

*Aspergillus niger*가 生産하는 Endo-Polygalacturonase의 分離와 特性

박경빈 · 박관화

서울대학교 농과대학 식품공학과

Separation and Characterization of Endo-Polygalacturonase from *Aspergillus niger*

Kyong-Bin Park and Kwan-Hwa Park

Department of Food Science and Technology, College of Agriculture,
Seoul National University, Suwon 170

Abstract

The pectic enzymes produced from *Aspergillus niger* were separated into three fractions (F-A, F-I and F-II) by means of Sephadex and DEAE-Sephadex column chromatography. Each enzyme fraction was characterized by determining viscosity change and reducing surgar of the pectic acid-enzyme mixture and analyzing thin layer chromatogram of the reaction products. F-I rapidly reduced the viscosity of pectic acid solution and released reducing groups in a random manner so that appeared to be an endo-polygalacturonase (endo-PG). The optimum pH of endo-PG for viscosity reducing activity was 4.2 and that for releasing reducing surgar was 4.7. In the thermal inactivation of endo-PG at 30-45°C, the enthalpy of activation was 217.3 kJ/mole and z-value was 7.5°C. F-II and F-A were determined as endo-polymethylgalacturonase and exo-polygalacturonase, respectively.

서 론

천연과즙음료의 제조 및 포도주등에서와 같이 과일의 가공과정 중에 펙틴질은 착즙율을 저하시킬 뿐만 아니라 과즙 속에서 단백질과 중합체를 형성하여 혼탁현상, 가열취 또는 짙은 착색의 원인이 되고 있다.¹⁾

이와 같은 펙틴질을 분해시켜 착즙 및 청정효과를 높여주기 위해 펙틴질분해효소들이 널리 이용되고 있으며 이들중 과일쥬스를 청정화 시키는데 이용되는 효소군은 주로 depolymerizing enzyme으로 1930년에 Kertesz등²⁾에 의해 소개된 이래 많은 연구가 이루어져 왔다.

한편 감귤류등의 가공에 있어서는 향기 및 색성분이 Cloud라 불리는 혼탁성분에 들어 있으므로 이를 안정화시켜 주기 위해 과즙내 펙틴질분해효소를 열불활성화 시키는 과정이 필요하며 이들 효소의 열안정성에 대한 연구가 요청된다. Archer 등³⁾은 *Sclerotinia fructigena*가 생산하는 열에 매우 안정한 endopolygalac-

turonase (endo-PG)를 보고한바 있다. Endo-PG는 식물체로는 토마토, Avocado에 많이 함유되어 있고 효모로는 *Saccharomyces fragilis*가 분비하며 곰팡이의 경우 *Aspergillus*속, *Penicillium*속, *Rhizopus*속등 많은 종류의 균주들이 이 효소를 분비한다고 알려져 있다.⁴⁾

본 실험은 endo-PG를 강력히 생산하는 것으로 알려진 *Aspergillus niger* Sherumanni IAM 2059를 배양해서 얻은 펙틴질분해효소들을 Sephadex G-100과 DEAE-Sephadex A-50을 이용한 Column Chromatography로 endo-PG를 분리하고 기질특이성, 최적 pH, 열안정성등의 효소특성을 알아보았다.

재료 및 방법

효소의 생산

균주로는 서울대학교 식품공학과에서 보관하고 있는 *Aspergillus niger* sherumanni IAM 2059를 사용하였다.

효소의 생산은 20ml의 증류수에 Sucrose 2%, NaNO₃, 0.01%와 K₂HPO₄, 0.02%를 넣어 녹인 후 Pectin 2%를 가하고 Waring blender로 갈아 녹여 25g의 밀기울과 함께 삼각플라스크에 넣고 가압살균한 다음 상기 균을 접종하고 32°C에서 3일간 배양하였다.

효소역가 측정방법

가. 기질용액의 제조

0.03M Acetate buffer (pH 4.1)에 0.06M NaCl과 0.45% Na-pectate를 넣고 70°C에서 40분간 교반시키며 녹인 후 효소반응온도인 30°C로 냉각시켜 사용하였다.

나. 점도감소의 측정

Ostwald 점도계로 측정하고 RobozTM에 의한 방법을 적용하여 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{점도감소율 } A = \frac{V_o - V_t}{V_o - V_s} \times 100$$

V_o: 효소, 열, pH등의 처리를 받지 않은 용액의 소요시간(초)

V_t: 처리받은 용액의 소요시간(초)

V_s: 용액의 소요시간(초)

다. 환원당의 측정방법

효소액 0.4ml에 기질 5ml를 가하여 30°C에서 20분간 반응시킨 후 0.9ml의 2N-HCl로 반응을 중지시킨 다음 2,500×g로 8분간 원심분리시켜 상등액을 얻었다. 상등액 0.5ml에 증류수 0.5ml를 가한 다음 0.1N-NaOH 1ml를 가해 중화시키고 구리용액 1ml를 넣고 100°C에서 20분간 반응시켰다. 반응액을 실온으로 식힌 후 Nelson시약TM 1ml를 넣어 발색시킨 다음 증류수로 적당히 희석하여 520nm에서의 흡광도를 측정하였다. 효소역가 단위는 30°C에서 20분간 반응하여 흡광도값을 1만큼 증가시키는 양으로 정하였는데 이때 1이라는 값은 galacturonic acid 0.28μmol에 상당하였다.

라. 단백질의 측정

단백질 측정은 Double beam spectrophotometer UV-200 (Schimazu社)으로 280, 260nm에서의 흡광도를 각각 측정하고 다음과 같은 식¹⁸⁾에 의하여 계산하였다.

$$\text{단백질 (mg/ml)} = 1.45 \cdot A_{280} - 0.74 \cdot A_{260}$$

A: absorbance

효소의 추출 및 정제

가. 추출 및 (NH₄)₂SO₄ 염석

3일간 배양한 밀기울 배양체에 0.05M 인산완충용액 (pH6.5)을 가하고 5시간동안 침출시킨 다음 무명

천으로 착즙하여 조효소액을 얻고 이에 (NH₄)₂SO₄를 가해서 60%~95% 포화용액에 침전되는 단백질을 분획 채취하였다. 이때 pH는 5.6으로 조정하였다.

나. Sephadex G-100 Chromatography

0.05M 인산완충용액 (pH6.5)에 대하여 부석하여 얻은 효소액을 0.05M 인산완충용액 (pH6.5)으로 미리 평형시켜 놓은 Sephadex G-100 column (3×85cm)에 유속 20ml/h로 통과시켰다.

다. DEAE-Sephadex A-50 Chromatography

Sephadex G-100 Chromatography로 얻은 효소액을 0.05M 인산완충용액 (pH6.5)으로 미리 평형시켜 놓은 DEAE-Sephadex A-50 column (3×20cm)에 가한 후 NaCl용액 농도를 0~0.8M까지 일정하게 증가하게 (linear gradient elution) 걸어 주었고 이 때의 유속은 20 ml/h였다.

효소액의 열불활성화

효소액의 열처리하는 시험관에 4ml의 인산완충용액 (pH 6.5)을 넣고 열처리하고자 하는 온도까지 도달하게 한 후 자석식 교반기로 격렬히 교반하면서 1ml의 효소액을 가하고 일정 시간 후에 피펫으로 0.5ml를 취하여 미리 얼음으로 냉각시켜 놓은 인산완충용액 (pH6.5) 0.5ml에 가하여 냉각시켰다.

결과 및 고찰

효소의 정제

Fig. 1에서와 같이 (NH₄)₂SO₄ 60~95% 포화용액 분획채취물을 Sephadex G-100 column에 통과시켜 2

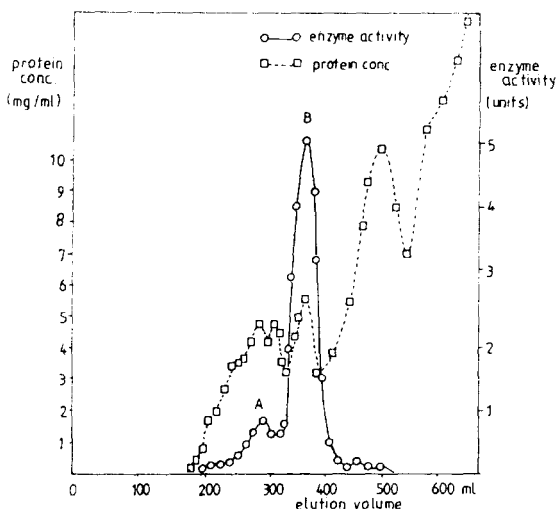


Fig. 1. Chromatography of *Aspergillus niger* PG on Sephadex G-100

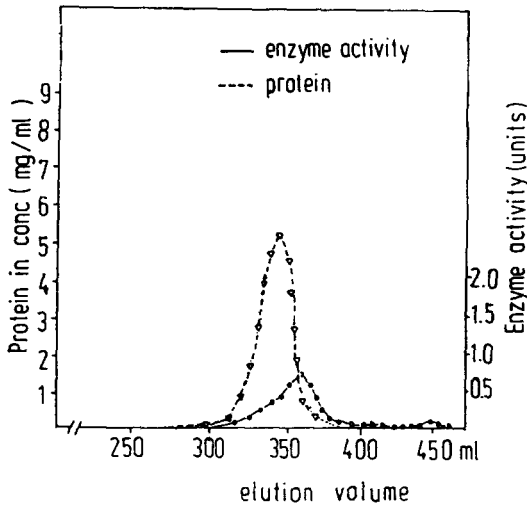


Fig. 2. Rechromatography of *Aspergillus niger* PG (fraction A) on Sephadex G-100

개의 Polygalacturonase 역가로 추정되는 fraction (A 및 B)을 얻었다. Fraction A를 다시 동일한 Sephadex G-100 column에 rechromatography 시킨 결과는 Fig. 2와 같다.

Fraction B는 다시 DEAE-Sephadex A-50 column에 통과시켜 2개의 역가 Peak를 얻었다 (Fig. 3).

이중 먼저 0.2M NaCl 근방에서 나타난 것을 fraction I, 0.5M 근방에서 나타난 것을 fraction II라 하였다.

기질 분해 특성

Fig. 4는 fraction A, I 및 II의 효소반응에 의한 Na-pectate 용액의 점도감소를 나타낸 것이다.

반응초기에 fraction I, II는 급격한 점도감소를 보

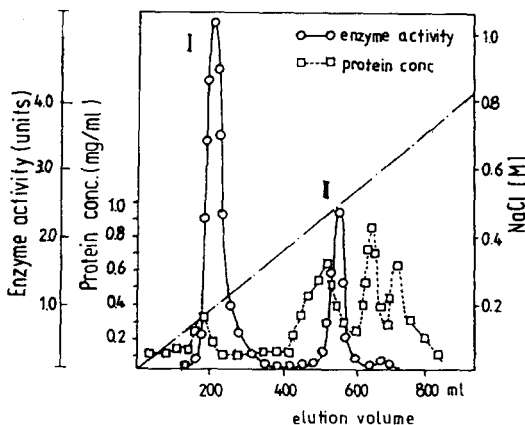


Fig. 3. Chromatography of *Aspergillus niger* PG (fraction B) on DEAE-Sephadex A-50

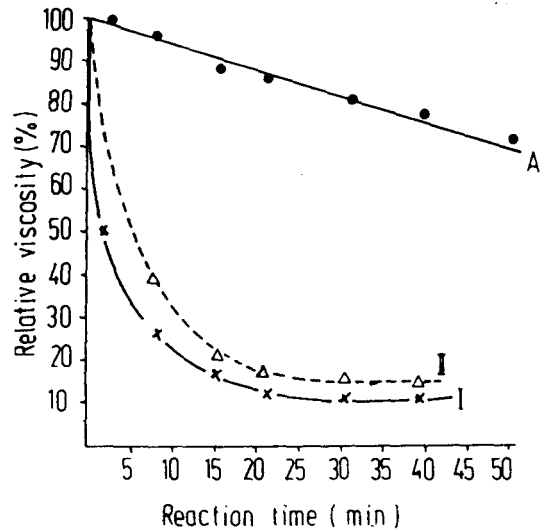


Fig. 4. Changes in the viscosity of sodium pectate solution during hydrolysis by PGs from *Aspergillus niger*

이고 fraction A는 완만한 기울기의 직선적인 점도감소를 보이고 있으므로 fraction I, II는 endo형으로, fraction A는 exo형의 효소로 보인다.

Na-pectate를 기질로 하여 이들 효소의 시간별 반응 생성물을 박층크로마토그래피를 한 결과는 Fig. 5와 같다.

Fraction A는 반응초기인 240분 경과 후 monomer, dimer 만을 보이고 반응이 진행됨에 따라 trimer, tetramer 등이 생성되어 exo형임을 나타내고 있고 이는 점도감소현상에서 관찰할 사실과 잘 일치된다. Fraction I 및 II의 경우, 반응초기에는 monomer, dimer 들이 거의 보이지 않고 반응이 진행될수록 Oligomer들이 줄어들면서 dimer, trimer가 많이 생성되므로 fraction I 및 II는 endo형 효소임을 알 수 있었다. 이는 점도감소현상에서 얻은 결과와 잘 일치하고 있다.

Endo형 효소인 fraction I과 II를 Na-pectate와 pectin을 기질로 하여 점도감소 실험한 결과는 Fig. 6의 a 및 b와 같다. Fig. 6-a에서 pectin보다 Na-pectate가 더 빨리 분해됨을 볼 수 있다. 따라서 fraction I은 pectic acid를 기질로 삼고 있는 endo-polygalacturonase 일것으로 추정할 수 있다. Pectin도 분해를 받았는데 이는 pectin중의 methyl화 되지 않은 부분에 작용하였다고 보겠다. Fraction II는 Na-pectate 보다 pectin을 더 잘 분해했는데 이로 보아 fraction II는 endo-polymethylgalacturonase의 특성을 보여 준다고 할 수 있다. 또한 기질과 효소를 반응시키고 난 후에 반응액의 흡광도를 235nm에서 측정하였으나 변화가 없

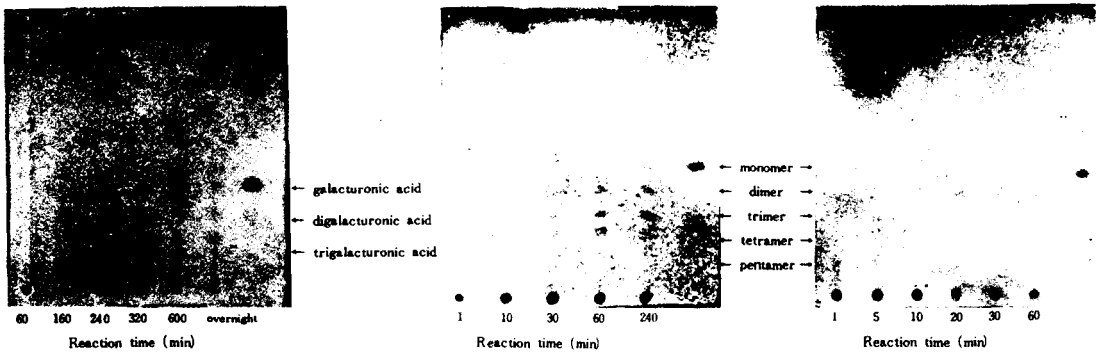


Fig. 5. Thin layer chromatogram of pectic acid hydrolyzates by PGs
 Layer : silica gel G Solvent : butanol-acetic acid-water (5 : 2 : 3)
 Visualization : 50% H₂SO₄

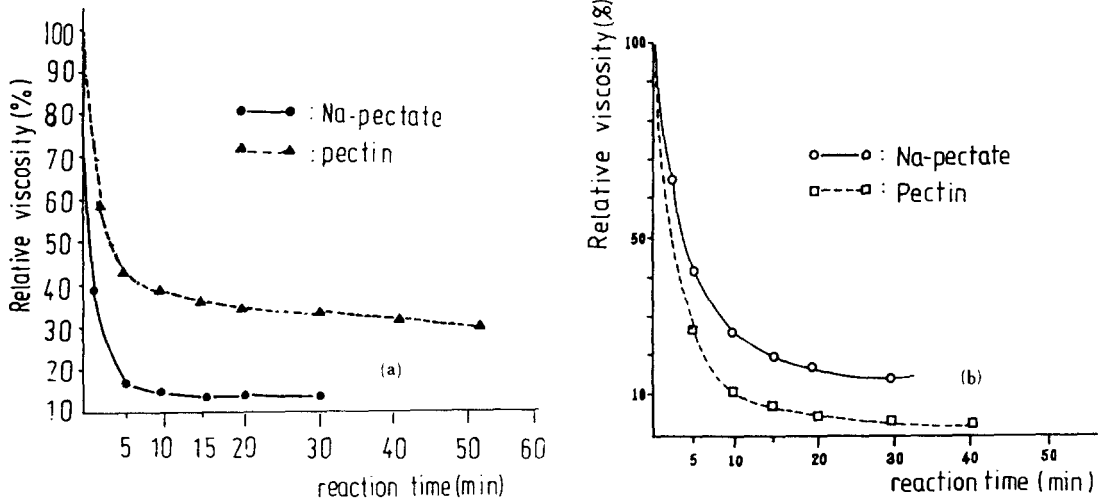


Fig. 6. Changes in the viscosity of pectic acid and pectin solution during^x hydrolysis by PGs from *Aspergillus niger*
 a. fraction I b. fraction II

었으므로 lyase가 아님을 알 수 있었다.

Endo-PG (fraction I)의 특성

가. 반응 최적 pH

Endo-PG를 pH를 달리한 Na-pectate용액에 가하고 환원당 생성과 점도감소의 방법으로 효소 역가를 측정하였다.

Fig. 7에서와 같이 환원당 생성 최적 pH는 4.2, 한편 점도감소로 본 최적 pH는 4.7이었다. 이는 pH가 endo-pG의 기질 분해작용의 특성인 "임의성"(randomness)에 영향을 줄을 암시하는 것이라 하겠다.

나. 열불활성화

Endo-PG인 fraction I을 열처리온도 30~40°C 사이에서 열처리하고 잔류역가를 측정하여 열처리 시간

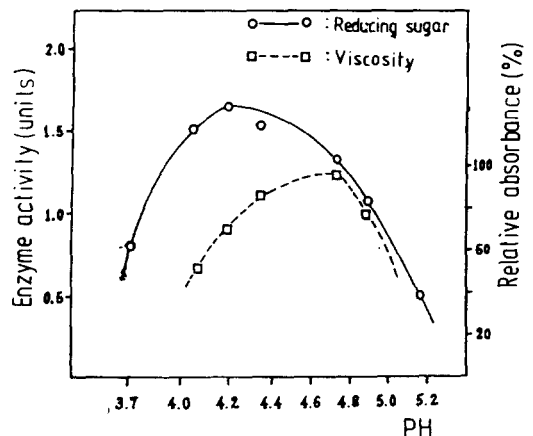


Fig. 7. Effect of pH on activity of *Aspergillus niger* PG (fraction I)

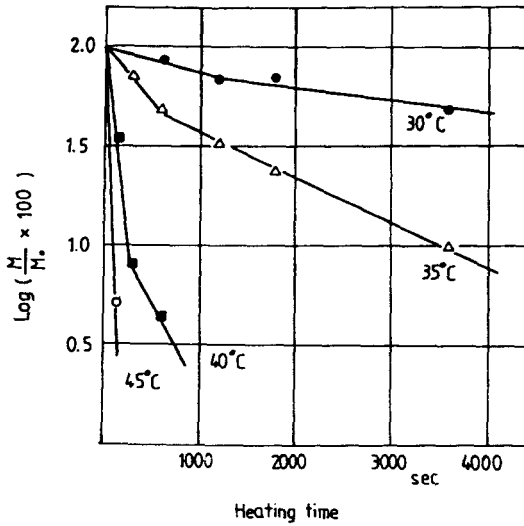


Fig. 8. Thermal inactivation of *Aspergillus niger* PG (fraction I) with respect to heating time and temperature
 M : enzyme activity at heating time t
 M₀ : enzyme activity at heating time zero

에 따라 표시한 열불활성 곡선은 Fig. 8에서 보는 바와 같다. 30°C부터 서서히 열불활성화가 시작되고 40°C부터는 급격한 열불활성화가 일어났다.

Fig. 8에서 초기의 직선구배로부터 구한 D-value를 기초로 하여 불활성화 속도상수 및 Z-value를 常法⁽⁹⁾에 따라 구한 값은 Table 1과 같다.

절대반응속도 이론에 의거한 열역학적인 값은 Eyring의 방법⁽¹⁰⁾에 의하여 산출하여 Table 2에 적었다.

이처럼 40°C에서부터 급격한 열불활성화가 일어남과 Z-value가 7.5°C라는 작은 값을 가짐은 이 효소가 매우 열에 불안정한 효소임을 말해 주며 柳⁽¹¹⁾ 등이 보고한 *Aspergillus*속의 endo-PG와 비슷한 열안정성을 보이나 Yamasaki⁽¹⁾ Luh⁽¹²⁾가 보고한 endo-PG보다는 낮

Table 1. First order reaction rate constant and D-value for inactivation of endo-PG

Heating temperature (°C)	D-value (sec)	Reaction rate constant, k (sec ⁻¹ · 10 ⁵)
30	7840	29.38
35	1800	127.94
40	240	959.58
45	100	2303.00

Z-value 7.5°C
 E_a 254.96 kJ/mole

Table 2. Thermodynamic quantities for inactivation of endo-PG

Temperature (°C)	ΔH* (kJ/mole)	ΔG* (kJ/mole)	ΔS* (J/mole · K)
40	217.3	89.2	409.2

았다. Archer⁽³⁾ 등은 *Sclerotinia fructigena*의 어느 endo-PG는 40~50°C의 중간 온도보다는 오히려 90°C 이상의 높은 온도에서 더 높은 열안정성을 보였다는 보고를 했으나 본 효소는 그런 현상은 보이지 않았다.

요 약

Aspergillus niger sherumanni IAM 2059가 분비하는 펙틴분해효소 중에서 endo-polygalacturonase를 Sephadex G-100, DEAE-Sephadex A-50을 이용하여 분리하고 점도감소와 분해산물분석을 통해 효소의 특성을 조사하였다. Chromatography를 통해 얻은 3개의 역가 fraction (F-A, F-I 및 F-II)은 각각 exo형 효소, endo-polygalacturonase, endo-polymethylgalacturonase 이었다.

Endo-polygalacturonase의 역가 최적 pH는 환원당 생성으로는 pH 4.2 근방이었고 점도감소로는 pH 4.7 근방이었다. 이 효소의 Z-value는 7.5°C이고 D_{40°C}는 240 sec이며 40°C에서 활성화엔탈피 (Enthalpy of activation) 217.3KJ/mol, 활성화엔트로피 (Entropy of activation) 409.2J/mol.K, 활성화자유에너지 (Free energy of activation) 89.2KJ/mol 이었다.

문 헌

1. Yamasaki, M., Yasui, T. and Arima, K.: *Agr. Biol. Chem.* 28, 779 (1964)
2. N. Y. State Agr. Exp. Sta., Geneva: Tech. Bull. No. 589 (1930)
3. Archer, S. A. and Fielding, A. H.: *J. Food Sci.* 40, 423 (1975)
4. Rombouts, F. M. and Pilnik, W.: In "Critical Reviews in Food Technology" Vol. 3, p. 1-26 Chem. Rubber Pub. Co., Cleveland (1972)
5. Roboz, E., Barratt, R. W. and Tatum, E. L.: *J. Biol. Chem.* 195, 459 (1952)
6. Liu, Y. K. and Luh, B. S.: *J. Food Sci.* 43, 721 (1978)
7. Nelson, N.: *J. Biol. Chem.* 153, 375 (1944)

8. Kalckar, H. M. : *J. Biol. Chem.* **169**, 461 (1947)
 9. 노봉수, 박관화 : 한국식품과학회지 **12**, 209 (1980)
 10. Joffe, F. M. and Ball, C. O. : *J. Food Sci.* **27**, 587 (1962)
 11. 유주현 : 한국 응용미생물학회지, **4**, 57 (1976)
 12. Liu, Y. K. and Luh, B. S. : *J. Food Sci.* **45**, 601 (1980)
-
- (1983년 10월 11일 접수)