

Rhizopus oryzae CJ-2114가 생성하는 Polygalacturonase의 특성 및 작용양상

정영건 · 조영제 · 천성숙 · 최 청[†]

영남대학교 식품가공학과

Characteristics and Action Pattern of Polygalacturonase from *Rhizopus oryzae* CJ-2114

Yung-Gun Chung, Young-Je Cho, Sung-Sook Chun and Cheong Choi[†]

Dept. of Food Science and Technology, Yeungnam University, Gyongsan 712-749, Korea

Abstract

Rhizopus oryzae CJ-2114 was selected for its strong polygalacturonase activity among various strains of mold found in soil. The optimum pH for the enzyme activity was 4.0 and optimum temperature was 40°C. The activation energy for the polygalacturonase was calculated by Arrhenius equation was 2.048Kcal/mol. The reaction of this enzyme followed typical Michaelis-Menten kinetics with the Km value of 54.05mM with the Vmax of 13.9m mole/min. The enzyme is relatively stable in acidic condition. The activity of polygalacturonase was inhibited completely by Cu²⁺, Pb²⁺, Zn²⁺ and Mn²⁺ at concentration of 1mM. The enzyme can be inactivated by the treatment with maleic anhydride and iodine. The results indicate the possible involvement of histidine at active site. When polygalacturonase from *Rhizopus oryzae* CJ-2114 was reacted with polygalacturonic acid as a substrate mono-, di-, and oligogalacturonic acid were produced at early and mono-, digalacturonic acid produced at late incubation time.

Key words : *Rhizopus oryzae* CJ-2114, polygalacturonase

서 론

펙틴질은 식물세포벽의 중층을 형성하는 물질로서 galacturonic acid의 carboxyl group의 75% 이상이 methanol로 ester화된 물질로서 식물조직의 연화를 일으키며 또한 pectic enzyme의 작용을 받게 됨으로써 식물의 생리적변화에 관여하며, 과일의 가공과정중에 착즙율을 저하시킬 뿐만 아니라 과즙속에서 단백질과 중합체를 형성하여 혼탁현상, 가열취 또는 짙은 착색의 원인이 되기 때문에 이러한 펙틴질을 분해시켜 착즙 및 청징효과를 높여주기 위해 펙틴질분해 효소들이

이용되어 왔으며, 과채류의 처리가공에 있어 식물조직의 인위적분해에 광범위하게 사용되므로 더 많은 관심을 끌게 되었고, 이미 산업화에 이르기까지 연구가 진행되고 있다¹⁻⁴⁾. 펙틴질 분해효소는 Demain과 Phaff⁵⁾의 제안에 따라 polygalacturonase와 polymethylgalacturonase로 구분된 이후 많은 연구자에 의해 연구되어져 왔으며^{6,7)} 이들 펙틴효소중 과즙의 청징화에 깊은 관련이 있다고 보고되어진 polygalacturonase는 곰팡이와 몇몇 박테리아와 효모에 의해 생성되는 것으로 알려져 있고, 대부분의 식물 병원균이 polygalacturonase를 생성한다고 많은 연구자들이 보고하였으며⁸⁻¹¹⁾, 이러한 pectic enzyme들이 식물의 생리적 변화에 관여한다

[†]To whom all correspondence should be addressed

고 보고하였다¹²⁻¹⁵. 특히 Endo¹⁶⁻¹⁸와 Rexova 등¹⁹⁻²¹은 polygalacturonase의 청징화 기작과 효소의 작용양상에 깊은 관심을 가지고 연구를 진행하였으나 아직 뚜렷하게 밝혀진 것은 많지 않은 실정이다.

본 연구에서는 전보²²에서와 같이 토양에서 분리한 *Rhizopus oryzae* CJ-2114가 생성하는 polygalacturonase의 특성과 작용양상을 조사하여 산업화에의 이용 가능성을 살펴 보았다.

재료 및 방법

공시균주

공시균은 전보²²에서와 같이 대구, 경북지방의 토양에서 분리한 75균주 중에서 *Rhizopus oryzae* CJ-2114 균주를 동정하여 사용하였다.

정제효소액의 조제

전보²²와 같이 최적배양조건에서 배양된 밀기울배지에서 얻은 조효소액을 ion exchange chromatography와 gel filtration을 이용하여 정제한 뒤 정제효소액으로 사용하였다.

단백질의 정량

표준단백질로써 bovine serum albumin을 사용하여 Lowry 등²³의 방법에 의하여 측정하였다.

효소활성 측정

Polygalacturonase는 기질인 polygalacturonic acid를 분해하여 oligomer를 생성하므로 이 환원기의 증가량을 측정하여 polygalacturonase의 역가를 측정하였다. 환원기의 정량은 DNS법²⁴으로 실시하였으며 이때 효소단위는 효소액 1ml가 1분간에 1 μ mole의 환원기(α -D-galacturonic acid)를 생성하는 것을 1 unit로 정하였다.

기질에 대한 작용양상

1% 기질용액 40ml에 효소액 3ml를 가하여 40°C에서 15, 30, 120, 240분 반응시켰다. 반응중 채취한 시료는 3분간 수조에서 가열하여 효소를 불활성화 시킨 뒤 0.5 μ milipore로 여과하여 Hatanaka 등^{6,25,26}의 방법에 의해 여지 크로마토그래피로 작용양상을 확인하였

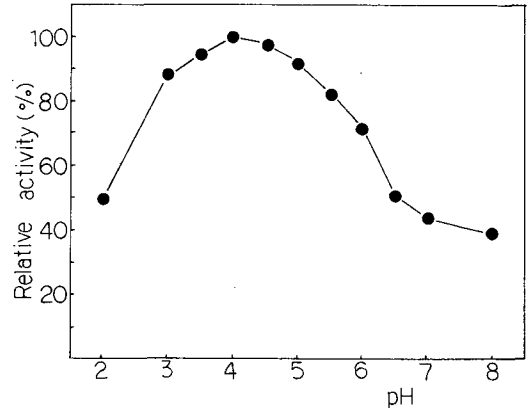


Fig. 1. Effect of pH on the activity of polygalacturonase from *Rhizopus oryzae* CJ-2114.

다. 이때 전개용매는 n-butanol : acetic acid : H₂O = 5 : 2 : 3(v/v/v)를 사용하였으며, 전개후 건조한 여지는 1 ml의 AgNO₃ 포화용액에 6ml의 증류수를 혼합하고 200ml의 아세톤을 가하여 희석한 용액에 넣은후 건조하고, 10% NaOH : 메탄올=1 : 5(v/v)용액에 검은 반점이 생성될 때까지 방치한 다음 여지를 수세하고 0.5M Na₂S₂O₃ 용액에 넣어 배경색을 제거하고 증류수로 세척한 후 건조하였다.

과즙의 청징도 측정

시판 홍옥으로 만든 과즙(pH 4.1) 5ml에 0.5ml의 조효소를 첨가하여 혼합한 뒤 37°C의 항온조에서 1시간 반응시켜 끓는 물에서 5분간 열처리하고 냉각하여 700xg로 10분간 원심분리하였으며 그 상등액을 660 nm에서 투과율을 측정하였다.

결과 및 고찰

Polygalacturonase의 특성

pH에 의한 영향

pH가 효소의 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 0.05M acetate buffer (pH 2~5.5), Na-phosphate buffer (pH 6~7), Tris buffer (pH 8)용액 각 1ml에 0.2ml의 효소용액을 가하고 기질과 함께 30°C에서 1시간동안 반응시켜 효소활성을 측정한 결과 Fig. 1에서 나타난 바와 같이 효소의 최적 pH는 4.0이었다. 이는 Jane와 Colin²⁷이 *Rhizopus* sp.의 polygalacturonase가 산성의 영역에서 최적 활성을 가진다는 보고와 비슷하였다.

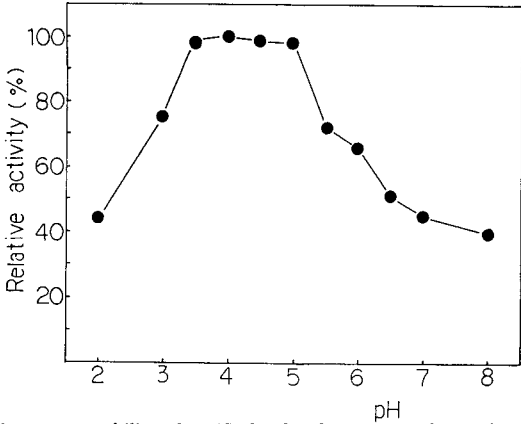


Fig. 2. pH stability of purified polygalacturonase from *Rhizopus oryzae* CJ-2114.

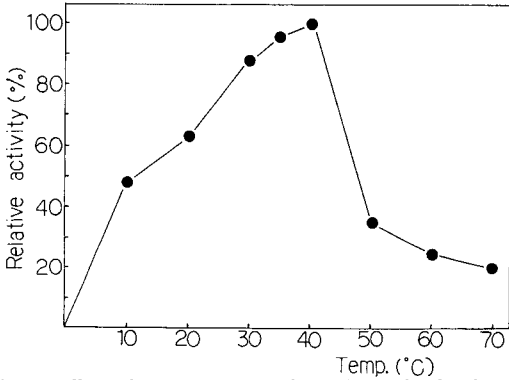


Fig. 3. Effect of temperature on the activity of polygalacturonase from *Rhizopus oryzae* CJ-2114.

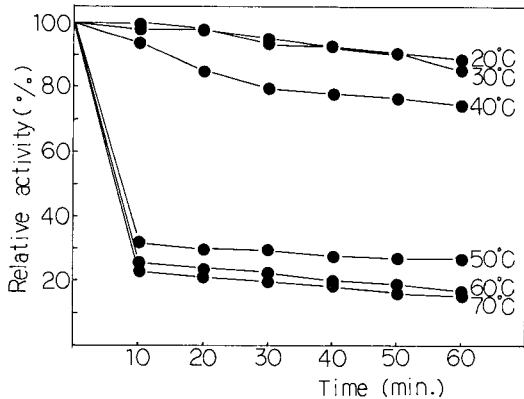


Fig. 4. Temperature stability of polygalacturonase from *Rhizopus oryzae* CJ-2114.

pH 안정성

효소의 pH에 대한 안정성을 조사해 보기 위하여 McIlvaine buffer-용액(pH 2~8) 1ml에 효소액 0.2ml를 가하고 4°C에서 24시간 동안 작용시킨 뒤 최적 pH인 4.0으로 조절하고 잔존활성을 조사한 결과는 Fig. 2와 같다. *Rhizopus oryzae* CJ-2114가 생산하는 polygalac-

turaonase는 그 안정범위가 pH 3.5~5까지로 비교적 안정한 편이었다. 이는 유 등²⁸⁾과 이 등²⁹⁾의 polygalacturonase pH 안정범위가 pH 3~5까지라고 보고한 것과 유사하였으며 본 효소의 pH 안정범위가 pH 3.5~5까지의 산성에서 안정하다는 점은 과실의 pH가 4.0전후의 산성인 점을 감안하면 과실쥬스 및 펄프의 가공과 관련하여 산업적 이용 가능성이 있을 것으로 판단되었다.

온도에 의한 영향

효소활성에 미치는 온도의 영향을 알아보기 위하여 효소반응 온도를 10~70°C까지 변화시키면서 1시간 반응시켜 활성을 측정한 결과는 Fig. 3과 같으며 40°C에서 반응시켰을때 그 상대활성이 가장 높게 나타났다. 이는 조 등³⁰⁾과 유 등²⁸⁾의 polygalacturonase 최적 반응온도가 40°C라고 보고한 것과 유사 하였다.

열 안정성

Polygalacturonase의 열안정성을 조사하기 위하여 20~70°C의 범위에서 10~60분간 반응시킨 결과 Fig. 4에서와 같이 40°C까지는 활성감소가 별로 없었으나 50, 60°C에서 10분 반응시켰을 때부터 70% 이상의 실활이 발생하였다. Jane과 Colin²⁷⁾은 *Rhizopus* sp.의 polygalacturonase가 40~60°C에서 최대활성을 가지며 60°C이하의 온도에서 안정하였다고 보고하였으며 본 효소는 50°C이상의 온도에서는 매우 불안정한 효소로 판단되었다.

금속이온의 영향

금속이온이 효소활성에 미치는 영향을 검사하기 위하여 pH 4.0으로 맞춘 증류수에 각종 금속이온들을 20 mM 되게 제조하여 금속이온용액 0.2ml에 효소액 0.2ml를 넣어 교반하고 30°C에서 1시간동안 방치한 뒤 효소활성을 조사한 결과는 Table 1과 같다. 본효소는 Na⁺에 의해서만 활성이 유지 되며, Mn²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, Pb²⁺ 등에 의해서는 60~70% 가량 저해를 받았다. 이는 *Penicillium* sp.의 polygalacturonase가 Mn²⁺, Cu²⁺, Pb²⁺ 등에 의해 저해되었다는 조 등³⁰⁾의 보고와 비슷하였다.

효소반응 속도론

Polygalacturonase의 기질에 대한 친화력을 조사하기 위하여 Lineweaver-Burk plot로 Km치와 V_{max}를 측정한 결과 Fig. 5와 같이 polygalacturonic acid에 대한 Km치는 54.05mM 이었으며 V_{max}는 13.9m mole/min 이었다.

Table 1. Effect of metal ion on activity of polygalacturonase from *Rhizopus oryzae* CJ-2114

Ion (1mM)	Metal	Relative activity (%)*
Control	—	100.00
Cu ²⁺	CuSO ₄ · 5H ₂ O	39.34
Zn ²⁺	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	49.79
Ca ²⁺	CaCl ₂	41.61
Pb ²⁺	Pb(CH ₂ COO) ₂	36.33
Mn ²⁺	MnSO ₄ · H ₂ O	32.40
Hg ²⁺	HgCl ₂	72.06
Mg ²⁺	MgSO ₄ · 7H ₂ O	77.00
Fe ²⁺	FeSO ₄	63.72
Ba ²⁺	BaCl ₂ · 2H ₂ O	84.50
Na ²⁺	NaCl	101.02

*The reaction mixture, consisted of 0.5ml enzyme solution and 0.5ml metal ion solution (2 × 10⁻³M), was incubated at 30° C for 5hrs and the residual activity were assayed

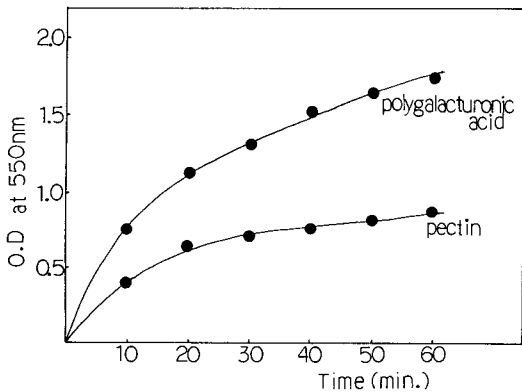


Fig. 5. Lineweaver-Burk plot for the hydrolysis of polygalacturonic acid by the purified polygalacturonase from *Rhizopus oryzae* CJ-2114.

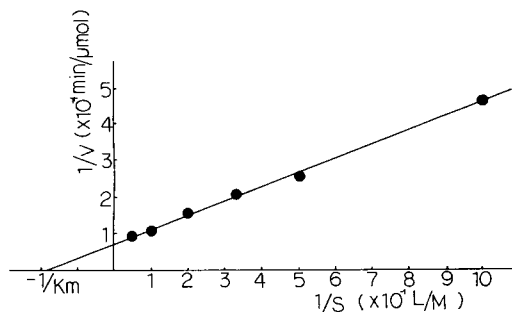


Fig. 6. Arrhenius plot of polygalacturonase reaction.

활성화에너지

Polygalacturonase의 활성화 에너지를 측정하기 위하여 10° C에서 45° C의 범위에서 온도변화에 따른 효

Table 2. Effect of various inhibitors on activity of polygalacturonase from *Rhizopus oryzae* CJ-2114

Inhibitor (10mM)	Relative activity (%)*
Control	100.0
Dinitrophenol	95.3
Ethylenediaminetetraacetic acid	96.1
Mercuric chloride	42.9
Maleic anhydride	46.4
Trishydroxymethyl amino methane	90.1
Iodine	43.9
Hydrogen peroxide	71.4
p-Chloromercuribenzoic acid	27.1

*The reaction mixture, consisted of 0.5ml enzyme solution and 0.5ml inhibitor solution (20mM), was incubated at 30° C for 1hr and the residual activities were assayed

소활성을 Arrhenius방정식에 의해 plot한 결과는 Fig. 6과 같으며 활성화 에너지는 2.049Kcal/mol 이었다.

활성저해제의 영향

효소활성에 영향을 미치는 화학적 저해제중 금속과 결합하여 chelate를 형성하는 ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA), 효소분자중 SH기의 저해제로 쓰이는 p-chloromercuribenzoic acid(PCMB), 말단 아미노기와 친화력이 강하여 이 말단 아미노기가 효소활성단인 경우 활성을 저해하게 되는 2, 4-dinitrophenol (DNP), methionine과 cysteine의 modifier인 H₂O₂, N-terminal amino group과 histidine의 imidazole group을 저해하는 maleic anhydride(MA), tyrosine의 phenolic hydroxyl group, histidine의 imidazole group을 저해하는 iodine 및 화학적 저해제로 tris와 mercuric chloride를 선정하여 10mM 의 농도로 효소액에 첨가하여 30° C에서 1시간동안 전 처리한 후 잔존활성을 측정한 결과 Table 2와 같이 maleic anhydride와 iodine에 의해서 활성저해가 관찰되었으며, mercuric chloride와 PCMB에 의해서도 활성저해가 발생하였다. 이같은 결과로 보아 본 효소의 active site에 histidine 잔기가 존재하며 그 histidine 잔기의 imidazole group이 효소활성에 관여함을 추측할 수 있었다. Westhead²⁰⁾는 polygalacturonase의 활성단에 histidine 잔기가 존재하며 그 histidine 잔기의 imidazole기가 효소활성에 필수적이라고 보고하였으며 Rexova 등¹⁹⁻²¹⁾도 fungal source의 polygalacturonase의 효소활성에 histidine의 imidazole기가 필수적이라고 보고한 결과와 유사하였다. 또한 PCMB에 의한 활성저해는 cysteine의 SH기가 변화하여 효소활성의 발

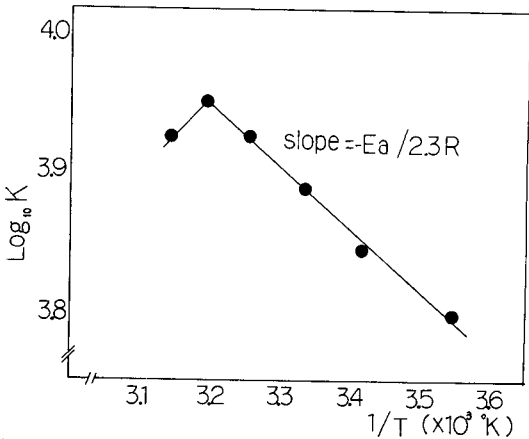


Fig. 7. Hydrolysis of pectin and polygalacturonic acid by the polygalacturonase from *Rhizopus oryzae* CJ-2114.

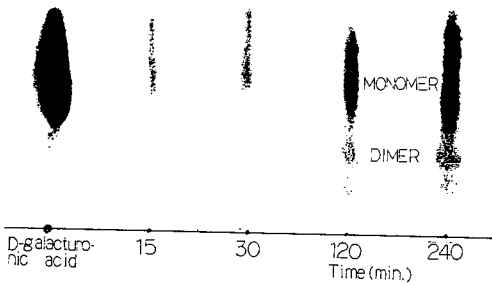


Fig. 8. Action pattern of polygalacturonase from *Rhizopus oryzae* CJ-2114.

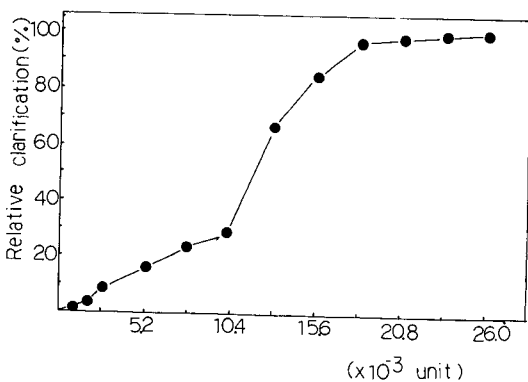


Fig. 9. Apple juice clarification by polygalacturonase from *Rhizopus oryzae* CJ-2114.

현에 영향을 준것으로 추측되었다.

기질에 대한 작용양상

정제효소를 1% 농도의 pectin과 polygalacturonic acid를 기질로 사용하여 기질분해능력을 측정된 결과

Fig. 7에 나타난 바와 같이 polygalacturonase는 pectin보다 polygalacturonic acid를 더 잘 분해하였다. 조 등³⁰⁾은 *Penicillium* sp.의 polygalacturonase가 pectin보다 polygalacturonic acid에 특이적으로 작용한다고 보고하였고 본 균주의 효소도 유사한 결과를 나타내었으며 또한 polygalacturonic acid에 대한 분해양상을 규명하고자 polygalacturonic acid에 효소를 작용시켜 15, 30, 120, 240분 동안 작용시킨 뒤 여지크로마토그래피한 결과 15, 30분 경과시에 monomer, dimer, oligomer 등이 나타나고 120, 240분이 지나면서 monomer, dimer만이 생성되는 것으로 보아 본 균주가 생성하는 polygalacturonase는 endo형의 효소로 추측되었다(Fig. 8).

효소의 과즙청정도

본 효소가 사과과즙에 대한 청정효과가 어느 정도인가를 측정하기 위하여 시판 홍옥의 과즙 5ml에 조효소 0.5ml를 첨가하여 반응시킨 후 660nm 에서의 투과율로 청정도를 측정된 결과 효소활성이 2.6×10^3 unit에서부터 증가하여 18.2×10^3 unit 정도에서 거의 완전히 청정화됨을 보여주었다(Fig. 9).

요 약

Rhizopus oryzae CJ-2114가 생성하는 polygalacturonase의 최대활성을 위한 pH는 4.0, 최적온도는 40°C였으며, 효소활성화 에너지는 2.049Kcal/mol이었다. 정제효소의 Km값과 Vmax값은 54.05mM, 13.9m mole/min이었고, pectin보다 polygalacturonic acid를 특이적으로 분해하였다. 이 효소는 약산성의 pH에서 안정성을 보였으며, 온도에 의한 안정성은 40°C였으며, 50°C 이상에서는 급격한 효소단백질의 불활성화가 진행되었다. 금속이온중 Na⁺ 이온에 의해 활성이 유지되며 Cu²⁺, Pb²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺ 이온 등은 효소활성을 저해하였다. 효소저해제 중 maleic anhydride와 iodine 등에 의해 효소활성이 저해되어 효소분자중의 histidine의 imidazole기와 cysteine의 SH기가 효소활성에 관여함이 입증되었다.

이 효소의 기질분해양상을 여지 크로마토그래피로 확인한 결과 반응초기에는 monomer, dimer, oligomer 등이 생성되었고, 시간이 경과할수록 oligomer는 사라지고 monomer, dimer만이 생성되는 것으로 보아 endo형인 것으로 판단되었으며, 효소의 과즙청정도 측정에서는 약 18.2×10^3 unit에서 거의 청정화 되었다.

감사의 글

이 논문은 1990년도 문교부 지원 한국학술진흥재단의 지방대학육성비 지원 학술연구조성비에 의한 연구이며, 이에 감사 드립니다.

문헌

- Rokhlenko, S. G., Vanyushkina, L. D., Panikhina, S. L. and Tokhmakhchi, N. S. : Effect of enzyme preparations on wine stability. *Apple Biochem. Microbiol.*, **16**, 220(1980)
- Brown, M. R. and Ough, C. S. : A comparison of activity and effects of two commercial pectic enzyme preparations on white grape musts and wines. *Amer. J. Enol. Viticult.*, **32**, 272(1981)
- Ghildayal, N. P., Ramakrishna, S. V., Nirmala, P. and Deri, H. N. : Large scale production of pectolytic enzyme by solid state fermentation. *J. Food Sci. Tech. India*, **18**, 24(1981)
- Kawabe, S. and Usami, S. : Immobilization of papain with citrus inner-peel pectin. *J. Jap. Soc. Food Sci. Tech.*, **30**, 140(1983)
- Demain, A. L. and Phaff, H. J. : The preparation of pure di and trigalacturonic acid. *Waestein Lab. Commun.*, **20**, 119(1957)
- Hatanaka, C. and Ozawa, J. : Micro-iodometry of aldose. *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*, **43**, 764(1969)
- Hasegawa, C. and Nagel, C. W. : Isolation of an oligogalaturonate hydrolase from a *Bacillus* species. *Arch. Biochem. Biophys.*, **124**, 513(1968)
- Basham, H. G. and Bateman, D. F. : Relationship cell death in plant tissue treated with a homogeneous endopectate lyase to cell wall degradation. *Physiol. Plant Pathol.*, **5**, 249(1975)
- Beuchat, L. R. and Rice, S. L. : *Byssochlamys* sp. and their importance in processed fruits. *Advan. Food Res.*, **25**, 237(1979)
- Harris, J. E. and Dennis, C. : The stability of pectolytic enzymes in sulphite liquor in relation to breakdown of sulphited strawberries. *J. Sci. Food Agric.*, **30**, 838(1979)
- Tanaka, K. and Nonaka, F. : Synergistic action of oxalic acid and pectolytic enzyme on the rot of onion bulb caused by *Aspergillus niger*. *Annals Phytopathol. Soc. Jap.*, **47**, 166(1981)
- Archer, S. A. and Fielding, A. H. : Pectolytic enzymes and degradation of pectin associated with breakdown of sulphited strawberries. *J. Sci. Food Agric.*, **30**, 692(1979)
- Chesson, A. : Maceration in relation to the post-harvest handling and processing of plant material. *J. Appl. Bacteriol.*, **48**, 1(1980)
- Hobson, G. E. : Enzymes and texture changes during ripening. In "Recent advances in the biochemistry of fruit and vegetable", Friend J. and Rhode M. J. C. (eds.), Academic Press, London, p.123(1981)
- Grierson, D., Tuckess, G. A. and Robertson, G. : The molecular biology of ripening. In "Recent advances in the biochemistry of fruit and vegetables", Friend, J. and Rhodes, M. J. C. (eds.), Academic Press, London, p. 149(1981)
- Endo, A. : Studies on pectolytic enzymes of molds. Part 3. Purification and properties of endopolygalacturonase I. *Agric. Biol. Chem.*, **28**, 535(1964)
- Endo, A. : Studies on pectolytic enzymes of molds. Part 4. Purification and properties of endopolygalacturonase II. *Agric. Biol. Chem.*, **28**, 543(1964)
- Endo, A. : Studies on pectolytic enzymes of molds. Part 5. Purification and properties of endopolygalacturonase III. *Agric. Biol. Chem.*, **28**, 551(1964)
- Rexova, B. L., Omelkova, J. and Veruovic, B. : Endopolygalacturonase immobilized on a porous poly-2,6-dimethyl-p-phenyleneoxide. *Biotechnology Letters*, **5**, 737(1983)
- Rexova, B. L. and Mrackova, P. M. : Effect of immobilization of *Aspergillus niger* extracellular endo-D-galacturonase or kinetics and action pattern. *Carbohydr. Res.*, **98**, 115(1981)
- Rexova, B. L., Omelkova, J., Filka, K. and Koeourek, J. : Selective isolation of endo-D-galaturonase of *Aspergillus niger* based on interaction with D-galactosiduronic acid covalently bound to polyhydroalkyl methacrylate. *Carbohydr. Res.*, **122**, 269(1983)
- 정영진, 조영제, 권오진, 최청 : *Rhizopus*속이 생성하는 polygalacturonase의 생산 및 정제. 한국영양식품학회지, 인쇄중(1992)
- Lowry, O. H., Rosebrugh, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265(1951)
- Miller, G. L. : Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, **31**(1), 4266(1959)
- Hatanaka, C. and Ozawa, J. : An oligogalaturonate transeliminase from Ewiniaaroideae. *Agric. Biol. Chem.*, **34**, 1618(1970)
- Hatanaka, C. : Microiodometry of aldose. *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*, **41**, 448(1967)
- Jane, E. H. and Colin, D. : Heat stability of fungal pectolytic enzymes. *J. Sci. Food Agric.*, **33**, 781(1982)
- 유주현, 진효상, 변유량, 오두환 : *Verticillium* sp.가 생성하는 protopectin 용해효소에 관한 연구. 한국산업미생물학회지, **10**(3), 197(1982)
- 이봉기, 유주현, 양육, 조세훈, 유준 : *Aspergillus* sp.가 생성하는 pectic enzyme에 관한 연구. 한국산업미생물학회지, **4**(2), 63(1967)
- 조영제, 안봉진, 임성일, 이우제, 최청 : *Penicillium* sp. CB-20이 생성하는 polygalacturonase의 특성 및 작용양상. 한국산업미생물학회지, **17**(6), 580(1989)
- Westhead, E. F. : Photooxidation with Rose Bengal of a critical histidine residue in yeast enolase. *Biochemistry.*, **4**, 2139(1965)