

Verticillium sp. 가 생산하는 Protopectin 용해효소에 관한 연구

(제 2 보) 효소의 정제 및 성질

유주현 · 진효상 · 변유량 · 오두환
연세대학교 공과대학 식품공학과
(1982년 8월 21일 수리)

Studies on the Protopectinase Produced by *Verticillium* sp. (Part 2) Purification and Properties of Protopectinase from *Verticillium* sp.

Juhyun Yu, Hyosang Jin, Yuryang Pyun and Doohwan Oh

Dept. of Food Engineering, Yonsei University

(Received August 21, 1982)

Abstract

The protopectinase from the culture extract of a *Verticillium* sp. was purified about 1000 fold by ammonium sulfate fractionation, DEAE-Sephadex treatment and Sephadex G-75 column chromatography.

The purified enzyme was homogeneous on electrophoresis and its molecular weight was estimated to be 38000 by Andrew's gel filtration, method. The enzyme was almost stable under the temperature of 40°C and within the pH range of 3—5. Its optimum pH and temperature were 4 and 40°C, respectively. The activity was markedly inhibited by galacturonic acid.

The purified enzyme was able to macerate various kinds of plant tissues, such as radish, cucumber, onion, carrot, and potato. It also reduced the viscosity of pectin solution more rapidly than that of pectic acid solution and showed no lyase or CMCase activity.

서 론

전보에서¹⁾ Protopectin 용해효소를 생산하는 곰팡이가 토양으로 부터 분리되었고, 이 곰팡이는 *Verticillium* SP. 인 것으로 동정된 바 있다.

본 연구는 전보의 *Verticillium* SP. 가 생산하는 Protopectin 용해효소의 정제와 그 성질에 관한 것이다.

실험재료 및 방법

Pectic Substance

Galacturonic acid는 Tokyo Kasei 사 제품을, pactic acid는 Wako Pure Chemical사 제품을, pectine은 Tokyo Kasei사와 Sunkist Grower 사 제품을 사용하고, protopectin은 Ripa의 방법²⁾에 따라 조제하였다.

효소의 활성측정

Propopectin 용해활성은 Protopectin 50mg, 효소액 0.5ml 및 0.04M acetate butter, pH 5, 4.5ml를 포함한 반응액을 40°C 에서 1 시간 반응시켰을 때 반응액중에 총 1mg의 pectic substance를 용해시켜내는 효소량을 1 단위로 하였다. Pectic Substance 정량은 Carbazole sulfuric acid method³⁾에 의하여 galacturonic acid를 표준물질로 하여 작성한 표준곡선을 이용하였다.

Pectin 분해활성은 반응액의 점도감소와 생성된 환원당량에 의해 측정하였다. 반응액은 0.2 M acetate buffer, pH5, 2.5ml, 1%pectic substance 용액 2.5ml와 효소액 1ml로 구성되고, 반응액의 점도감소는 40°C 항온조에서 Ostwald Viscometer로 측정하고 생성된 환원당은 galacturonic acid를 표준물질로 하여 Somogyi-Nelson법⁴⁾으로 측정하였다.

Lyase 활성은 Ishii 등의 방법⁵⁾을 변형하여 사용하였다. 즉 pectic substance가 0.5% 농도로 함유된 0.1M acetate buffer, pH5, 1.8ml에 효소액 0.2ml를 가하여 40°C 에서 일정시간 반응시킨 후 Spectrophotometer를 사용하여 235 mm에서 반응액의 흡광도 증가 여부를 측정하였다.

Macerating activity는 두께 1mm의 식물체 절편을 Britton-Robinson buffer 1ml toluene 0.1 ml 및 enzyme 1ml이 담긴 10ml용 ample에 넣고 40°C에서 6 시간 동안 때때로 흔들어 주며 방치한 후 조직의 마쇄정도를 육안으로 비교하였다.

결 과

효소의 정제

조효소액의 조제 : 밀가루 2 kg에 물 2.4l, NH₄NO₃, 10g 및 CaCl₂, 0.4g을 가한 배지에 200 g의 밀가루에서 사전 배양된 균을 혼합하여 27°C에서 60 시간 배양한 다음 물 11l를 가하여 조효소액 9 l를 얻었다.

Ammoniumsulfate fractionation : 효소의 비활성이 (NH₄)₂SO₄의 포화에 가까울 수록 높아지는 결과에 따라, 불순단백질을 제거하기 위하여 조효소액 9 l에 3.6kg의 (NH₄)₂SO₄를 서서히 용해시킨 후 하룻동안 방치하고나서 10분

간 원심분리 (10,000g)로 침전물을 제거하였다. 상등액은 다시 (NH₄)₂SO₄로 포화시킨 다음 하룻밤 방치하고나서 10,000g에서 10분간 원심분리로 침전물을 얻고, 이 침전물은 0.04M acetate buffer, pH5, 250ml에 녹여서 동일 buffer에서 1 일간 투석한 후 동결보관하였다.

DEAE-Sephaclex A-50 처리 : 동결 효소액중 15ml을 0.04M acetate buffer, pH5로 사전 평형된 DEAE-Sephadex A-50 Column에 가한 후 같은 buffer로 용출시키고 용출액을 fraction Collector로 분획하여 활성부분 (No. 11~27, 85 ml)을 모았다. (Fig 1)

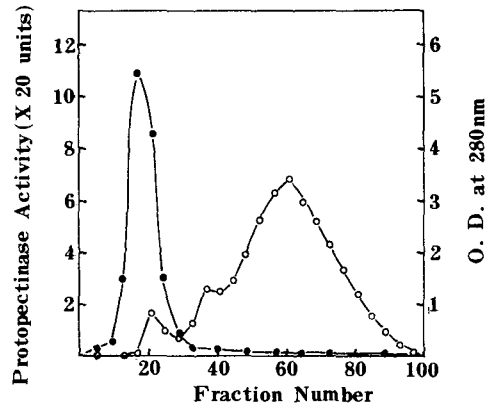


Fig. 1. Column Chromatogram of Protopectinase on DEAE Sephadex A-50 (2×45cm) 45cm)

The elution was carried out at the rate rate of 28ml/hr with 0.04 M acetate buffer, pH 5. The volume of each fraction was 5ml.

● : Protopectinase activity

○ : O. D. at 280nm

Sephadex G-75 Column chromatography : 전 단계에서 얻은 효소액 85ml을 (NH₄)₂SO₄로 포화시킨 후 5 시간 방치하여 원심분리로 모은 침전물을 0.04M acetate buffer, pH5, 2ml에 녹인 다음 동일 buffer로 평형된 Sephadex G-75 column (2.4×60cm)에 가하고 용출시켜 활성부분 (No. 27~38, 54ml)을 모았다.

이 54ml를 위와 같은 방법으로 rechromatography를 행하여 최종적으로 활성부분 (No. 24~34) 31ml를 얻었다. (Fig. 3)

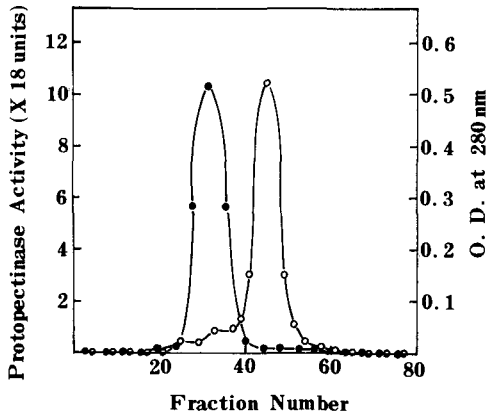


Fig. 2. Column Chromatogram of Protopectinase on Sephadex G-75 (2.4×60cm)

The elution was carried out at the rate of 25 ml/hr with 0.04M acetate buffer, pH 5. The volume of each fraction was 4.5ml.

- : Protopectinase activity
- : O. D. at 280nm

이상의 정제 과정을 거쳤을 때 최종 정제효소의 비활성은 조효소액에 비해 약 1,000배 높았으며 수율은 2.5%였다. (Table 1)

효소의 성질

단일성 (Homogeneity) : 정제효소는 전기영동 상에서 단일 band로 나타나 단일 단백질인 것으로 생각되었다. (Fig. 4)

분자량 : Andrew의 방법¹⁵⁾에 따라 reference protein을 cytochrome C, ovalbumin 및 serum albumin으로 하여 측정된 효소의 분자량은 약 38,000인 것으로 나타났다. (Fig. 5)

효소의 안정성 및 활성에 미치는 온도의 영

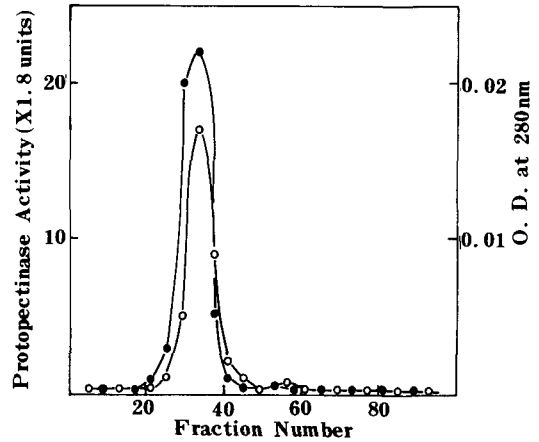


Fig. 3. Column Rechromatogram of Protopectinase on Sephadex G-75 (2.4×60cm)

The elution was carried out at the rate of 25 ml/hr with 0.04 M acetate buffer, pH 5. The volume of each fraction was 4.5ml.

- : Protopectinase activity
- : O. D. at 280nm

향 : 효소액 0.5ml를 0.04M acetate buffer, pH 5, 0.5ml에 가한 뒤 여러 온도에서 15분간 처리한 후 잔유활성을 측정해 보았을 때, 처리 온도 40°C까지는 최초활성이 거의 유지되었으나, 50°C 이상에서 급격히 감소되었고, 70°C에서는 완전히 실활되었다. (Fig. 6)

효소의 활성은 40°C에서 가장 컸으며 이 온도에서 멀어질수록 감소하였다. (Fig. 7)

효소의 안정성 및 활성에 미치는 pH의 영향 : 먼저 안정성을 보았을 때 처리 pH가 3~5 구간에서는 잔유활성이 최초활성을 유지하였으나, 이 구간 밖의 pH에서는 감소되었다. (Fig. 8)

효소의 최적활성 pH는 4였으며 이 밖의 범위에서는 급격한 활성의 감소를 보였다. (Fig. 9)

Table. 1. Purification of Protopectinase from *Verticillium sp.*

Purification Step	Total				
	Volume (ml)	Activity (unit)	O. D (280nm)	Specific Activity	Yield (%)
Crude Extract	9,000	144,000	41,400	3.5	100
Ammonium Sulfate	250	84,000	2,350	35.7	58.3
DEAE Sephadex	85(x16)	22,576	49	460.7	15.7
Sephadex G-100 (1st)	54(x16)	12,614	4	3,153.5	8.8
Sephadex G-100 (2nd)	31(x16)	3,670	1	3,670.0	2.5

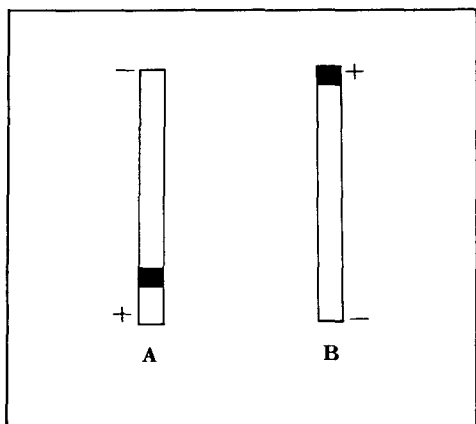


Fig. 4. Disc Electrophoretic Pattern of Purified Protopectinase B is the electrophoretic pattern of A with reverse polarity

The electrophoresis was carried out in 10% polyacrylamide gel (0.5×7cm) at 4 mA for 60 min. Coomassie brilliant blue was used as the stain.

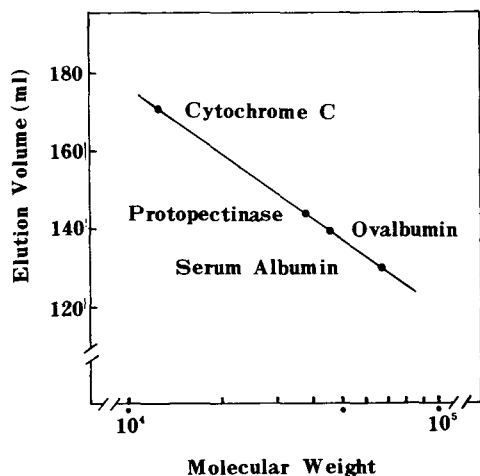


Fig. 5. Estimation of Molecular Weight by Gel-Filtration

The protopectinase and the marker proteins (1.5mg/2ml) were applied on a Sephadex G-75 column (2.4×60cm) and eluted with 0.04 M acetate buffer, pH 5. at the rate of 25ml/hr. The volume of each fraction was 4.5ml. The marker proteins in the fractions were detected at 230nm.

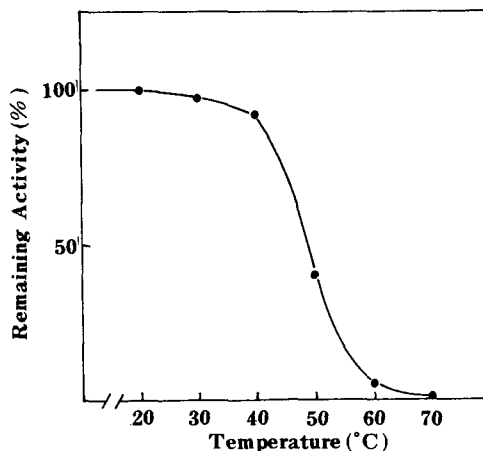


Fig. 6. Effect of Temperature on Protopectinase Stability

The enzyme in 0.5ml of 0.04 M acetate buffer, pH 5. was incubated for 15min. at various temperature. The remaining activity was expressed as percentage of the initial activity.

효소의 활성에 미치는 galacturonic acid의 영향: Fig. 10에 나타난 바와 같이 효소의 활성은 galacturonic acid에 의해 저해되었고, 최초 활성의 절반이상이 0.06% 농도의 galacturonic

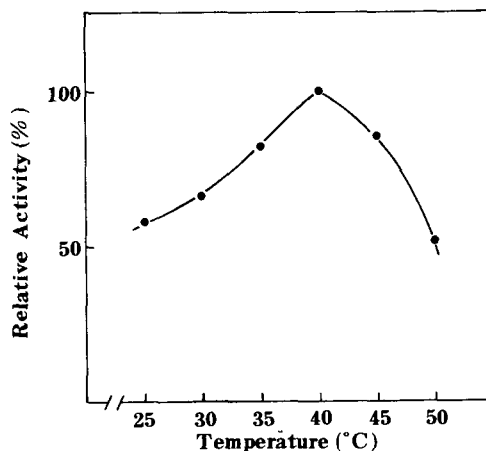


Fig. 7. Effect of Temperature on Protopectinase Activity

A reaction mixture containing 50mg of protpectin, 4.5ml of 0.04 M acetate buffer, pH 5. and 0.5ml of enzyme was incubated at indicated temperature for 1 hour. The enzyme activity was determined by the pectic substance in the filtrate of the reaction mixture.

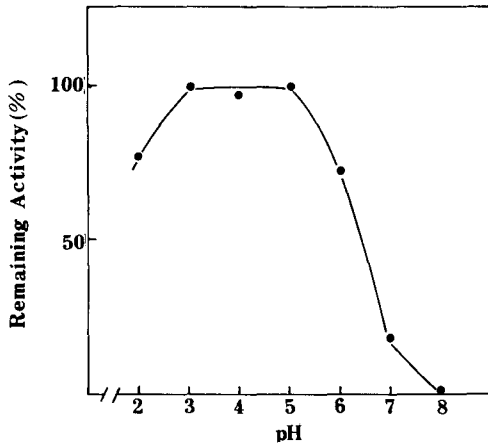


Fig. 8. Effect of pH on Protpectinase Stability

The enzyme was exposed to the indicated pH at 30°C for 20 hrs. The residual activity was measured after the pH was readjusted to 5. Britton-Robinson buffer was used for pH treatment and acetate buffer was used for the pH readjustment.

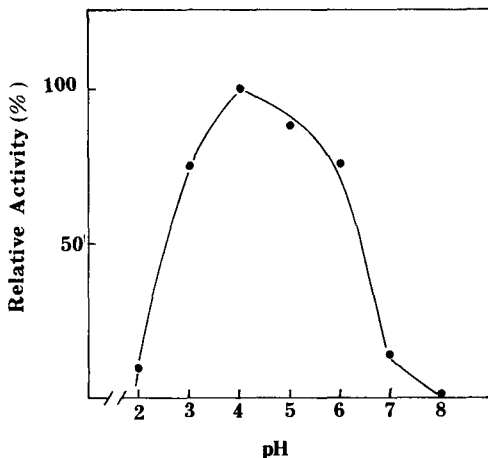


Fig. 9. Effect of pH on Protopectinase Activity

A reaction mixture containing 50mg of protopectin 4.5ml of Britton-Robinson buffer, pH indicated, and 0.5ml of enzyme was incubated at 40°C for 1hr. The enzyme activity was determined by the difference between the total pectic substance solubilized with enzyme and that solubilized without enzyme.

acid에 의해 저해됨을 볼 수 있었다. (Fig. 10)

효소의 작용: Pectic substance에 대한 효소의 작용을 검토한 결과는 Fig. 11과 같았다. 효소는 pH5로 조절된 pectin 및 pectic acid 용액의 점도를 모두 감소시켰으며, 이 중 pectin 용액의 점도를 더 빨리 감소시켰다. 이 때 pectic acid 용액 중의 환원당은 점도감소에 비하여 극히 미약하게 생성되었다. 또한 pectin용액의 반응산물을 paper chromatography에 의하여 경시적으로 살펴보았을 때 monogalacturonic acid는 2 시간 후에야 탐지되었다. (Fig. 12)

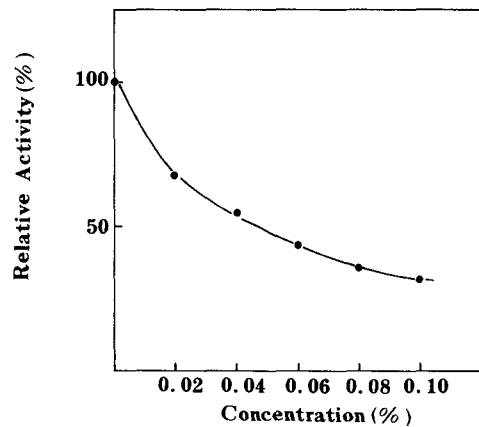


Fig. 10. Effect of Galacturonic Acid on Protopectinase Activity

Galacturonic acid was dissolved beforehand in reaction mixture containing 50mg of protopectin, 0.5ml of enzyme and 4.5ml of acetate buffer, pH 5. The activity was determined by the difference between the pectic substance in the filtrate of the mixture with enzyme and without enzyme.

식물조직에 대한 효소의 macerating activity: 효소에 의한 식물조직의 maceration은 pH 4와 5에서 비슷한 정도를 보였으며, 무우, 오이 및 양파조직의 maceration이 감자와 당근조직에 비하여 더 빨랐다. (Table 2)

고 찰

Pectic enzyme은 효소의 안정범위인 pH 3 ~ 5에서 양전하적 성질을 띄고 있어 Amberlite IRC-50⁷⁾, CM-Sephadex⁸⁾ 및 SE-Sephadex^{9, 10)} 같은 양이온 교환수지에 흡착이 잘되어 정제가 용이하나, 음이온 교환수지인 DEAE-Sephadex

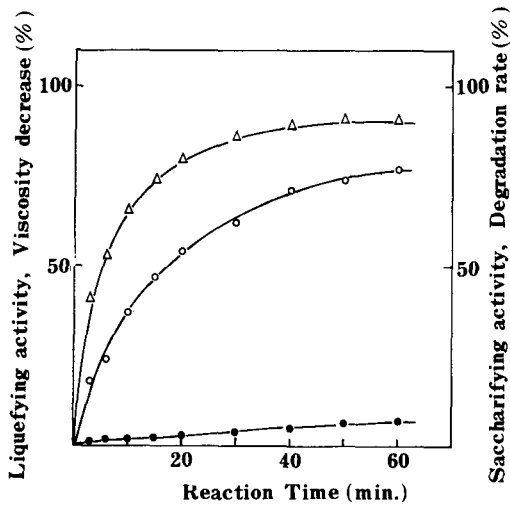


Fig. 11. Action of Protopectinase on Pectic Substance

The reaction mixture containing 2.5ml of 1 % pectic substance solution, 2.5ml of 0.2 M acetate buffer, pH 5. and 1ml of enzyme (7-units) was incubated at 40°C in an Ostwald viscometer. The efflux time and reducing sugar concentration were measured at intervals.

- △ : Liquefying activity on pectin
- : Liquefying activity on pectic acid
- : Saccharifying activity on pectic acid

Table. 2. Maceration of Plant Tissues by Protopectinase

Maceration was scaled from- (no evidence of cell separation) to +++++ (complete cell separation)

Plant Tissues	Maceration	
	pH 4	pH 5
Radish	++++	++++
Potato	+++	++
Cucumber	++++	++++
Onion	++++	++++
Carrot	+++	+++

로 처리하여도 Specific activity가 증가하고, 이등¹⁰도 DEAE-Sephadex와 gel filtration(G-100)으로 endo-PG를 정제한 바 있어, 본 실험

에서도 DEAE-Sephadex 처리 및 Sephadex G-75 column chromatography로 정제하였을 때, 효소의 비활성이 약 1,000배 증가하는 결과를 얻을 수 있었다.

정제효소는 polyacrylamide gel electrophoresis에서 단일 단백질인 것으로 나타났다.

효소의 분자량은 Sakai 등⁸이 보고한 yeast protopectinase의 분자량 (27,000)에 비해 컸으며, 이 등¹⁰이 보고한 endo-PG의 분자량 (35,000)과 비슷하였다.

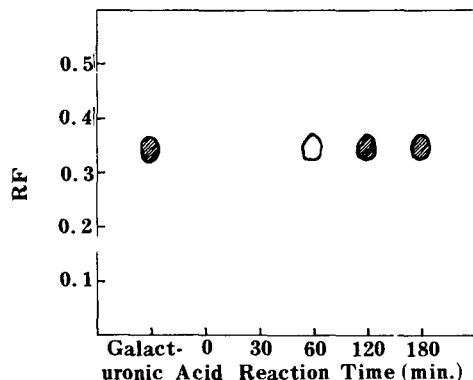


Fig. 12. Paper Chromatography of Pectin Hydrolyzates by Protopectinase

The reaction mixture containing 2.5ml of 1 % pectin solution, 2.5ml of 0.2M acetate buffer pH 5. and 1ml of enzyme was incubated at 40°C, sampled at intervals, and spotted on Toyo filter paper, NO 51. The paper was dipped in aniline phosphate after 10hr development in the solvent butanol-acetic acid-water (5 : 2 : 3)

온도에 관한 효소의 안정성은 Ishii 등^{8,10}의 endo-PG가 50°C에서 10분처리로 효소활성의 90%가 소실되었던 결과와 유사하였고, 활성의 최적온도는 이 등¹⁰의 endo-PG(40°C)와 같았으며 Ishii 등⁷의 endo-PG(45°C)와 유사하였다.

pH에 대한 효소의 안정성은 Ishii 등^{8,10}의 endo-PG 및 pectin lyase가 pH 3~5에서는 안정하나 이 구간 밖의 pH로 처리하면 효소활성이 비가역적으로 소실되었던 결과와 유사하였고, 효소의 최적활성 pH는 Ishii 등¹⁰의 pectin lyase (pH 6~7) 보다 낮으나 이 등¹⁰의 endo-PG (pH 4.5)와는 유사하였다.

효소의 활성은 galacturonic acid에 의해 저해되었고 이 결과는 Sakai 등¹²⁾이 보고한 protopectinase의 경우와 유사하였다.

효소는 pectin용액과 pectic acid용액의 점도를 각각 감소시켰으며, 이 때 이들 pectic substance 용액들의 점도는 급격히 감소되는데 반하여, 환원당과 monogalacturonic acid의 생성은 극히 미소한 점으로 보아 본 효소는 endo-type인 것으로 보였다.¹³⁾

효소는 식물체의 조직절편에 대하여 macerating activity를 나타내었다.

위의 결과를 종합하면 본 실험의 효소는 macerating enzyme이며 동시에 endo-PG 보다는 endo-PMG 성질이 강한 pectolytic enzyme으로서 *Cl. felsineum* var. *sikokianum*이 생산하는 macerating enzyme¹⁴⁾과 유사하며, 이 결과는 protopectinase는 macerating enzyme이긴 하나 pectolytic enzyme과 별개의 효소는 아니라는 근래의 견해와 부합하는 것이었다.

사 사

본 연구는 1981년도 문교부 학술연구비로 수행되었음.

참 고 문 헌

1) 유주현, 진효상, 이봉기, 오두환: 산업미생물학회지, **10**, 45 (1982)

- 2) Sucharipa, R. : *J. Am. Chem Soc.*, **46**, 145 (1924)
- 3) McComb, E. A. and R. M. McReady : *Anal.* **24**, 1630 (1952)
- 4) Nelson, N. : *J. Biol. Chem.*, **153**, 375 (1944)
- 5) M. Somogyi : *J. Biol. Chem.*, **195**, 19 (1952) M. Somogyi,
- 6) Ishii, S. and T. Yokotsuka : *Agr. Biol. Chem.* **36** 1 (1972)
- 7) Yamasaki, M., T. Yasui and K. Arima : *Agr. Biol. Chem.*, **30**, 1119 (1966)
- 8) Sakai, T. and M. Okushims : *Agr. Biol. Chem.*, **42**, 2427 (1978)
- 9) Ishii, S. and T. Yokotsuka : *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 1885 (1972)
- 10) Ishii, S. and T. Yokotsuka : *Agr. Biol. Chem.*, **39**, 313 (1975)
- 11) 이봉기, 유주현, 양웅, 조세훈, 유준: 산업미생물학회지, **4**, 63 (1976)
- 12) 坂井拓夫: 發酵工業, **37**, 928 (1979)
- 13) Reed, G. : *Enzymes in Food Processing*, Academic Press, N. Y. (1975)
- 14) Kazi, A. : *Bull. Agr. Chem. Soc., Japan*, **23**, 131 (1959)
- 15) Andrew R. : *Biochem. J.*, **91**, 222 (1964)