

*Lactobacillus acidophilus*가 생성하는 Polygalacturonase의 성질

김순동[†] · 장경숙* · 오영애 · 김미정 · 정용진**

효성여자대학교 식품가공학과
*경산대학교 식품과학과
**경북대학교 식품공학과

Characteristics of Polygalacturonase Produced from *Lactobacillus acidophilus*

Soon-Dong Kim[†], Kyung-Sook Jang*, Young-Ae Oh,
Mee-Jung Kim and Yong-Jin Jung**

Dept. of Food Science and Technology, Hyosung Women's University, Kyungsan 713-702, Korea

*Dept. of Food Science, Kyungsan University, Kyungsan 713-715, Korea

**Dept. of Food Technology, Kyungbuk National University, Teagu 702-701, Korea

Abstract

The characteristics of endogenous and exogenous polygalacturonase(PG) produced from *L. acidophilus* were investigated as one of the serial studies on the fermentation of Chinese cabbage kimchi using *L. acidophilus*. Apparent molecular weight of endogenous and exogenous PG were estimated to be 420, 000 and 500, 000 daltons by the method of gel filtration and Vmax of the enzymes 8.0 and 0.3 μ mol galacturonic acid/ml/30min, respectively and Km of the enzymes were 4.0mg/ml. The optimum temperature, pH and salt concentration of the both enzymes were the same and appeared to 30 $^{\circ}$ C, 5.5 and 2-3%, respectively. The activities of the endogenous and exogenous PG all were severely decreased by increasing of temperature to 90 $^{\circ}$ C from 60 $^{\circ}$ C and its remained activities at 60 $^{\circ}$ C and 90 $^{\circ}$ C were 50%, 58%, and 19%, 5%, respectively.

Key words : *Lactobacillus acidophilus*, endogenous and exogenous polygalacturonase, characteristics

서 론

Polygalacturonase (PG)는 식물조직을 구성하는 세포간물질의 하나인 polygalacturonic acid의 α -1,4 glycoside결합을 가수분해하여 조직을 연화(softening)시키는 효소로서 식품의 품질변화에 많은 영향을 주며 일반 식물체에 널리 분포되어 있다¹⁻³⁾. 과일 및 채소류

의 연화중에 세포벽을 구성하는 pectin질의 분해로 인하여 수용성 polyuronide가 증가하며⁴⁾, 김치의 숙성중에도 배추의 세포벽을 구성하는 pectin질의 저분자화와 김치국물내의 수용성 pectin질의 증가가 관찰되고 있다⁵⁾.

박 등⁶⁾은 김치의 연화현상과 관련하여 재료인 배추, 무우, 마늘 및 생강에 PG의 존재를 확인하였으며, 최⁷⁾는 김치의 숙성중에 발견되는 *Bacillus* 속, *Flavobacterium* 속 및 *Pseudomonas* 속의 호기성 세균

[†]To whom all correspondence should be addressed

과 *Saccharomyces* 속 및 *Candida* 속의 효모가 생성하는 PG에 의하여 연부현상이 일어난다고 하였으나 김치의 숙성과 밀접한 관련이 있는 젖산균에 대한 연구는 거의 없는 실정이다.

*Lactobacillus acidophilus*는 김치의 숙성중에 서식하는 젖산균들과는 달리 장내에서 서식가능한 젖산균으로서 이를 이용한 김치제조연구가 철저히 요구되고 있는 실정이며 이 경우 연화와 깊은 관련이 있는 PG의 생성유무 및 그 특이성에 관한 연구는 김치의 품질을 향상시키는데 중요한 정보가 될 것이라 판단됨으로 본 연구에서는 이에 초점을 두어 균체내 효소와 균체의 효소로 구분하여 그 성질을 조사하였다.

재료 및 방법

균주와 배지

본 실험에 사용한 균주는 종균협회에서 분양받은 *Lactobacillus acidophilus* KCTC 3140이었으며 pH 6.4의 살균 MRS 배지⁸⁾에 접종하여 37℃에서 배양하였다.

효소의 추출

Polygalacturonase (PG)의 추출은 Moshrefi와 Luh의 방법⁹⁾을 기본으로하여 다음과 같이 행하였다. 즉 MRS배지 1L에 균을 접종, 37℃에서 48시간 배양한 배양액을 20,000rpm에서 냉동원심분리하여 균체와 상징액으로 나누고 균체내 효소는 0.1M의 NaCl을 함유하는 50mM의 pH 7.5 tris-HCl buffer (buffer A) 로써 2회 세척한 후 50mM의 2-mercapto ethanol을 함유하는 buffer A(buffer B)에 현탁하여 0~2℃에서 sonication 하였다. 다음에 균체와 효소는 상징액을 80% 유안염석, 원심분리하여 얻은 침전을 buffer B 용액에 녹여 0~4℃에서 24시간 동안 동일 buffer로써 분자량 3,000, 6,000을 제거하는 membrane tubing을 사용하여 투석한 후 buffer B액으로 정용하여 조효소액으로 하였다.

효소의 활성도 측정

효소의 활성도 측정은 Gross¹⁰⁾와 신 등¹¹⁾의 방법에 준하여 1% polygalacturonic acid-buffer B용액 100 μ l에 효소액 50 μ l를 가하여 30℃에서 30분간 반응시킨 다음 100mM borate (pH 9.0) 1ml을 vortex상에서 가하여 반응을 정지시켰으며 Somogyi-nelson시약¹²⁾에

의하여 정색하여 520nm에서 흡광도를 측정, 표준품 galacturonic acid의 검량선 $galacturonic\ acid\ \mu g/6.5ml = OD \times 83.3 - 0.083$, $r = 0.9790$ 에 의하여 함량을 구하였다. 활성도는 균체내 PG의 경우 균체 1g당 시간당 기질로부터 분해하여 생성된 galacturonic acid량을 μ mol로 계산하여 unit로 하였으며 균체의 PG의 경우는 배지 1ml 당 시간당 생성된 galacturonic acid량을 μ mol 산출하여 unit로 하였다.

효소의 정제

투석, 농축하여 정용한 조효소액 10ml을 10mM의 sodium acetate buffer (pH 4.6)으로 평형시킨 Sephacryl S-200 column (2.80×46cm)에 주입하여 유속 0.25ml/min., 20분 간격으로 분획하여 polygalacturonase를 분리하였으며 분리된 효소 peak는 Diaflo PM-10membrane (MW cut off; 10,000)을 부착한 Amicon Diaflo system을 사용하여 4℃, N₂ gas하에서 가압농축하여 효소의 성질을 조사하는데 사용하였다.

Gei 여과에 의한 효소의 분자량 측정

효소의 분자량은 Whitaker¹³⁾의 방법에 따라 Sephacryl S-200 column (2.80×46cm)을 10mM sodium acetate buffer로 평형시켜 void volume (V₀)을 구하고 동일 buffer로 완전히 세척한 후 표준단백질의 elution volume (V_e)을 구한 다음 표준단백질의 분자량에 대한 V_e/V₀을 plot한 검량선 $MW \times 10^3 = -0.744 V_e/V_0 + 2.065$, $r = -0.9779$ 에 의하여 측정하였다. 이때 표준단백질은 cytochrome C (MW 12,400), albumin (MW 66,000), phosphorylase b (MW 94,000) 및 β -amylase (MW 200,000)을 사용하였다.

효소의 생화학적 성질

균체내 및 균체의 polygalacturonase의 기질 polygalacturonic acid 농도에 따른 활성변화를 측정하여 Km 값과 Vmax 값을 구하였다. 또 반응시간 경과에 따른 활성변화, 열안정성, 소금농도의 영향 등은 최적온도와 pH조건에서 행하였으며 열안정성은 60~90℃사이에서 10℃간격으로 2~10분간 처리한 후 30℃에서 반응시켜 잔존활성을 구하였다.

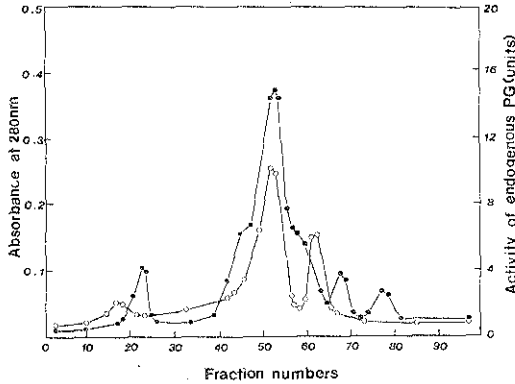


Fig. 1. Elution profile of endogenous polygalacturonase extracted from *Lactobacillus acidophilus* on Sephacryl S-200 column. Column size ; 2.80×46.0cm, flow rate; 0.25ml/min., absorbance at 280nm; -●-, polygalacturonase activity ; -○-

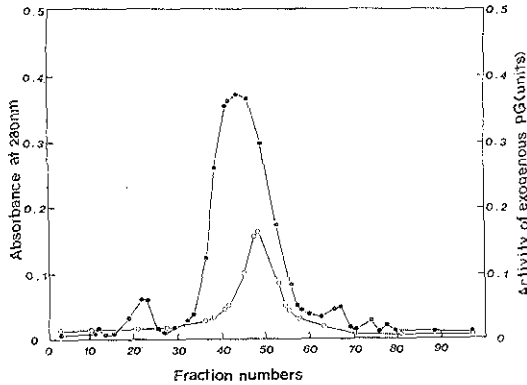


Fig. 2. Elution profile of exogenous polygalacturonase extracted from *Lactobacillus acidophilus* on Sephacryl S-200 column. Column size ; 2.80×46.0cm, flow rate ; 0.25ml/min., absorbance at 283nm; -●-, polygalacturonase activity ; -○-

결과 및 고찰

Polygalacturonase의 분리

*Lactobacillus acidophilus*가 생성하는 PG를 균체내와 균체외로 구분하여 Sephacryl S-200 column으로 분획한 결과(Fig. 1, 2) 균체내 PG는 fraction No. 46~57에 대형의 peak과 No. 60~65에 소형의 peak이 분리되었으며, 균체외 PG는 fraction No. 42~54에 한개의 peak이 분리되었다. 개략적인 평균분자량

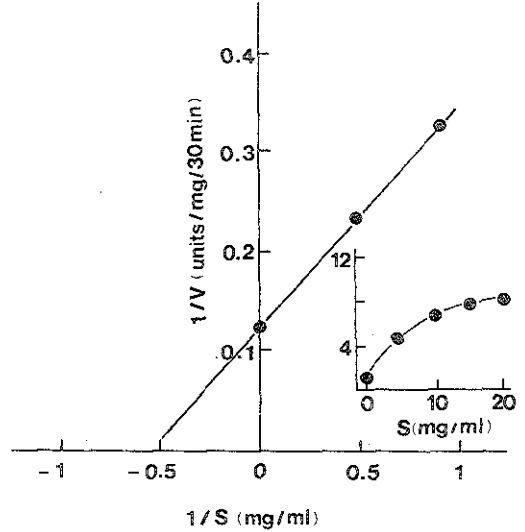


Fig. 3. Lineweaver-Burk plots of endogenous(endo) polygalacturonase extracted from *Lactobacillus acidophilus*.

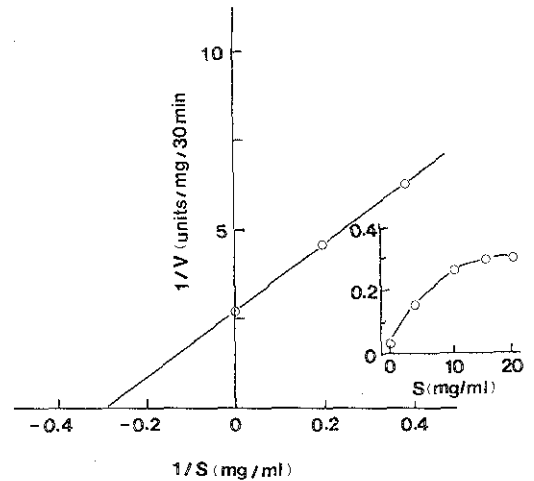


Fig. 4. Lineweaver-Burk plots of exogenous (exo) polygalacturonase extracted from *Lactobacillus acidophilus*.

은 각각 420,000 및 500,000dalton 이었다. Pressy와 Avants¹³⁾는 토마토에서 분리한 PG의 분자량은 isozyme 별로 차이를 보이며 440,000~840,000dalton 범위라고 보고 하였으며 복숭아¹⁴⁾의 경우는 410,000~680,000, 사과¹⁵⁾의 경우는 590,000으로 대개 40,000에서 800,000범위로 보고되어 있어 본 실험의 결과와 비슷한 범위를 보이고 있다.

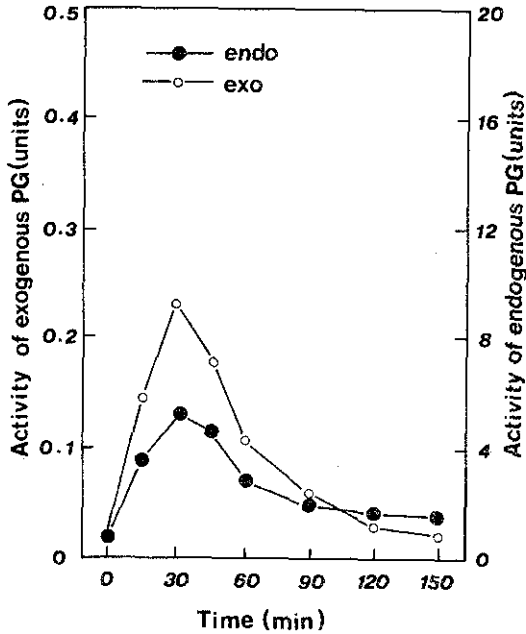


Fig. 5. Time course on the activities of endogenous and exogenous polygalacturonase extracted from *Lactobacillus acidophilus*.

생화학적 성질

기질에 대한 특성을 조사한 결과 Fig. 3, 4에서와 같이 1% polygalacturonic acid를 기질로 하였을 때 균체내 PG의 Km 값은 4.0mg/ml, Vmax는 8.0 μ mol galacturonic acid/mg/30min 이었고, 균체의 PG의 Km 값은 4.0mg/ml, Vmax는 0.3 μ mol galacturonic acid/ml/30min 이었다. 또 반응시간에 따른 활성도 변화를 측정할 결과는 Fig. 5와 같다. 이 결과는 30분간격으로 측정하였는데 60분간 측정할 경우 30분 동안의 활성도를 제한값으로 나타내었으며 90분, 120분 및 150분의 경우도 동일하게 하였다. 그결과 균체내 및 균체의 다같이 반응 30분에 최대값을 나타내었고 그 이후 반응시간이 경과됨에 따라 활성도의 점진적인 감소현상을 볼 수 있는데 균체내 효소는 90분 이후는 활성도를 거의 나타내지 않는 반면 균체의 효소는 150분까지 활성도를 나타내었다.

Fig. 6은 pH에 따른 활성변화를 본 것으로 최적 pH는 균체내 및 균체의 다같이 pH 5.5 부근이었으며 균체내 효소에 비해 균체의 효소의 활성도가 높았다. 그리고 김치가 숙성되었을 때의 pH 4.0 부근에서도 상당한 활성을 나타내었다. 일반적으로 효소활성은 출처에 따라서 다소 상이한 최적 pH를 보이고 있으나¹⁶⁻¹⁷⁾ 김치와 관련된 미생물에 대한 연구는 매우 부

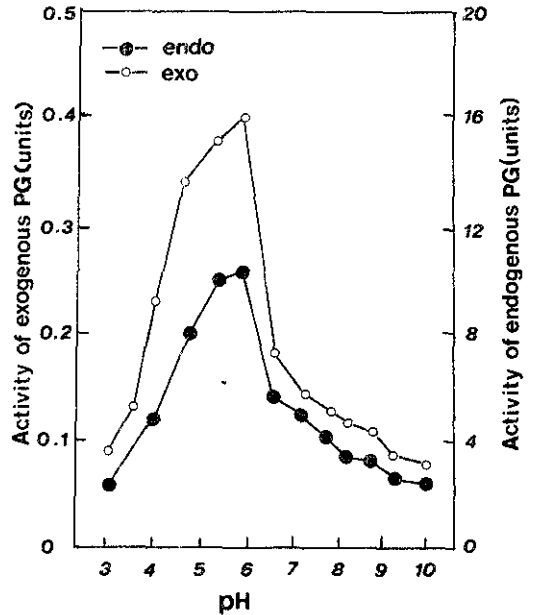


Fig. 6. Effect of pH on the endogenous and exogenous polygalacturonase activities extracted from *Lactobacillus acidophilus*.

족한 실정이다. 그러나 박 등이 김치재료로부터 추출한 PG의 pH에 따른 활성변화를 조사한 결과 최적 pH는 배추의 경우 pH 4.5, 무우는 pH 4.5~5.5였으며, pH 6.5이상에서는 활성이 거의 소멸되었고 마늘은 pH 3.5부근으로 이보다 높은 pH에서는 활성이 점차 감소하였다고 하였다. 김치의 최초 담금시의 pH가 5~6범위이며 잘 숙성되었을 때의 pH가 4.0 부근이므로 이와 같은 문헌들의 결과와 본 실험의 결과를 고려할 때 *L. acidophilus*는 김치의 숙성초기의 연화작용을 주도할 것으로 생각되며 어느정도 숙성되어 식용 가능한 김치가 되면 이 균에 의한 연화작용은 상당히 위축될 것으로 생각되나 각종 부재료로부터 유래하는 효소들과 함께 활발한 연화작용을 할 것으로 생각된다. *L. acidophilus*를 이용하여 김치를 담글 경우 소금의 농도와 온도변화에 따른 PG 활성변화를 조사해 볼 목적으로 실험한 결과는 Fig. 7 8과 같다. 이 경우 소금의 농도를 2~10% 범위로 사용하였는데 김치에 적당한 소금농도로 생각되는 2~3% 범위에서 활성도가 높았고 균체내 효소보다 균체의 효소의 활성이 높게 나타났으며 6~10% 농도에서는 활성이 현저히 감소하였으며 최적작용온도는 20~40 $^{\circ}$ C범위이나 균체의 효소는 10 $^{\circ}$ C에서도 비교적 높은 활성을 나타내었다.

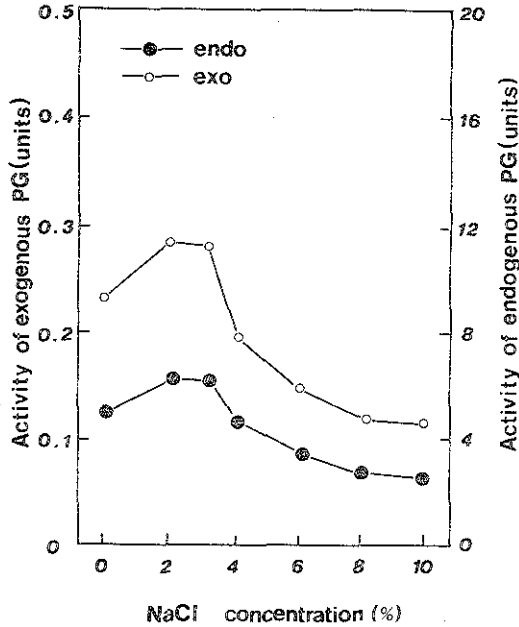


Fig. 7. Effect of NaCl concentration on the endogenous and exogenous polygalacturonase activities extracted from *Lactobacillus acidophilus*.

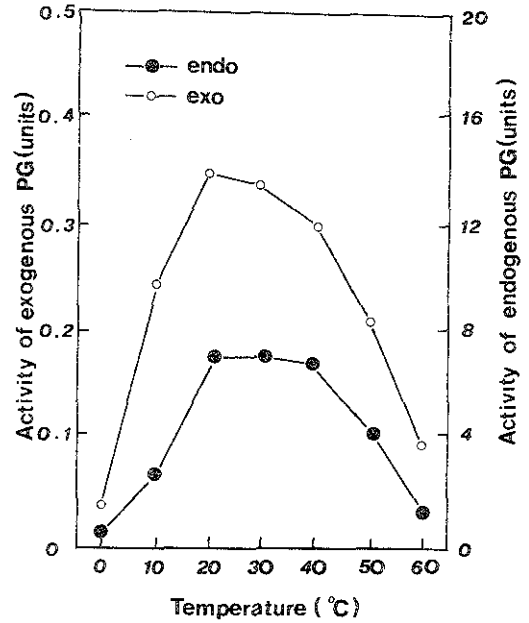


Fig. 8. Effect of temperature on the endogenous and exogenous polygalacturonase activities extracted from *Lactobacillus acidophilus*.

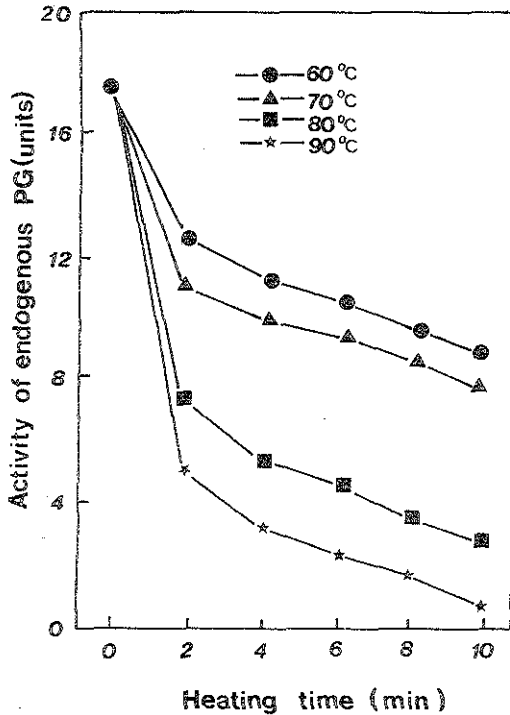


Fig. 9. Effect of heating temperature and time on the stability of endogenous polygalacturonase extracted from *Lactobacillus acidophilus*.

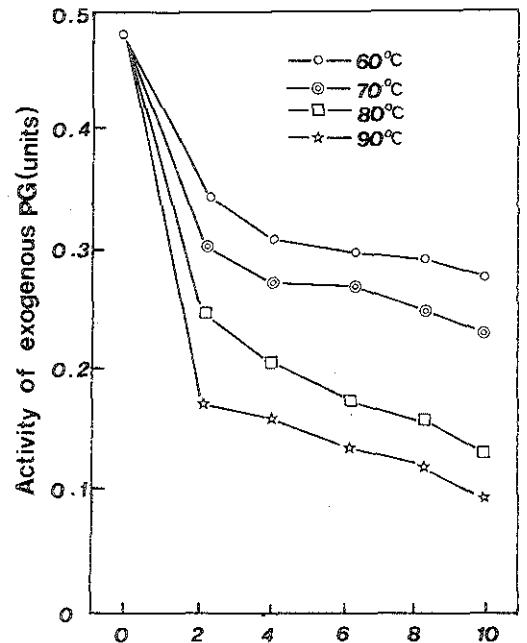


Fig. 10. Effect of heating temperature and time on the stability of exogenous polygalacturonase extracted from *Lactobacillus acidophilus*.

한편, 부재료인 배추와 무우로부터 유래되는 PG의 활성은 소금농도가 0.8%일 때 최대를 보이며 2~3%에서는 활성이 크게 감소되는 것으로 알려져 있어 *L. acidophilus*에 의한 김치의 연화작용은 예상외로 클 것으로 판단된다.

균체내 및 균체의 효소의 열에 대한 안정성을 조사하기 위하여 60~90°C 범위에서 2~10분간 시간별로 처리한 후 잔존 활성을 측정 한 결과는 Fig. 9, 10과 같다.

그 결과 온도가 60°C에서 90°C로 높아질수록 현저한 활성저하를 볼 수 있으며 최초 2분간 열처리에 의하여 저해율이 높았으며 이후 시간의 경과에 따라 점진적인 활성저하를 나타내었으며 균체내 효소의 경우 열처리 하였을 때 60°C에서는 52%, 70°C에서 44%, 80°C에서는 16%, 90°C에서는 5%의 잔존활성을 나타내었고, 균체의 효소의 경우는 각각 58%, 48%, 27% 및 19%의 잔존활성을 보여 PG의 열에 대한 안정성이 높았다.

요 약

*Lactobacillus acidophilus*를 이용한 배추김치제조 연구의 일환으로 이 균이 생성하는 김치의 연화와 밀접한 관련이 있는 효소의 하나인 polygalacturonase(PG)의 성질을 균체내 및 균체의 PG로 나누어 조사하였다. Gel 여과법에 의하여 측정 한 균체내의 PG의 개략적인 분자량은 각각 420,000 및 500,000dalton 이었으며, Km값은 다같이 4.0mg/ml이었고, Vmax는 각각 8.0 및 0.3 μ mol galacturonic acid/ml/30min 이었다. 최적 pH는 균체내의 PG 다같이 5.5 부근이었으며, 최적온도는 30°C, 최적 소금농도는 2~3%이었다. 효소활성은 60°C에서 90°C로 높아질수록 크게 저하하였으며 60°C에서의 잔존활성은 균체내 PG의 경우 50%, 균체의 PG의 경우 58% 이었고 90°C에서는 균체내 PG는 5%, 균체의 PG는 19%로서 균체의 효소의 열안정성이 높았다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 연구비의 지원(과제번호: 911-1508-091-2)으로 이루어진 연구결과의 일부이며 지원당국에 감사를 드립니다.

문 헌

1. 신승렬, 김진구, 김순동, 김광수: 감과실의 성숙과 추숙중의 polygalacturonase 활성변화 및 특성. 한국영양식량학회지, 19(6), 596(1990)
2. Huber, D. J.: The role of cell wall hydrolases in fruit softening. *Horticultural Review*, 5, 169(1983)
3. 구영조, 최신양: 김치의 과학기술. 한국식품개발연구원 기술신서 제2집, 창조사, 서울(1991)
4. 김순동, 강명수, 김광수: 고추의 성숙에 따른 세포벽 다당류의 변화와 β -Galactosidase Isozymes의 분리. 한국영양식량학회지, 14(2), 157(1985)
5. 김순동, 이신호, 김미정, 오영애: pH조정제를 이용한 저염 배추김치의 숙성 중 pectin질의 변화. 한국영양식량학회지, 17(3), 255(1988)
6. 박희옥, 김기현, 윤선: 김치재료에 존재하는 pectinesterase, polygalacturonase 및 peroxidase 특성에 관한 연구. 한국식문화학회지, 7(4), 443(1990)
7. 최국지: 김치에서 분리한 효모에 관한 연구, pectinase의 활성에 관하여. 강원대학 연구논문집, 11, 93(1977)
8. Harrigan, W. F. and McCance, M. E.: Laboratory methods in food and dairy microbiology. Academic Press, New York, p.347(1976)
9. Moshrefi, M. and Luh, B. S.: Purification and characterization of two tomato polygalacturonase isoenzymes. *J. Food Biochem.*, 8, 39(1984)
10. Gross, K. C.: A rapid and sensitive spectrophotometric method for assaying polygalacturonase using 2-cyanoacetamide. *Hortscience*, 10(6), 624(1975)
11. Neilson, N.: A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, 153, 375(1944)
12. Whitaker, J. R.: Determination of molecular weights of proteins by gel filtration on Sephadex. *Anal. Chem.*, 35, 1950(1963)
13. Pressey, R. and Avants, J. K.: Two forms of polygalacturonase in tomatoes. *Biochem. Biophys. Acta.*, 309, 363(1973)
14. Pressey, R. and Avants, J. K.: Difference in polygalacturonase composition of clingstone and freestone peaches. *J. Food Sci.*, 43, 1415(1978)
15. Bartley, I. M.: Exo-polygalacturonase of apple. *Phytochemistry*, 17, 213(1978)
16. Reymond, D. and Phaff, H. J.: Purification and certain properties of avocado polygalacturonase. *J. Food Sci.*, 30, 266(1965)
17. Ali, Z. M. and Brady, C. J.: Purification and characterization of the polygalacturonase of tomato fruits. *Aust. J. Plant Physiol.*, 9, 155(1982)

(1991년 8월 26일 접수)