

Aspergillus niger 균주가 생산하는 내산성 아밀라제의 특성

조 명 환

건국대학교 공과대학 미생물공학과

Purification and Characterization of Acid-stable α -Amylase of *Aspergillus niger* K-25

Myung-Hwan Cho

Department of Microbiological Engineering, College of Engineering, Kon Kuk University
Seoul 133-701, Korea

ABSTRACT: An acid-stable α -amylase produced by *Aspergillus niger* K-25 strain was purified by fractional precipitation with ammonium sulfate, ethacridine and acetone. The final preparation was homogeneous in cellulose acetate electrophoresis. The enzyme retained 91% of its original activity at pH 3.0, 8.7% at pH 2.4. The optimum pH of the enzyme was around pH 4. The purified-enzyme with optimum temperature of 40°C was more heat-stable than the commercial product. The enzyme retained 80% of its original activity when heated to 60°C for 30 minutes while the commercial amylase lost its activity completely within 30 minutes at 50°C.

KEYWORDS: *Aspergillus niger*, acid-stable α -amylase

사상균으로부터 두 종류의 아밀라제가 생산된다. 즉, 전분의 옥도반응을 일으키는 α -아밀라제와 전분의 비환원 말단으로부터 포도당의 단위로 분해하고, 전분의 옥도반응이 전분의 80%가 분해될 때까지 전분의 옥도반응이 일어나지 않는 β -아밀라제가 생산된다(Cochrane, 1958; Guilbault, 1976). 이러한 효소는 *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Bacillus* species 중에서 생산되어 공업에 이용되어 왔으며, 또한 취장, 식물종자, 엿기름, 타액에서도 생산되어 왔고, 일반적으로 낮은 산성 pH와 높은 온도에서 불안정하여, 활성이 크게 약해지는 것으로 보고되었다(Minoda 등, 1968; Bergmeyer, 1974). 따라서 아밀라제를 생산하는 효소 공업에서 내산성 소화기관과 같은 산성조건에서도 안정한 내산성 아밀라제 생산의 필요성이 강조되어 왔으며, Minoda 등(1968)에 의해 이 효소에 대하여 연구 보고된 바 있다.

이러한 내산성의 아밀라제를 분리하여 특성을 연구하는 것은 산업적으로 이용가치가 높다. 본인

은 이미 내산성 α -아밀라제를 생산하는 *Aspergillus niger* 을 분리하여 일부 특성을 조사 보고했다(조, 1989). 본 연구에서는 이 내산성 아밀라제를 순수정제하여 이 효소의 특성을 연구한 것을 보고한다.

材料 및 方法

사용 균주

토양에서 분리한 *Aspergillus niger* K-25을 사용했다. 상기 균주는 nutrient agar 배지와 sporulation 배지에서 배양을 했다(조, 1989).

내산성 alpha-amylase의 정제

1. 조(粗)효소액의 조제

밀기울 50g을 fumarate 완충용액(pH 3) 50 ml에 혼합한 후 120°C에서 30분간을 증기압 멸균을 한 다음에 균을 접종하여 30°C에서 5일간 배양하고, 배양액에 증류수를 1:4(w/v)의 비율로 혼

합하여 마쇄한 후 여과하고, 그 여과액에 활성탄(1%)을 첨가하여 30분간 교반(300 rpm)한 후에 여과지(Whatman No. 2)로 여과한 액을 조효소액으로 사용했다.

1) 酸 처리와 황산암모늄 처리 분획

조효소액을 2 N HCl로 pH 2.5로 조정하고, 37°C에서 30분간 열처리하여, 비내산성 α -아밀라제를 불활성시킨 다음에 2 N NaOH와 acetate 완충액으로 pH 4.8로 조정하였다. 그리고, 2 M calcium acetate를 첨가(18%)하여, 약 1시간 동안 방치한 다음 infusorial earth가 첨가된 여과기로 여과하여 ammonium sulfate로 40%되게 포화시켰다. 50°C에서 10시간을 방치한 후 원심분리하여 상등액을 분리한 다음 그것을 ammonium sulfate로 80%되게 포화시켜 5°C에서 10시간을 다시 방치한 다음에 원심분리하였다. 원심분리하여 얻은 침전물은 증류수에 용해시켜 흐르는 물에서 2시간, 증류수로 1시간을 투석시켰다. 투석액을 다시 pH 2, pH 2.5로 처리하고, 37°C에서 30분간을 열처리시킨 후 다시 pH 4.8로 조정하여 ammonium sulfate로 30%되게 포화시켰다. 5°C에서 10시간 방치 후 원심분리하여 얻은 침전물은 제거한 후에 상등액을 70%되게 포화시켜 5°C에서 30분간 방치한 다음에 다시 원심분리하여 얻은 침전물을 증류수로 용해하여 흐르는 물에서 2일, 증류수로 1일 투석시켜 정제 효소액을 준비했다(Scopes, 1987).

2) Ethacridine 분획

투석효소액에 1% ethacridine 용액을 12%가 되도록 첨가하고, 0°C에서 원심분리하여, 침전물을 제거하고, 상등액에 1% ethacridine 용액을 15% 되도록 첨가한 다음에 원심분리하였다. 침전물을 모으고 2 N acetate 완충액(pH 5.5)에 용해한 후에 Fuller earth를 전용액의 20%가 되도록 교반하면서 가하여 30분간 방치한 다음 여과하여 투명한 효소용액을 얻었다.

3) Acetone 분획

효소용액을 2°C로 하여 냉 acetone(50 vol.%)을 첨가하고, 침전물을 원심분리하여 제거했다. 상등액에 냉 acetone을 60%까지 첨가하여 원심분리하여 침전물을 얻은 후 0.2 M calcium acetate 용액에 용해시켜 정제된 효소용액을 얻었다.

단백질 정량

Spectrophotometer(Hitachi 200-20)를 사용하여 280 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 동시에 bovine serum albumin을 표준물질로 사용했고, Lowry 방법(1951)으로 측정했다.

전기영동

단백질의 균일성을 조사하기 위하여 cellulose acetate를 이용하여 전기영동을 실시했다. 즉, cellulose acetate strip에 정제된 효소용액을 약 0.01 ml를 떨어뜨리고, barbital 완충용액(pH 8.6)에서 180 Volt, 7 mA로 15분간 전기영동을 하고, 6% TCA 용액과 0.8% ponceau-S 혼합용액을 발색시약으로 사용했고, 1% acetate로 탈색시킨 후, acetate-methanol 혼합용액을 세척 용액으로 사용했다. 대조군으로 혈청단백질(분자량 5,600달톤)을 동일한 조건으로 전기영동을 하였다(Andrew, 1988).

효소활성에 미치는 pH 영향

본 효소의 최적 pH를 조사하기 위하여 pH 1.0에서 11까지 pH 0.5 간격으로 조사했다. 사용된 완충용액은 Clark & Lub 완충용액(pH 1.0-2.2)와 Mallvaine 완충용액(pH 2.2-7.8)과 Clard & Lub 완충용액(pH 8.0-8.8), 그리고 Sørensen glycine I 완충용액(pH 9.0-13)을 사용하였다(Colowick와 Kaplan, 1955).

효소활성에 미치는 온도의 영향

0.1 M acetate 완충용액(pH 5)에 효소용액을 첨가하여 각 온도에서 10분간씩 반응을 시켜 활성을 조사했다.

結果 및 考察

α -아밀라제 단백질의 정제와 특성

조(粗) 효소용액의 비활성도는 7.3이었으나, 정제가 되어 가면서 순수도가 증가하여 마지막 단계에서는 비활성도는 436.9로 조효소용액 보다 60배의 활성을 나타냈다(Table I).

순수 분리한 효소용액을 cellulose 젤에서 전기영동을 한 결과는 단지 한 개의 밴드만이 나타났으며, 분자량은 표준 단백질과 비교하여 약 58,000 달톤으로 측정되었다. 이것은 다른 α -아밀라제의 분자량과 유사한 것이다. 젤을 densitometer로

Table I. Purification of the acid-stable α -amylase produced by *Aspergillus niger* K-25.

Steps*	Volume (ml)	Total protein (mg)	unit/ml	Total activity (units)	Specific activating (units/mg)	Recovery (%)	Fold
A	3,500	9,124	19	66,500	7.3	100	1
B	3,120	4,730	17	53,040	11.2	79.8	1.4
C	410	287	94	38,540	134.3	58.0	17.2
D	185	130	139	25,715	197.8	38.7	25.4
E	110	81	167	18,370	226.8	27.6	29.1
F	24	21	295	7,080	337.1	10.6	43.2
G	12	16	529	6,630	393.8	9.5	50.5
H	8	13	710	5,680	436.9	8.5	56.0

*A: Crude preparation. B: Acid treatment. C: Ammonium sulfate fractionation. D: Dialysis. E: Ethacridine fractionation. F: Filtration. G: Acetone fractionation. H: Purified enzyme solution.

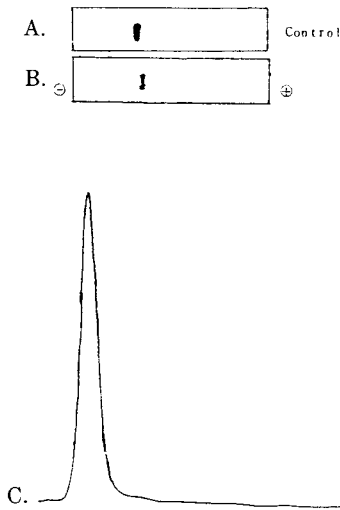


Fig. 1. Cellulose acetate electrophoresis of a 56 K-Da serum protein (A) and purified acid-stable α -amylase of *A. niger* K-25 (B). Note the appearances of the enzyme on gel (B), and densitometer (C) showing the enzyme is purified.

측정한 결과도 단지 한개의 곡선만이 나타났다 (Fig. 1). 이것은 정제가 순수하게 잘 되었다는 증거이기도 하다.

분리한 효소의 pH에 대한 안정성을 조사한 결과는 Fig. 2에 제시됐다. 안정된 활성을 나타내는 pH는 3-6 사이였으며, 시판 α -amylase (Sigma Co)는 pH 3.0에서 활성을 잃은 반면에 본 실험에

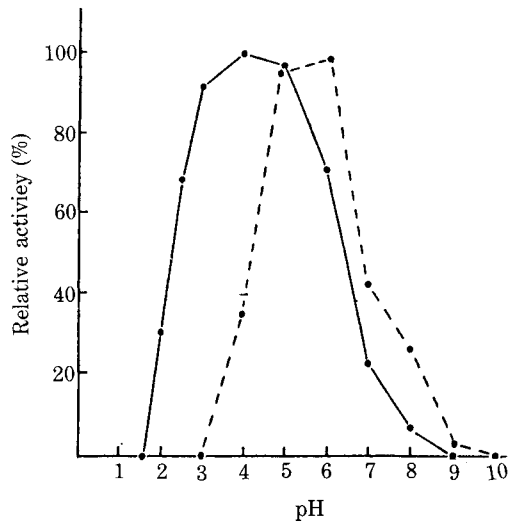


Fig. 2. Effect of pH on the activity of acid-stable α -amylase of *A-niger* K-25. (—●—, acid-stable α -amylase; - -● - -, commercial α -amylase)

서 분리한 효소는 본래 활성의 90% 이상의 활성을 보였으며, pH 2.5에서 70%를 나타냈다. 그리고 알칼리 pH에서는 불안정했다 (Fig. 2). 시중의 판매효소는 활성이 pH 5-7 사이에서 활성이 높게 나타났으며, 역시 알칼리 pH에서 활성이 소실되는 현상을 나타냈다. 분리효소의 최적 pH는 4로 나타났다.

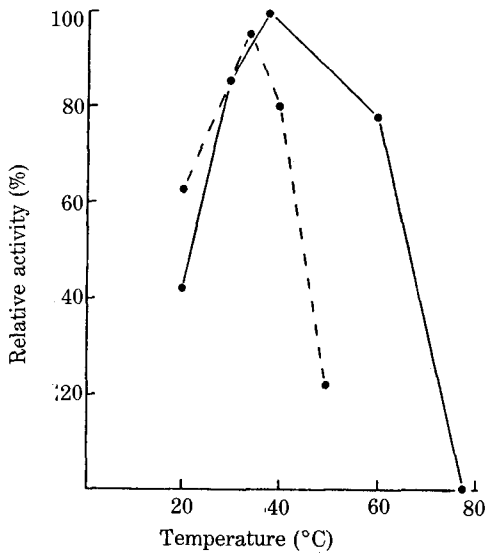


Fig. 3. Effect of temperature on the acid-stable α -amylase of *A. niger* K-25. (—●—, acid-stable α -amylase; - -●- -, commercial α -amylase)

온도가 효소활성에 미치는 영향은 Fig. 3에 제시됐다. 분리된 효소는 전반적으로 30°C에서 60°C까지는 활성이 높았다. 60°C에서는 활성이 약 80% 정도 유지되었다. 반면에 시판되는 아밀라제는 30°C에서 40°C 사이에서 활성이 높았고, 약 50°C에서부터는 완전히 활성이 소실되었다. 분리된 효소의 최적 활성온도는 40°C였으며, 시판 아밀라제의 최적 온도는 약 35°C로 나타났다.

摘 要

Aspergillus niger K-25가 생산하는 내산성 α -amylase를 정제하여 특성을 조사하였다. 분자량은 전기영동상에서 약 58,000달톤으로 나타났

고, 최적 pH는 4였고, pH 3에서 활성을 잃어 버리는 시판효소와 달리 본 효소는 91%의 활성을 유지했다. 최적 온도는 40°C였으며, 60°C에서도 80%의 활성을 유지하여 열에 대한 안정성도 높은 것으로 나타났다.

參考文獻

- Andrew, A.T. (1988): Electrophoresis. 2nd Ed. Oxford scientific Publication, pp.353-358.
- Cho, M.H. (1989): Isolation of *Aspergillus niger* K-25 producing acid-stable α -amylase. *Kor. J. Mycol.*, 17(3):
- Cochrane, V.W. (1958): Physiology of fungi. John Willey & Sons, Inc., pp.300-317.
- Colowick, S.R. and N.O. Kaplan. (1955): Methods in Enzymology. Vol 1. pp.141-143.
- Guilbault, G.G. (1976): Handbook of Enzymatic Methods of Analysis. Marcel Dekker, Inc., 72-76.
- Minoda, Y., T. Koyano, M. Arai and K. Yamada. (1968): Acid-stable α -amylase of black *Aspergilli*. Part II. Some general properties. *Agr. Biol. Chem.* 32(1): 104-109.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 153: 265-275.
- Minoda, Y., M. Arai, Y. Torigoe and K. Yamada. (1968): Acid-stable α -amylase of black *Aspergilli*. Part III. Separation of acid-stable α -amylase and acid-unstable α -amylase from the same mold amylase preparation. *Agr. Biol. Chem.* 27: 806-901.
- Scopes, R.K. (1987): Protein purification. Springer-Verlag, p41-54.

Accepted for Publication 6 September 1989.