다.

澄清化 機作에 대해서는 아직 충분히 解明되어 있지 않으나 이들 효소가 共同으로 관여한다고 알려져 있으며 특히 P.E.와 P.G.의 共同作用에 의한다고 보는 見解가 지배적이다. 즉 P.E.에 의한 pectin의 methyl ester結合의 加水分解가 先行된 다음에 P.G.에 의한 polygalacturon酸의 分解가 일어나서 pectin의 완전 가수분해가 이루어진다는 것이다.

이런 관점에서 P.E.의 역할은 극히 重要的 意味를 지닌다고 할 수 있다. P.E.에 관해서는 高等植物(Hills *et al.*, 1947; MacDonnell *et al.*, 1945; Pollard *et al.*, 1951), 酵母(Bell *et al.*, 1956), 細菌(Mills, 1949) 등을 대상으로 多數의 論文이 있으며 곰팡이에서 由來되

는 P.E.에 관해서도 많은 研究가 있다. (Calesnick *et al.*, 1950; Dahodwala *et al.*, 1974; Endo, 1961a·1961b·1961c; Kimura *et al.*, 1974; Phaff, 1947; Wagoner *et al.*, 1955; Yoshihara *et al.*, 1977).

그러나 곰팡이의 耐酸性 pectinase에 관한 研究는 거의 없으므로 저자들은 耐酸性 pectinase를 生成하는 *Aspergillus*屬의 한 菌株를 대상으로 하여 이 菌株가 生成하는 P.E.에 대한 酵素學的 特性을 調査한바 그 結果를 報告하고자 한다.

實驗材料 및 方法

1. 供試菌株

pH 3.0으로 調節한 사과 果汁에서 自然 生育하는곰팡이 중에서 耐酸性 pectinase를 生成하는 菌株를 選別, 固定한 것으로 耐酸性 pectinase를 강하게 生成하는 *Aspergillus*屬의 한 菌株(高, 1978)를 대상으로 하였다.

2. 菌의 培養

酵素生産을 目的으로 하는 菌의 배양은 우선 綿絨 flask에 Table I과 같은 組成의 酵素生産用 培地를 넣고 1kg/cm²에서 15分間 加壓滅菌한 후 供試菌株의 胞子를 接種하여 30°C에서 5日間 배양하여 포자를 形成시켰다. 이것을 滅菌한 효소생산 배지에 다시 接種하여

Table I. Medium for enzyme production

Wheat bran	100g
Sucrose	1g
0.2 N-HCl solution	70ml

常法에 따라 30°C에서 4日間 培養하여 P.E.를 충분히 生成시켰다.

3. 酵素液의 調製

酵素를 生成시킨 培地에 deionized water를 배지의 200%되게 添加하여 수시로 攪拌하면서 冷暗所에서 24時間 효소를 抽出하고 여과지로 여과하여 酵素抽出液을 얻었다.

4. 酵素의 組精製

Scheme 1과 같이 上記 酵素抽出液에 ammonium sulfate를 酵素液의 80%되게 飽和시켜 酵素를 沈澱시키고 3,000rpm에서 15分間 원심분리하여 沈澱物을 0.1M-citrate buffer (pH 4.0)에 溶解시켰다. 이것을 다시 10,000rpm에서 30分間 원심분리하여 그 上澄液을 deionized water로 24시간 透析하여 粗酵素液으로 使用하였다.

Extract of wheat bran culture
 ↓ precipitated by 80%
 ↓ ammonium sulfate saturation
 ↓ centrifuged at 3,000rpm for 15min.
 Precipitate
 ↓ dissolved in 0.1M-citrate
 ↓ buffer (pH 4.0)
 ↓ centrifuged at 10,000 rpm for 30 min.
 Supernatant
 ↓ dialysed with deionized water
 ↓ for 24 hr.
 Crude enzyme solution

Scheme 1. The partial purification procedures of pectin esterase.

5. 酵素力의 測定

P.E.의 酵素力 測定은 一般적으로 利用되는 alkali滴定法(長谷川 등, 1975)에 準했다.

1% citrus pectin 5ml를 정확히 시험관(1.5×15cm)에 취하고 deionized water(또는 buffer solution)를 添加하여 40°C에서 5分間 豫溫하고 粗酵素液 0.2ml를 첨가하여 全容量을 10ml로 조정한다. 40°C에서 30分間 酵素反應을 시키고 끓는 물에 10分間 放置하여 酵素反應을 停止시킨 다음 냉각후 酵素作用에 의해 유리된 carboxyl基를 pH meter (Mitamura Riken Kogyo, Model MRK-Chemtrix)를 利用하여 0.02N-NaOH로 pH 8.0까지 滴定하여 滴定値를 구한다. 별도로 酵素液을 넣지 않은 對照區의 滴定値를 구하여 酵素力單位는 處理區와 對照區의 滴定値의 差에서 酵素液 1ml가 60分間에 生成하는 carboxyl基의 μM수로 나타내었다. 0.02N-NaOH 1ml는 20μM의 carboxyl基에 해당한다.

6. 供試材料

小麥麩는 市販飼料用으로 水分 含量 14%정도의 것을 使用하였으며 citrus pectin은 日本 Kisida化學 製品을 日本 大阪府立大學 農學部 醱酵化學研究室에서 分讓받아 使用하였고 一般藥品은 試藥用特級品을 구입하여 사용하였다.

結果 및 考察

1. pH의 영향

本酵素의 pH에 의한 영향을 검토하기 위하여 McIlvaine buffer로 pH를 2.6~6.2로 조절하여 40°C에서 酵素 活性을 測定했다.

Fig.1에 나타난 바와 같이 本酵素는 pH 4.2에서 가

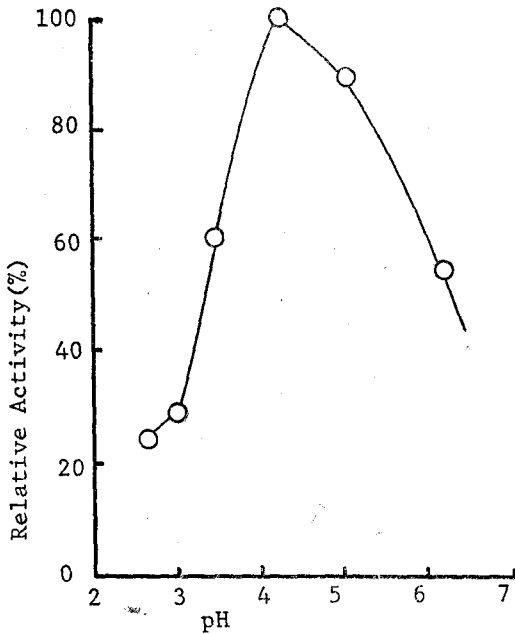


Fig. 1. Effect of pH on pectin esterase activity.

장 활성이 높았으며 pH 5.0에서도 90%정도의 효소 활성을 나타내었다.

이 결과는 *Coniothyrium diplodiella*에서 얻은 粗精製 효소의 최적반응 pH가 4.0(Endo, 1961c)이고 精製 효소의 pH가 4.5~5.0(遠藤, 1963)이었다는 報告와 비슷한 수치이며, *Penicillium chrysogenum*이 3.3~3.4(Phaff et al., 1947), *Aspergillus niger*가 2.0~3.5(Dahodwala et al., 1974), *Corticium rolfsii*가 2.5~4.5(Yoshihara et al., 1977)로 나타나서 本酵素보다는 酸性側に 치우치는 경향을 나타냈으나 *Fusarium oxysporum*의 最適反應 pH는 5~7(Waggoner et al., 1955)이어서 本酵素보다는 높은 효소反應 pH를 나타내었으므로 P.E.는 각 菌株에 따라 最適反應 pH가 다른 것으로 나타났다.

2. 溫度的 영향

酵素活性의 最適온도를 測定하기 위하여 pH 4.0에서 효소반응 온도를 35~55°C로 조정하여 효소活性을 측정하였다.

Fig. 2에 나타난 바와 같이 本酵素는 最適反應溫度가 45°C였으며 50°C 以上에서는 급격한 효소活性의 減少를 나타내었다. 이 결과는 Yoshihara等(1977)이 *Corticium rolfsii*에서 얻은 P.E.의 최적반응온도 45°C와 同一하며 Dahodwala等(1974)이 *Aspergillus niger*에서 얻은 40°C와 비슷하였다.

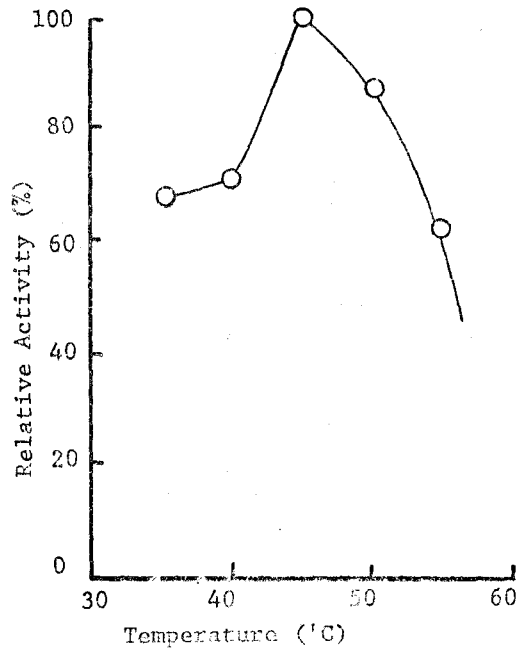


Fig. 2. Effect of temperature on pectin esterase activity.

3. pH에 대한 安定性

P.E.의 pH에 대한 安定性을 檢討하기 위하여 McIlvaine buffer (pH 2.2~8.0)에 粗酵素를 溶解시켜 30°C에서 10分間 熱處理한 다음 pH 4.0으로 조정하고 40°C에서 효소反應을 시켜 殘存酵素活性을 各各 측정하여 相對活性度를 얻었다.

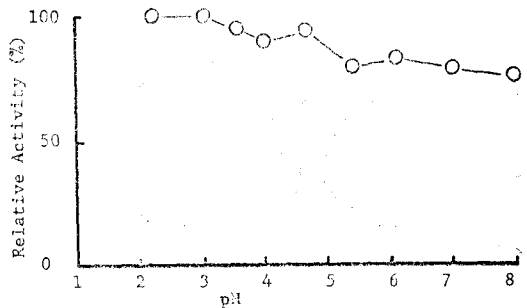


Fig. 3. Effect of pH on pectin esterase stability.

Fig. 3에 나타난 바와 같이 本酵素는 pH 2.2~4.1에서는 극히 安定하였으며 pH 5.4~8.0에서도 약 20%정도의 효소失活만을 가져왔으므로 酸性에서 中性까지의 pH領域에서 比較的 安定한 것으로 나타났다.

Corticium rolfsii(Yoshihara et al., 1977)의 P.E.는 pH 1.1~10.0에서 安定하다고 報告하고 있어서 本酵

素보다는 더 넓은 安定 pH領域을 가지며 *Coniothyrium diplodiella*(Endo, 1961c)는 pH2.0~4.0에서 극히 安定하고 pH1.0에서 33%, pH7.0에서 完全失活되었다고 報告하고 있어서 本酵素보다는 不安定한 것으로 보인다.

4. 熱에 대한 安定性

pH 4.0으로 調節한 酵素液을 40°C, 50°C, 60°C 및 70°C의 water bath에서 60分間 熱處理하면서 40°C에서 酵素反應을 시켜 經時的으로 殘存하는 酵素活性을 測定한 結果를 Fig.4에 나타내었다.

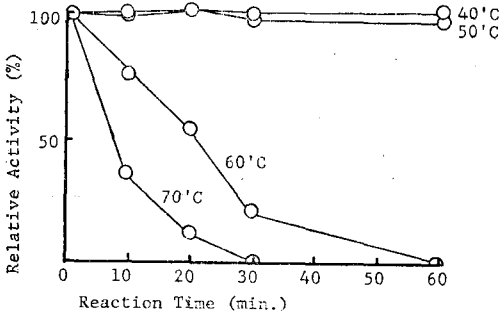


Fig. 4. Effect of temperature on pectin esterase stability.

本酵素의 熱에 대한 安定性을 보면 40°C와 50°C에서는 60分間 熱處理로 安定하였으며 60°C에서 20分 열 처리로 約 50%의 酵素活性을 나타내며 70°C에서는 30分으로 거의 完全 失活되었다.

*Coniothyrium diplodiella*의 粗精製 P.E.(Endo,1961c)에서는 50°C, 10分 열 처리로 50% 失活되었고 70°C, 10分 열 처리로 完全 失活되었으며 精製 P.E.(遠藤, 1963)는 60°C, 10分으로 完全 失活했다고 報告하고 있다. 한편 *Corticium rolfsii*(Yoshihara et al., 1977)에서는 55°C에서 10分으로 完全 失活했다고 보고하고 있어서 本酵素는 이들 효소보다는 比較的 열에 安定한것 같다.

5. NaCl의 영향

McIlvaine buffer로 pH를 3.0, 4.0, 5.8 및 7.0으로 조절하고 NaCl을 0~1.0M 濃도가 되게 添加한 다음 40°C에서 酵素活性을 측정하여 相對活性度를 구하였다.

Fig. 5에서 보는 바와 같이 本酵素에 대하여 NaCl은 阻害作用을 나타냈으며 pH가 낮아질수록 阻害가 뚜렷해지는 경향을 나타내었다. pH5.8과 7.0에서는 거의 영향이 없으나 1.0M NaCl농도에서 pH3.0에서는 47%의 阻害를 보였으며 최적 pH부근인 pH4.0에서도 약

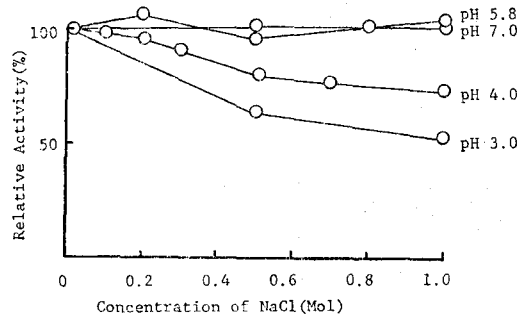


Fig. 5. Effect of NaCl on pectin esterase activity.

28%의 酵素活性의 減少를 가져왔다.

이러한 結果는 pH4.5, 0.1~0.5M NaCl 濃度에서 *Aspergillus niger*의 P.E.活性은 약간 阻害되거나 아무런 영향을 미치지 못했다는 Dohodwala等(1974)의 報告와 비슷하며 papaya P.E.에 있어서 최적 pH 7.5에서 NaCl은 activator로 作用하여 0.2M에서 最大活性을 나타냈다는 Chang等(1964)의 보고와 *Coniothyrium diplodiella*에 있어서 NaCl은 0.2~0.3M농도에서 酵素活性을 뚜렷이 促進시켰다는 Endo(1963)의 報告 및 Yoshihara等(1977)이 얻은 *Corticium rolfsii*의 P.E.에 있어서 NaCl 0.05~0.1M에서 無添加區에 비해 34~36%의 효소活性을 促進시켰다는 報告와는 相異한 結果였다.

一般的으로 NaCl은 곰팡이 P.E.에 대하여 activator로 作用하며 그 濃度는 pH에 따라 달라진다고 알려져 있으나 本實驗에서는 pH에 따라서 NaCl은 아무런 영향을 미치지 못하거나 일부 阻害하는 것으로 나타났다

6. Sucrose의 영향

本酵素의 sucrose에 의한 영향을 검토하기 위하여 各各의 sucrose농도에서 pH 4.0, 40°C로 酵素反應을 시켜 sucrose농도별 효소活性을 측정하였다.

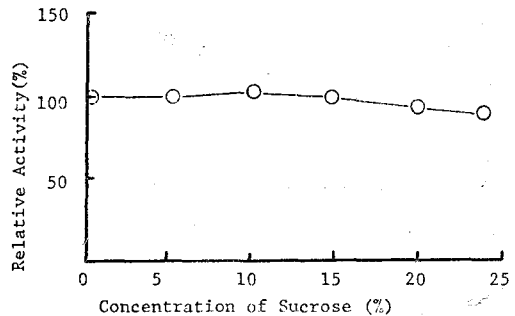


Fig. 6. Effect of sucrose on pectin esterase activity.

Fig. 6에 나타난 바와 같이 본酵素는 sucrose에 대하여 거의 영향을 받지 않았다. 그러나 24%의 sucrose 농도에서는 無添加區에 비해 13% 정도의 阻害를 보였다. Chang等(1964)은 papaya P.E.에서 50% sucrose 농도까지 거의 직선적으로 저해하며 25%에서 pH(6~9)나 NaCl 농도(0.02~0.35M)에 關係없이 30~40%의 저해를 나타냈다고 報告하고 있어서 본酵素와는 다른 結果였다.

要 約

耐酸性 pectinase를 강하게 生成하는 *Aspergillus*屬의 한 菌株에 대한 P.E.의 酵素學的 性質을 檢討하였다.

本酵素의 最適反應 pH는 4.2부근이며 最適反應溫度는 45°C부근이고 pH 2.2~4.6에서 安定하며 pH 5.4~8.0에서도 比較的 安定하여 20%정도의 酵素失活에 지나지 않았으므로 pH에 대해 비교적 安定한 것으로 나타났다.

熱에 대한 安定성은 50°C에서 1시간 處理로 극히 安定하며 70°C에서 30분처리로 완전히 失活했다.

本酵素 作用에 있어서 NaCl은 阻害作用을 나타냈으며 pH가 낮아질수록 阻害가 뚜렷해서 pH 7.0에서는 거의 영향이 없으나 1.0M NaCl농도일 때 pH 3.0에서는 47%, pH4.0에서는 28%의 相對活性阻害를 나타내었다. sucrose에 대한 영향을 본 결과 본酵素에 대하여 거의 영향이 없으나 高濃度에서는 약간의 阻害를 보였다.

參 考 文 獻

- Bell, T.A. and Etchells, J.L. (1956): *Appl. Microbiol.*, 4:196.
- Calesnick, E.J., Hills, C.H. and William, J.J. (1950): *Arch. Biochem.*, 29:432.
- Chang, L.W.S., Morita, L.L. and Yamamoto, H.Y. (1964): *Hawaii Agr. Expt. Sta. Tech. Paper*, 696: 218.
- Dahodwala, S., Humphrey, A. and Weibel, M. (1974): *J. Food Sci.*, 39: 920.
- Endo, A. (1961a): *Agr. Biol. Chem.*, 25:382.
- Endo, A. (1961b): *ibid.*, 25:389.
- Endo, A. (1961c): *ibid.*, 25:394.
- Hasegawa, S. and Nagel, C.W. (1962): *J. Biol. Chem.*, 237:619.
- Hills, C.H. and Mottern, H.H. (1947): *J. Biol. Chem.*, 168:651.
- Kimura, H. and Mizushima, S. (1974): *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 20:33.
- Lineweaver, H. and Jansen, E.F. (1951): *Advance in Enzymology*, 11:267.
- Linker, A., Meyer, K. and Hoffman, P. (1956): *J. Biol. Chem.*, 219:13.
- Ludowieg, J., Vennesland, B. and Dorfman, A. (1961): *ibid.*, 236, 333.
- MacDonnell, L.R., Jansen, E.F. and Lineweaver, H. (1945): *Arch. Biochem.*, 6:389.
- Mill, P.J. and Tuttobello, R. (1961): *Biochem. J.*, 79:57.
- Mills, G.B. (1949): *ibid.*, 44:302.
- Patel, D.S. and Phaff, H.J. (1958): *Food Research*, 23:693.
- Phaff, H.J. (1947): *Arch. Biochem.*, 13:67.
- Phaff, H.J. and Demain, A.L. (1956): *J. Biol. Chem.*, 218:875.
- Pollard, A. and Kieser M.E. (1951): *J. Sci. Food and Agr.*, 2:30.
- Reed, G. (1954): *Amer. J. Enol. Vitic.*, 5:17.
- Waggoner, P.E. and Diamond, A.E. (1955): *Phytopathology*, 45:79.
- Yoshihara, O., Matsuo, T. and Kaji, A. (1977): *Agr. Biol. Chem.*, 41: 2335.
- 高愛賢(1978): 啓明大學 大學院 碩士學位 論文.
- 小澤潤二郎(1952): 日本農藝化學會誌, 26:505.
- 徐正墳, 孫泰華, 鄭基澤, 金鍾奎 (1967): 慶北地區 사과 開發에 關한 綜合的 研究, 慶北大 生産技術研究所, p.93.
- 遠藤章(1963): 日本食品工業學會誌, 10:32.
- 全國清涼飲料研究會(1962): ソフトドリンクス, 光琳書院, p.23. 日本
- 長谷川忠男 等(1975): 食品酵素高分子學概論(下), 地人書館, p.127, 132.

<Received January 22, 1981>