

Penicillium sp. CB-20 이 생성하는 Polygalacturonase 의 특성 및 작용양상

조영제 · 안봉전¹ · 임성일 · 이우제 · 최 청*

영남대학교 농축산대학 식품가공학과 ¹롯데중앙연구소 생명공학부

Characteristics and Action Pattern of Polygalacturonase from *Penicillium* sp. CB-20

Cho, Young-Je, Bong-Jeon Ahn¹, Seong-Il Lim, Woo-Je Lee and Cheong Choi*

Department of Food Science & Technology, College of Agriculture and Animal Science,
Yeung Nam University, Gyeongsan, Kyung pook 713-800, Korea
¹Lotte group R & D Center, Seoul, Korea

Penicillium sp. CB-20 was selected for strong polygalacturonase activity among various strains of molds found in soil. The optimum pH for the enzyme activity was 5.0 and optimum temperature was 40°C. The enzyme was relatively stable in acidic condition and unstable by heat treatment. The activation energy, Km and V_{max} for the polygalacturonase were 2.499 Kcal/mol, 2.13×10^{-2} mol/L, and 104.17 μmol/min. The activity of polygalacturonase was inhibited by Ag⁺, Cu⁺⁺, Pb⁺⁺, Fe⁺⁺⁺, Ca⁺⁺, Na⁺, Mn⁺⁺. The enzyme can be inactivated by the treatment ethylenediaminetetra acetic acid, 2,4-dinitrophenol and H₂O₂. The results indicate the possible involvement of histidine, chelate and terminal amino group as active site. The enzyme was endo-type polygalacturonase.

펙틴질은 과즙의 제조 및 포도주 등에서와 같이 과일의 가공과정 중에 착즙물을 저하시킬 뿐만 아니라 과즙속에서 단백질과 중합체를 형성하여 혼탁현상, 가열취 또는 짙은 착색의 원인이 되므로 이러한 펙틴질을 분해시키기 위한 목적으로 펙틴 분해효소들이 이용되어 왔으며 이에 대한 연구는 이미 산업화에 이르기까지 진행되고 있다(1-4). 펙틴질 분해효소는 Demain과 Phaff(5)에 제안에 따라 polygalacturonase와 polymethylgalacturonase로 구분된 이후 많은 연구자에 의해 연구되어 왔으며(6,7) 이들 pectic enzyme 중 과즙의 청정화에 깊은 관련이 있다고 보고되어진 polygalacturonase는 *Aspergillus* 속, *Penicillium* 속, *Monilia* 속, *Rhizopus* 속, *Byssoschlamys* 속 등의 곰팡이와 몇몇 박테리아와 효모에 의해 생성되는 것으로 알려져 있고 Basham과 Bateman(8), Beuchat와 Rice(9), Harris와 Dennis(10), Tanaka와 Nonaka(11) 등은 대부분의 식물병원균이 polygalacturonase를 생성하는 것으로

보고하였으며, 이러한 pectic enzyme들이 식물의 생리적 변화에 다분히 관여한다고 Archer(12), Chesson(13), Hobson(14), Grierson(15) 등이 보고하였다. 특히 Endo(16-18), Rexova-Benkova(19-21) 등은 polygalacturonase의 청정화 기작과 효소의 작용양상에 대하여 깊은 관심을 가지고 연구를 진행하였으나 아직 뚜렷하게 밝혀진 것은 많지 않은 실정이다.

본 연구에서는 토양에서 분리한 *Penicillium* sp. CB-20이 생성하는 polygalacturonase의 특성과 작용양상 및 과즙의 청정화능력 등을 살펴보기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

공시균주

공시균은 대구, 경북지방의 토양에서 분리한 75 균주 중에서 *Penicillium* sp. CB-20 균주를 동정하여

Key words: *Penicillium*, polygalacturonase

*Corresponding author

사용하였다.

배지 및 배양방법

균의 분리를 위한 배지는 전보(22)와 같이 Potatodextrose agar 와 Czapek-dox agar 를 사용하였으며 효소생산을 위하여 밀기울배지에 탄소원으로써 pectin 을 가한 배지를 사용하여 30°C에서 약 60 시간 배양하였다.

정제효소액의 조제

전보(22)에서 상술한 바와 같이 배양된 밀기울배지로부터 얻은 조효소액을 gel filtration 과 ion-exchange chromatography 를 이용하여 약 30 배 정제한 뒤 정제효소액으로 사용하였다.

단백질의 정량

효소의 단백질 정량은 Lowry 등(23)의 방법에 의하여 측정하였으며 단백질값은 bovine serum albumin 을 사용한 표준곡선에 의하여 환산하였다.

효소활성의 측정

Polygalacturonase 는 polygalacturonic acid 를 분해하여 환원기를 가진 oligomer 를 생성하므로 이 환원기의 증가량을 측정하여 polygalacturonase 의 역가를 측정하였다. 환원기의 정량은 Somogyi-Nelson 법(24)에 의하여 실시하였으며, 이 때 효소단위는 효소액 1 ml 가 1 분간에 1 μmol 의 환원기(α-D-galacturonate)를 생성하는 것을 1 unit 로 정하였다.

기질에 대한 작용양상

정제된 효소액 3 ml 를 1% polygalacturonic acid 용액 40 ml 에 가하여 40°C에서 반응시켰으며 반응중 채취한 시료는 3분간 수조에서 가열하여 효소를 불활성화시킨 뒤 0.5 μ milipore 로 여과하고 Hatana-ka 등(6, 25, 26)의 방법에 의해 종이 크로마토그래피로 작용양상을 확인하였다. 이 때 전개용매는 n-butanol : acetic acid : H₂O=5 : 2 : 3(v/v/v)를 사용하였으며, 전개 후 여지는 1 ml 의 포화 AgNO₃ 용액에 6 ml 의 증류수를 혼합하고 200 ml 의 아세톤을 가하여 희석한 용액에 넣은 후 건조하고, 10% NaOH-메탄올(1 : 5 v/v) 용액에 검은 반점이 생성될 때까지 방치한 다음 여지를 수세하고 0.5 M Na₂S₂O₃ 용액에 넣어 배경색을 제거하고 증류수로 세척한 후 건조하였다.

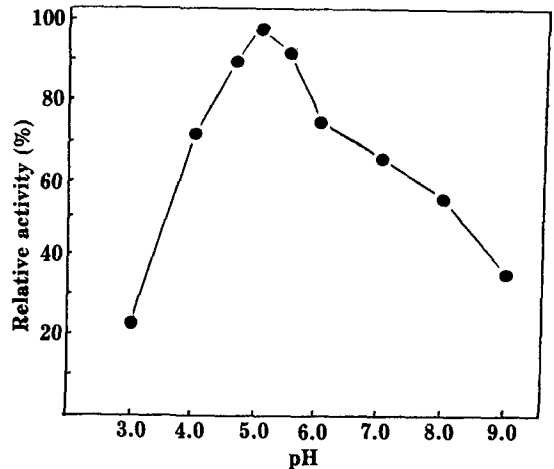


Fig. 1. Effect of pH on the enzyme activity.
acetate buffer (pH 3-5) phosphate buffer (pH 6-7)
tris buffer (pH 8-9)

과즙의 청징도 측정

시판 홍옥으로 만든 과즙(pH 4.1) 5 ml 에 0.5 ml 의 조효소를 첨가하여 혼합한 뒤 37°C 항온조에서 1 시간 반응시켜 끓는 물에서 5 분간 열처리하고 냉각하여 4000g 로 원심분리하였으며 그 상등액을 660 nm 에서 투과율을 측정하였다.

결과 및 고찰

효소의 특성

pH 에 의한 영향 : 정제효소에 대한 pH 의 영향을 조사하기 위하여 0.05 M acetate buffer (pH 3-5), phosphate buffer (pH 6-7), Tris buffer (pH 8-9) 용액을 사용하여 효소액을 30°C에서 1 시간 전처리한 후 효소활성을 측정한 결과 Fig.1 에서 나타난 바와 같이 효소의 최적 pH 가 5.0 이었으며, 이는 Barmore 등(27)이 *P. italicum* 의 polygalacturonase 최적 pH 가 5.0 이라고 보고한 결과와 일치하였다.

pH 안정성 : 효소의 pH 에 대한 안정성을 조사하기 위하여 McIlvaine buffer (pH 3-8) 용액으로 효소액을 4°C에서 17 시간 동안 작용시킨 뒤 최적 pH 인 5.0 으로 조절하고 잔존활성을 조사한 결과 Fig.2 와 같이 본 효소의 안정범위는 pH 4-6 까지로 비교적 안정한 편이었다. 이는 남 등(28)이 보고한 *B. fulva* 의 polygalacturonase 안정범위가 pH 3-6 까지라고 보고한 결과와도 유사하였으며, 이와 같이 효소의 pH 안정범위가 약산성이라는 것은 과실쥬스의 pH 가 약산성이라는 점을 감안하면 과실쥬스와 펄프의 가공과

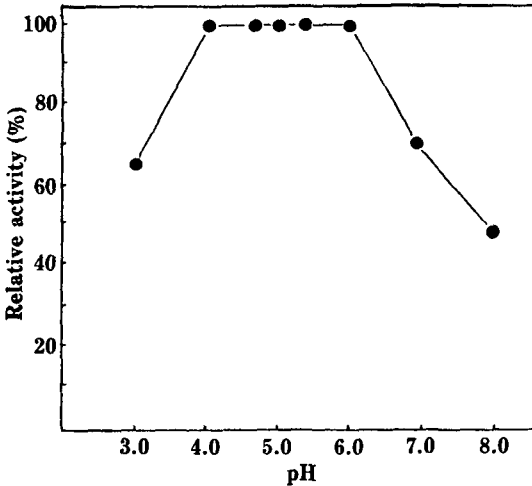


Fig. 2. Effect of pH on the enzyme stability McIlvaine buffer (pH 3-8).

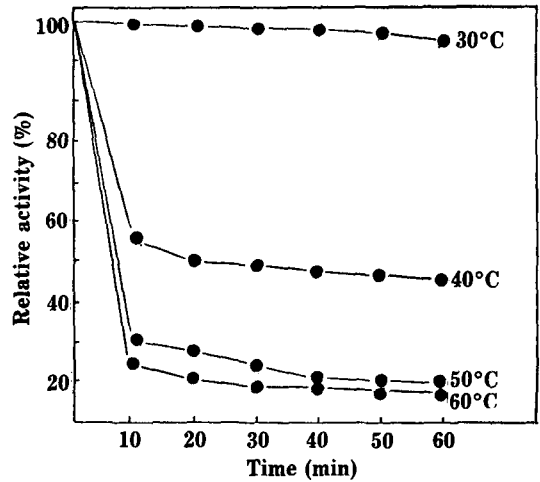


Fig. 4. Effect of temperature on the enzyme stability.

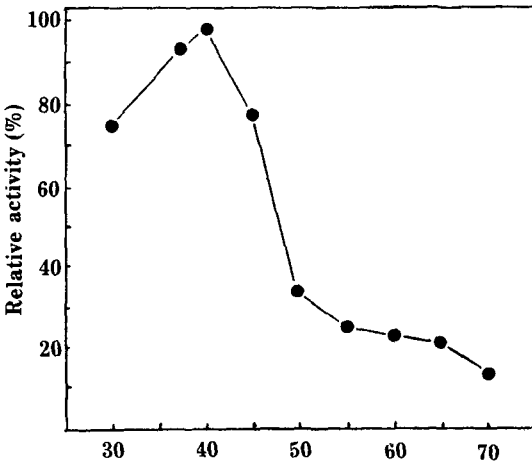


Fig. 3. Effect of temperature on the enzyme activity from *Penicillium* sp. CB-20.

Table 1. Effect of metal ions on polygalacturonase activity of *Penicillium* sp. CB-20.

Ion	Metal	Relative activity (%)
Mg ⁺⁺	MgSO ₄ ·7H ₂ O	146.43
Zn ⁺⁺	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	132.14
Ba ⁺⁺	BaCl ₂ ·2H ₂ O	115.36
Hg ⁺⁺	HgCl ₂	108.93
Ag ⁺	AgNO ₃	64.29
Cu ⁺⁺	CuSO ₄ ·5H ₂ O	63.93
Pb ⁺⁺	Pb (CH ₃ COO) ₂	63.21
Fe ⁺⁺⁺	FeCl ₃ ·6H ₂ O	52.86
Ca ⁺⁺	CaCO ₃	50.71
Na ⁺⁺	Na ₂ WO ₄ ·2H ₂ O	37.86
Mn ⁺⁺	MnSO ₄ ·H ₂ O	2.14
NONE		100.00

관련하여 산업적 이용에 유리하리라 판단되어졌다.

온도에 의한 영향: 본 효소의 활성에 미치는 온도의 영향을 알아보기 위하여 효소반응온도를 30~70°C까지 변화시키면서 활성을 측정 한 결과는 Fig.3과 같으며 40°C에서 반응시켰을 때 그 상대활성이 가장 높게 나타났다.

열안정성: 효소의 열안정성을 조사하기 위하여 30, 40, 50, 60°C에서 10~60분간 반응시키면서 효소의 불활성화되는 정도를 조사한 결과 Fig.4에서와 같이 30°C에서는 비교적 안정하였으나 40°C에서는 10분 반응 후부터 활성이 50% 가량 감소하였으며 50, 60°C에서 반응시켰을 때는 22, 17% 까지 감소하였

다. 이와 같은 결과로 볼 때 본 균주가 생성하는 polygalacturonase는 열에 매우 불안정하므로 고온이 필요한 공정에는 적당치 않은 것으로 판단되었다.

금속이온의 영향: 금속이온이 효소활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각종 금속이온들을 효소액과의 반응물의 최종 농도가 10⁻³M 되게 조절하여 30°C에서 1시간 동안 방치한 뒤 효소활성을 조사한 결과는 Table 1과 같다. 본 효소는 Mg⁺⁺, Zn⁺⁺, Ba⁺⁺, Hg⁺ 등에 의해서는 활성이 다소 촉진되며 Ag⁺, Cu⁺⁺, Pb⁺⁺, Fe⁺⁺, Ca⁺⁺ 등에 의해서는 65~50% 가량 저해되었고 Mn⁺⁺ 이온에 의해서는 거

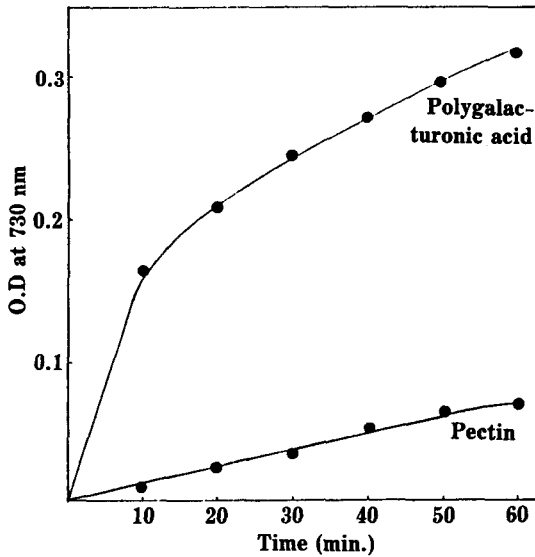


Fig. 5. Effect of decomposition on different substrate.

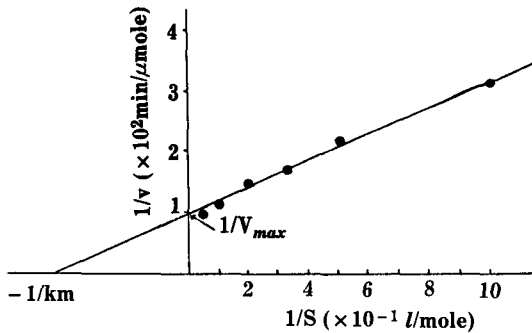


Fig. 6. Lineweaver-Burk plot for the hydrolysis of polygalacturonic acid by the purified polygalacturonase.

의 완전히 저해되었다. Preiss 등(29)은 Ca^{++} , Na^+ 등이 polygalacturonase의 활성을 증대시킨다고 보고하였으나 본 효소는 Na^+ , Ca^{++} 등에 의해 활성저해가 발생하였다.

기질특이성: 정제효소의 기질특이성을 조사하기 위하여 1% 농도의 pectin과 polygalacturonic acid를 기질로 사용하여 기질분해능력을 측정하였다. Fig.5에 나타난 바와 같이 polygalacturonase는 pectin보다 polygalacturonic acid를 특이적으로 분해하며 pectin도 다소 분해할 수는 있으나 polygalacturonic acid를 분해하는 정도와는 비교될 수 없었다.

효소반응 속도론: 본 효소의 기질에 대한 친화력을 조사하기 위하여 기질의 농도를 $2 \times 10^{-3} M \sim 2 \times$

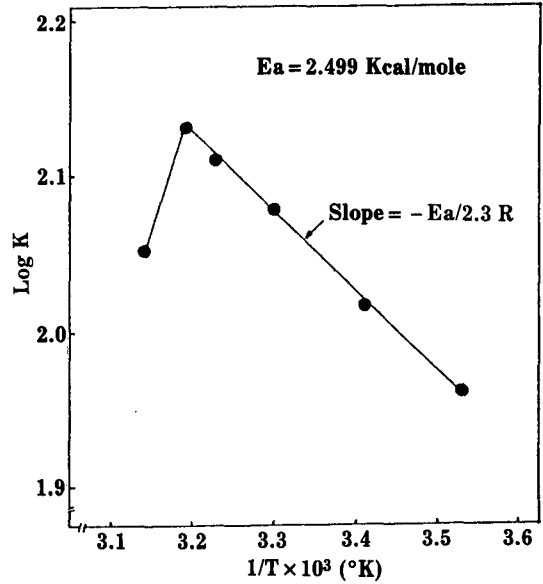


Fig. 7. Arrhenius plot of polygalacturonase reaction.

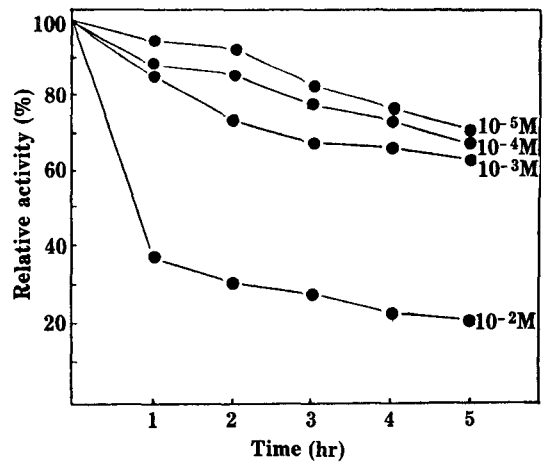


Fig. 8. Effect of ethylenediamine tetraacetic acid on the activity of polygalacturonase from *Penicillium* sp.CB-20.

$10^{-1} M$ 까지 변화시키면서 Lineweaver-Burk plot로 Michaelis-Menten 상수 (K_m)와 최대 반응속도 (V_{max})를 측정된 결과 Fig.6과 같이 본 효소의 K_m 치는 $2.13 \times 10^{-2} mol/l$ 였으며 V_{max} 는 $104.17 \mu mol/min$ 이었다. 이는 남 등(28)의 *B. fulva*가 생성하는 polygalacturonase보다 기질 친화력이 낮은 것으로 나타났다.

활성화에너지: 활성화에너지를 측정하기 위해 $10^\circ C$ 에서 $45^\circ C$ 의 범위에서 온도변화에 따른 효소활성을 Arrhenius 방정식에 의해 plot한 결과 Fig.7과

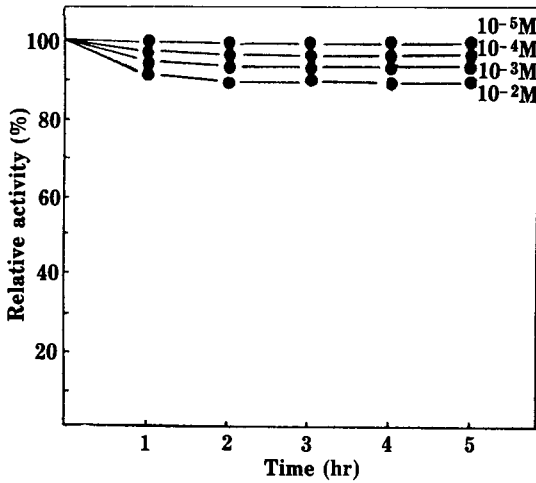


Fig. 9. Effect of *p*-chloromercuribenzoic acid on the activity of polygalacturonase from *Penicillium* sp.CB-20.

같이 활성화에너지는 2.499 Kcal/mol 이었다.

활성저해제의 영향 : 금속과 결합하여 Chelate를 형성하는 Ethylene diamine tetraacetate(EDTA)를 10⁻²~10⁻⁵ M의 농도로 반응시킨 결과 Fig.8과 같이 10⁻³~10⁻⁵ M 농도까지는 효소활성이 점차로 감소하였으나, 10⁻² M에서는 반응 1시간 이내에 약 40% 이하까지 활성이 감소되는 것으로 보아 본 효소의 활성단에 금속이온이 존재하는 것으로 판단되었다. 일반적으로 효소분자 중 SH기의 저해제로 쓰이는 *p*-chloromercuribenzoic acid(PCMB)를 반응시켜 잔류활성을 측정한 결과 Fig.9와 같이 각 농도에서 공히 효소활성저해는 거의 일어나지 않는 것으로 보아 cysteine의 SH기가 효소활성에 관여할 가능성이 거의 없는 것으로 간주되었다. 효소분자의 말단 아미노기와 친화력이 강하여 이 말단 아미노기가 효소 활성단인 경우, 효소활성을 저해하는 2,4-dinitrophenol(DNP)을 처리하여 본 결과 Fig.10과 같이 각 농도별로 처리시간이 지날수록 활성저해가 점점 커져가는 것으로 보아 반응시간이 5시간을 초과하면 저해는 더 일어날 것이라 판단되며 이러한 결과로 볼 때 본 효소분자의 말단 아미노기가 활성에 관여하는 것으로 생각된다. 효소의 활성단이 histidine의 imidazole 기인 경우 그 활성단을 저해하는 H₂O₂를 처리한 결과 각 처리 농도별 저해폭은 별차이가 없이 상대활성이 감소하고 있는데(Fig.11) 이같은 결과는 Westhead(30)와 Rexova-Benkova 등(19-21)이 fungal source의 polygalacturonase의 활성단에 histidine 잔기가 존재하며, histidine 잔기의 imidazole 기가 효소활성에 필수적이라고 보고한 결과와

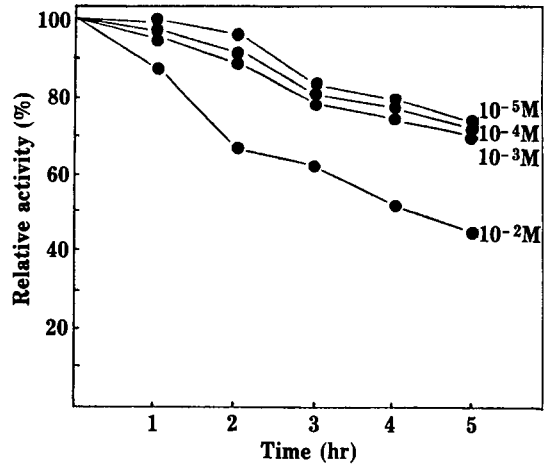


Fig. 10. Effect of 2,4-dinitrophenol on the activity of polygalacturonase from *Penicillium* sp.CB-20.

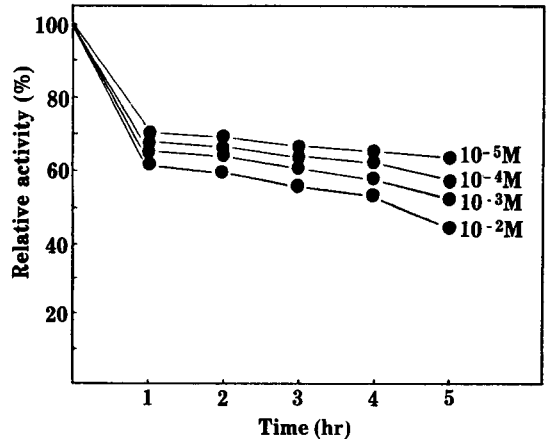


Fig. 11. Effect of hydrogen peroxide on the activity of polygalacturonase from *Penicillium* sp.CB-20.

비슷하였다. 화학적 저해제로 Tris를 처리하여 본 결과 10⁻⁴ M과 10⁻⁵ M 농도에서는 2시간 전처리했을 때까지 효소의 상대활성 저해가 눈에 띄지 않았으나 그 이후에는 전처리시간의 경과에 따른 점진적인 효소활성의 저해가 관찰되었으며, 이는 Lim 등(31)이 Tris에 의한 polygalacturonase 활성저해를 보고한 바와도 유사하였다(Fig.12).

기질에 대한 작용양상

정제효소의 기질에 대한 분해양상을 규명하고자 기질에 효소를 작용시킨 뒤 종이 크로마토그래피한 결과 Fig.13과 같이 15, 30분 경과시에 monomer, dimer, oligomer 등이 나타나고 120, 240분이 지나면서 monomer, dimer만이 생성되는 것으로 보아 분

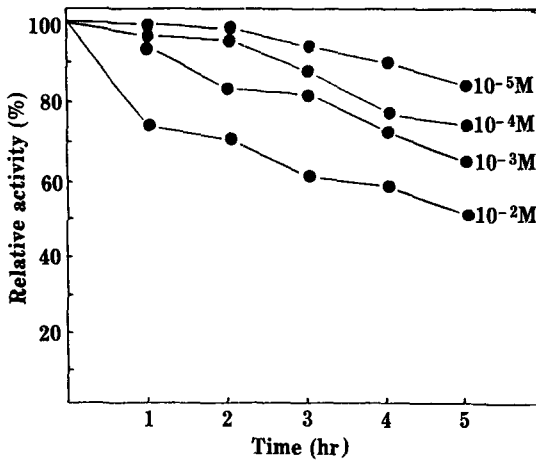


Fig. 12. Effect of tris on the activity of polygalacturonase from *Penicillium* sp. CB-20.

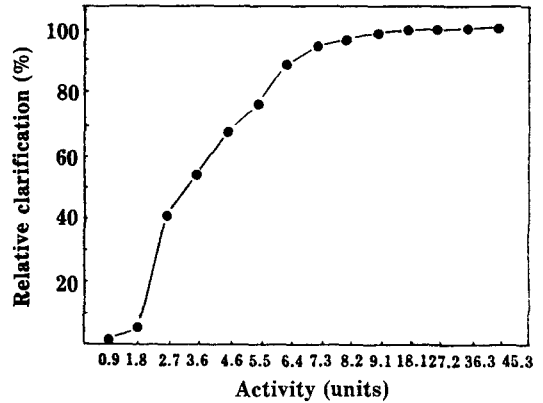


Fig. 14. Apple juice clarification by polygalacturonase from *Penicillium* sp. CB-20.

요 약

Penicillium sp. CB-20 이 생성하는 polygalacturonase 의 최대 효소활성을 위한 pH 는 5.0, 최적온도는 40°C 였으며, 이 효소는 약산성의 pH 에서 안정성을 보였고, 온도에 의한 안정성은 30°C 였으며 40°C 이상에서는 급격한 효소단백질의 불활성화가 진행되었다. 금속이온 중 Mg⁺⁺, Zn⁺⁺, Ba⁺⁺ 등이 활성을 촉진시켰고, Ag⁺⁺, Cu⁺⁺, Pb⁺⁺, Fe⁺⁺, Ca⁺⁺, Na⁺, Mn⁺⁺ 등은 효소활성을 저해하였으며, 본 균주가 생성하는 효소의 K_m 값과 V_{max} 값, 활성화에너지는 2.13×10⁻² mol/l, 104.17 μmol/min, 2,499 Kcal/mol 이었으며, pectin 보다 polygalacturonic acid 를 특이적으로 분해하였다. 효소저해제 중 EDTA, DNP, H₂O₂ 등에 의해 효소활성이 제해되어 효소분자 중의 금속이 활성에 관여하며, 말단 아미노기와 histidine 의 imidazole 기가 효소활성에 관여함이 입증되었던 반면에 효소분자 중 SH 기는 활성에 관여하지 않음을 알 수 있었다. 이 효소의 기질분해 양상을 종이 크로마토그래피로 확인한 결과 반응초기에는 monomer, dimer, oligomer 등이 생성되었고 시간이 경과할수록 oligomer 는 사라지고 monomer, dimer 만이 생성되는 것으로 보아 endo 형인 것으로 판단되었으며, 효소의 과즙청정도 측정에서는 약 8 unit 에서 거의 청정화되었다.

참고문헌

1. Rokhlenko, S.G., L.D. Vanyushkina, S.L. Panikhina and N.S. Tokhmakhchi: *Appl. Biochem. Microbiol.*, 16, 220 (1980).

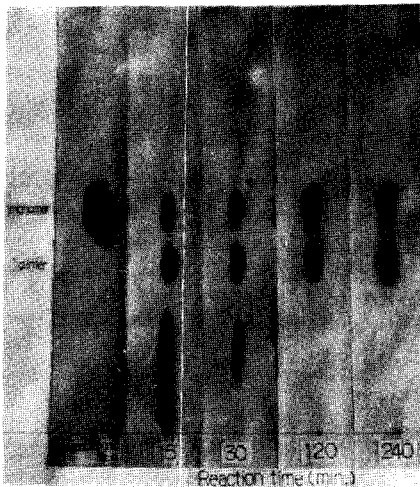


Fig. 13. Action pattern of polygalacturonase from *Penicillium* sp. CB-20.

균주가 생성하는 polygalacturonase 는 endo-type 의 효소로 판단되었다.

효소의 과즙청정도

본 효소가 과즙을 이용한 청정효과가 어느 정도인가를 측정하기 위하여 시판 홍옥의 과즙에 조효소를 첨가하여 반응시킨 후 유 등(32)의 방법으로 측정하여 얻은 청정도는 효소활성이 1.6 unit 에서부터 증가하여 8 unit 정도에서 거의 완전히 청정화됨을 보여주었다(Fig.14). 이는 본 균주의 조효소액이 ml 당 88.625 unit 인 것을 감안하면 산업적 이용 가능성이 충분히 있다고 판단되었다.

2. Brown, M.R., C.S. Ough: *Amer. J. Enol. Viticult.*, **32**, 272 (1981).
3. Ghildayal, N.P., S.V. Ramakrishna, P. Nirnala and H.N. Deri: *J. Food Sci. Tech. India.*, **18**, 24 (1981).
4. Kawabe, S., S. Vsami: *J. Jap. Soc. Food. Sci. Tech.*, **30**, 140 (1983).
5. Demain, A.L. and H.J. Phaff: *Wallestein Lab. Commun.*, **20**, 119 (1957).
6. Hatanaka, C. and J. Ozawa: *Nippon Nogei Kagaku Kaishi.*, **43**, 764 (1969).
7. Hasegawa, S. and C.W. Nagel: *Arch. Biochem. Biophys.*, **124**, 513 (1968).
8. Basham, H.G. and D.F. Bateman: *Physiol. Plant Pathol.*, **5**, 249 (1975).
9. Beuchat, L.R. and S.L. Rice: *Advan. Food Res.*, **25**, 237 (1979).
10. Harris, J.E. and C. Dennis: *J. Sci. Food Agric.*, **30**, 838 (1979).
11. Tanaka, K., F. Nonaka: *Annals Phytopathol. Soc. Jap.*, **47**, 166 (1981).
12. Archer, S.A. and A.H. Fielding: *J. Sci. Food Agric.*, **30**, 692 (1979).
13. Chesson, A.: *J. Appl. Bacteriol.*, **48**, 1 (1980).
14. Hobson, G.E.: In; *Recent Advances in the Biochemistry of Fruit and Vegetables*. P.P. 123. Ed. J. Friend and M.J.C. Rhode. Academic Press. London. (1981).
15. Grierson, D., G.A. Tucker and G. Robertson: In; *Recent Advances in the Biochemistry of Fruit and Vegetables*. P.P. 149 Ed. by J. Friend and M.J.C. Rhodes. Academic Press. London (1981).
16. Endo, A.: *Agric. Biol. Chem.*, **28**, 535 (1964).
17. Endo, A.: *Agric. Biol. Chem.*, **28**, 543 (1964).
18. Endo, A.: *Agric. Biol. Chem.*, **28**, 551 (1964).
19. Rexova-Benkova, L., J. Onelkova, B. Veruovic: *Biotechnology Letters.*, **5**, 737 (1983).
20. Rexova-Benkova, L. and M. Mrackova-Povrotova: *Carbohydr. Res.*, **98**, 115 (1981).
21. Rexova-Benkova, L., J. Onelkova, K. Filka and J. Koeuek: *Carbohydr. Res.*, **122**, 269 (1983).
22. Cho, Y.J., S.L. Lim, W.J. Lee and C. Choi: *Kor. J. App. Microbiol. Bioeng.*, **15**(5), (1989).
23. Lowry, O.H., N.J. Rosebrugh, A.L. Farr and R.J. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
24. Nelson, N.: *J. Biol. Chem.*, **153**, 375 (1944).
25. Hatanaka, C. and J. Ozawa: *Agr. Biol. Chem.*, **34**, 1618 (1970).
26. Hatanaka, C.: *Nippon Nogeikagaku Kaishi.*, **41**, 448 (1967).
27. Barmore, C.R. and G.E. Brown: *Phytopathology.*, **71**(3), 328 (1981).
28. Nam, Y.J., S.S. Hong, N.S. Kim: *Kor. J. Microbiol.*, **21**, 86 (1983).
29. Preiss, J. and G. Ashwell: *J. Biol. Chem.*, **238**, 1571 (1963).
30. Westhead, E.F.: *Biochemistry.*, **4**, 2139 (1965).
31. Lim, J.Y., Y. Yoshika, Y. Suzuki and J. Ozawa: *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 473 (1980).
32. Yu, J.H., B.K. Lee, R. Yang, S.H. Cho, J. Lwe: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **4**(2), 57 (1979).
33. Gaetano, L. and A. Zamorani: *J. Sci. Food Agric.*, **26**, 197 (1975).

(Received September 25, 1989)