

*Ganoderma lucidum*이 생산하는 Polygalacturonase의 정제 및 특성

윤 속 · 김명곤 · 홍재식 · 김명숙
전북대학교 농과대학 식품공학과

Purification and Properties of Polygalacturonase from *Ganoderma lucidum*

Sook Yoon, Myung-Kon Kim, Jai-Sik Hong and Myeong-Sook Kim

Department of Food Science & Technology, Chonbuk National University, Chonju, 560-756

ABSTRACT: The properties of polygalacturonase by *Ganoderma lucidum* in liquid culture were investigated. The enzyme was composed of an endo- and an exo-polygalacturonase. The endo- and exo-polygalacturonase were purified approximately 56 and 9.2-fold, respectively, through ammonium sulfate fractionation, gel filtration on Biogel P-100, anion exchange chromatography on DEAE-cellulose, gel chromatography on Sephadex G-150 and re-gel chromatography on Sephadex G-150. The endo- and exo-polygalacturonase had higher affinity for apple pectin than for citrus pectin or pectic acid. The K_m values of the endo- and exo-polygalacturonase for apple pectin, determined on the Lineweaver-Burk plot, were 1.44 and 10.6 mg ml⁻¹ for apple pectin, respectively. Purified endo-polygalacturonase was found to be homogeneous electrophoretically and had a molecular weight of 54,000 estimated on SDS polyacrylamide gel. The optimal pH for the activity of the enzymes was 4.0. The endo- and exo-polygalacturonase were stable in the pH range of 4.0 to 6.0 and 3.5 to 5.5, respectively. The optimal temperatures of the endo- and exo-polygalacturonase were 40 and 60°C, respectively. The exo-polygalacturonase was more resistant to heat than the endo-polygalacturonase, requiring heating for 40 min at 80°C for complete inactivation. The activity of the endo-polygalacturonase was increased by Ca⁺⁺ and Mn⁺⁺ ions, while that of the exo-polygalacturonase was increased by Ca⁺⁺ ion only, and was not affected by Mn⁺⁺ ion.

KEYWORDS: *Ganoderma lucidum*, endo- and exo-polygalacturonase, Enzyme purification.

Pectin 질은 미생물을 비롯하여 고등식물계 및 하등식물계에 이르기까지 자연계에 널리 분포되어 있고, galacturonic acid로 구성된 직쇄상의 polygalacturonide로 평균 분자량(川端, 1977)이 20~30×10⁴이며, 약 1000~1500개의 galacturonic acid가 α-1,4-glucoside 결합에 의해 중합된 poly-galacturonic acid이다. Pectin 분해효소는 이러한 pectin 질의 α-1,4 결합을 분해하는 효소군의 총칭으로 pectinase라 불리우며 각종 미생물에 의해서 생산되고 있고 pectin 질의 종류, 반응 부위 및 작용 양상 등에 따라 protopectinase, pectin esterase, pectin lyase 및 po-

lygalacturonase로 크게 분류(Fennema, 1985)되며, polygalacturonase(EC 3.2.1.15)는 poly(1,4-α-D-galacturonide) glycanohydrolase로 endo-polygalacturonase(endo-PG), endo-polymethylgalacturonase(endo-PMG), exo-polygalacturonase(exo-PG) 및 exo-polymethylgalacturonase(exo-PMG)로 세별되고 있다(鳥英, 1985). Pectin 분해와 관련된 효소학적 연구는 거의가 곰팡이류(Yamasaki 등, 1966; Kaji 등, 1969; Yoshihara 등, 1977), 효모류(Sakai 등, 1984; 畑中 등, 1968)나 세균류(Sakai 등, 1985)에서의 pectinase에 관한 연구 보고가 주종을 이루고 있고 담자균류로는 *Corticium rolfssii*, *Agaricus campestris* 등에서 pectinase 생산능이 있음이 확인되었

*Corresponding author

을 뿐 담자균류의 pectinase에 대한 연구는 극히 미미한 실정이다(Endo 등, 1961; Kaji 등, 1969; Yoshihara, 1977). 따라서 본 연구에서는 *Ganoderma lucidum*이 생산하는 polygalacturonase의 유용활용 방안을 위한 체계적인 연구의 일환으로 영지버섯 균사체로부터 효소를 생산하고 정제하여 작용 최적 pH, 작용 최적 온도, pH 안정성, 열 안정성, 기질 특이성, 기질 농도의 영향, 분자량 측정 등 효소의 제반 특성을 밝히고자 한다.

材料 및 方法

전북대학교 농과대학 미생물실에서 보관중인 *Ganoderma lucidum*을 polygalacturonase 생산용 최적 배지인 pectin 10 g, soluble starch 10 g, yeast extract 1 g, peptone 2 g, phenylalanine 1 g, KH_2PO_4 2 g, MgSO_4 0.2 g, CaCl_2 50 mg, thiamin·HCl 100 μg , D.W. 1000 ml에서 30°C , 10일간 배양한 후 배양 여과액을 ammonium sulfate로 염석 및 투석하고 원심분리한 시료를 동결건조하여 column chromatography 용 시료로 하였다.

Endo- 및 exo-polygalacturonase 활성 측정

*Ganoderma lucidum*을 액체배지에서 10일간 정지배양한 배양물을 여과하여 endo- 및 exo-polygalacturonase의 조효소액으로 하였으며, endo-polygalacturonase의 활성은 1% pectin을 함유한 0.04 M sodium acetate buffer(pH 4.6) 5.6 ml에 조효소액 1 ml를 가하고 40°C water bath에서 10분간 반응시킨 후 boiling water bath에서 3분간 반응정지 후 반응액 250 μl 를 취하여 HAAKE viscometer(Roboz 등, 1952)의 방법에 준하여 아래와 같이 점도의 감소활성을 측정하였으며, 이때 효소를 여러 농도로 희석하여 50%의 점도감소를 나타내는 효소량을 1 unit로 하였다.

$$A = (T_a - T) / (T_a - T_0) \times 100$$

A ; Reducing rate of viscosity (%)

T_a ; Flow time (sec) of pectin soln. added to the heat inactivated enzyme

T ; Flow time (sec) of the reaction mixture

T_0 ; Flow time (sec) of water added to the

heat-inactivated enzyme

Exo-polygalacturonase 활성은 endo-polygalacturonase에서와 동일한 조건으로 반응시킨 후 반응액 1 ml를 취하여 유리된 환원당을 DNS 법(Miller, 1959)에 의하여 540 nm에서 비색정량하였다. Galacturonic acid를 사용하여 같은 방법으로 표준곡선을 작성하였으며 효소활성도는 galacturonic acid를 1 분당 1 μM 생성하는 능력을 1 unit로 하여 활성의 비교단위로 하였다.

단백질 농도 측정

단백질 농도는 Lowry 등(1951)의 방법에 준하였으며, bovine serum albumin을 표준물질로 사용하여 측정하였다.

효소의 정제

Ammonium sulfate에 의한 분획 *Ganoderma lucidum* 배양 여액에 ammonium sulfate를 가하여 30~85% 포화시켜 침전물에 10 mM sodium acetate buffer(pH 5.0)를 가하여 용해하고 동일 완충용액에서 하룻밤 투석하고, 동결건조하여 이후의 실험에 사용하였다.

Biogel P-100 Column chromatography Ammonium sulfate로 염석 및 투석하고 동결건조시킨 조효소를 소량의 10 mM sodium acetate buffer(pH 5.0)로 용해하고 동일 완충용액으로 평형화시킨 Biogel P-100 column(1.4×100 cm)에 주입하여 10 mM sodium acetate buffer(pH 5.0)로 분당 0.2 ml의 속도로 5.2 ml 씩 분취하였다.

DEAE-Cellulose column chromatography Biogel P-100 column chromatography의 활성 peak를 모아 동결건조하고 소량의 10 mM sodium acetate buffer(pH 5.0)로 용해하여 동일 완충용액으로 평형화한 DEAE-cellulose column(3.6×20 cm)에 주입하고 동일 완충용액에서 1 M NaCl로 linear gradient elution(16 ml/h) 시키면서 5.2 ml 씩 분취하여 활성 peak를 모았다.

Sephadex G-150 Column chromatography

DEAE-cellulose column chromatography의 활성 peak를 모아 투석하여 동결건조하고 소량의 10 mM sodium acetate buffer(pH 5.0)로 용해하고, 동일 완충용액으로 평형화시킨 Sephadex G-150 column

(1.4×100 cm)에 주입하여 동일 완충용액으로 분당 0.2 ml의 속도로 5.2 ml 씩 분취하여 활성 peak를 모았다.

정제확인 및 분자량 측정을 위한 SDS-polyacrylamide gel 전기영동 효소의 정제도를 확인하기 위하여 Laemmli(1970)의 방법에 준하여 10 µg의 정제된 효소를 10% gel에서 SDS-PAGE를 실시하였다. 분자량 확인을 위한 표준단백질로는 high molecular weight calibration kit와 low molecular weight calibration kit protein standards(Pharmacia 제)를 사용하였다.

효소의 특성

최적 pH pH 3.7~5.6까지는 0.04 M acetate buffer, pH 2.6~7.0까지는 0.02 M citrate-0.04 M Na₂HPO₄ buffer, pH 1.0~2.2까지는 0.04 M Clark and Lubs buffer를 사용하여, 1% pectin을 함유한 각각의 완충용액 5.6 ml에 조효소액 1 ml를 가하고 40°C의 water bath에서 10분간 반응시킨 후 boiling water bath에서 3분간 반응정지시켜 endo- 및 exo-polygalacturonase 활성을 측정하고 상대활성도로 나타내었다.

최적 온도 1% pectin을 함유한 0.04 M sodium acetate buffer(pH 4.0) 5.6 ml에 조효소액 1 ml를 가하고 30~80°C water bath에서 10분간 반응시킨 후 boiling water bath에서 3분간 반응정지시켜 endo- 및 exo-polygalacturonase 활성을 측정하고 상대 활성도로 나타내었다.

pH 안정성 최적 pH 실험에서와 동일한 완충용액 0.5 ml에 효소액 0.5 ml를 가하여 40°C에서 30분 보존한 후 1% pectin을 함유한 0.04 M sodium acetate buffer(pH 4.0) 5.6 ml를 가하고 40°C water bath에서 10분간 반응시킨 후 boiling water bath에서 3분간 반응정지시켜 endo- 및 exo-polygalacturonase 활성을 측정하고 상대 활성도로 나타내었다.

열 안정성 효소액을 30~80°C의 water bath에 보관하면서 경시적으로 효소액 1 ml를 취한 다음 곧 얼음물로 냉각하고 효소의 잔존활성을 40°C에서 측정하였다.

기질 특이성 기질에 대한 친화도를 측정하기 위하여 apple pectin, citrus pectin, pectic acid 1% 용액을 기질로 하여 효소의 활성을 40°C에서 측정

하였다.

기질 농도의 영향 효소의 반응 속도와 기질 농도와의 관계를 검토하기 위하여 apple pectin, citrus pectin, pectic acid 등의 기질을 0.04 M sodium acetate buffer(pH 4.6)에 0~5 mg/ml의 농도로 가하여 효소의 반응속도를 측정하였으며, Km 및 Vmax 값은 Lineweaver-Burk plot 법(Lineweaver 등, 1934)에 의해서 산출하였다.

금속 ion의 영향 효소 반응액에 NaCl 50 mM과 100 mM, CaCl₂ 1~10 mM, 기타 금속 ion은 1 mM 농도로 조정하고 효소액을 가하여 40°C에서 효소의 활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

효소의 정제

*Ganoderma lucidum*의 배양 여액을 ammonium sulfate 30~85%로 염석하고, 탈염 및 동결건조시킨 시료를 소량의 10 mM sodium acetate buffer로 용해하여 Biogel P-100 chromatography를 행한 결과는 Fig. 1과 같다. Biogel P-100 column gel filtration 결과 *Ganoderma lucidum*이 생산하는 polygalacturonase의 활성은 fraction No 11~14와 No 24~26 주위에서 두개의 주 peak로 나타났다. 이 두 peak 중 No 11~14 fraction(PG-I)은 pectin을 반응 기질로 하였을 때 DNS 환원력과 높은 점도감소 활성을 나타내어 전형적인 endo-cleavage type(endo-polygalacturonase)이었으며, fraction No 24~26 (PG-II)는 DNS의 환원력에는 높은 활성을 나타낸

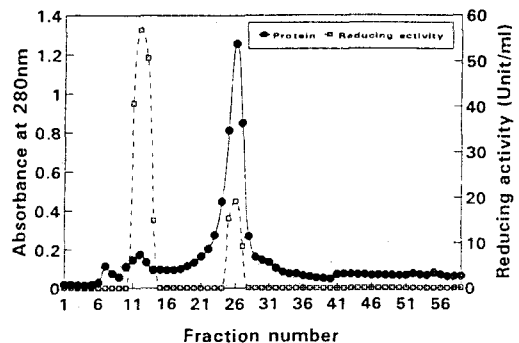


Fig. 1. Gel filtration of polygalacturonase from *Ganoderma lucidum* on Biogel P-100. The experimental conditions are described in the text.

반면, 점도감소 활성에는 전혀 영향을 미치지 않아 exo-cleavage type(exo-polygalacturonase)로 확인되었다. 또한 *Ganoderma lucidum*이 생산하는 polygalacturonase는 DNS 환원력으로 비교하면 약 44 : 1로 exo-cleavage type보다도 endo-cleavage type이 월등히 많아 영지버섯균이 생산하는 polygalacturonase는 거의가 endo-polygalacturonase로 존재하였다. 따라서 Biogel P-100 chromatography에 의해 활성을 나타낸 PG-I peak와 PG-II peak의 활성 부위를 모아 동결건조하고 소량의 10 mM sodium acetate buffer에 용해한 시료를 DEAE-cellulose column에서 1 M NaCl로 linear gradient 시켜 anion exchange chromatography를 실시한 결과는 각각 Fig. 2 및 3과 같다. Fig. 2는 endo-polygalacturonase (PG-I)의 anion exchange chromatogram으로 1 M

NaCl gradient 하였을 때 활성 부분인 fraction No 31~39가 peak로 나타났다. Fig. 3은 exo-polygalacturonase(PG-II)의 anion exchange chromatogram으로 1 M NaCl gradient 하였을 때 fraction No 11~16이 활성 peak로 나타나 활성 부분을 모아 endo-polygalacturonase에서와 같이 10 mM sodium acetate buffer(pH 5.0)에서 투석 후 동결건조하였다. Exo-polygalacturonase는 DEAE-cellulose ion exchange chromatography까지 정제하였을 때 회수율이 total activity의 약 0.1%로 수율 자체도 워낙 저조하고 상당히 많은 이종 단백질이 혼재되어 있으며, Sephadex G-150 gel filtration에 의한 정제시 정제 손실 또한 커서 그 이후의 정제는 거의 불가능하였다. 따라서 DEAE-cellulose ion exchange ch-

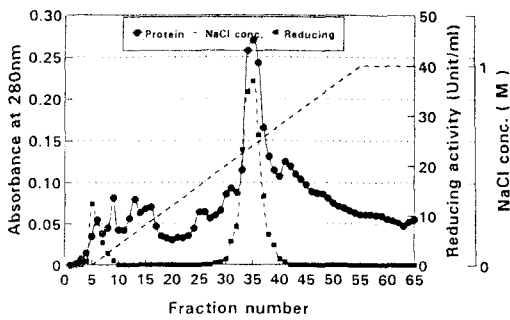


Fig. 2. Anion exchange chromatogram of PG-I from *Ganoderma lucidum* on DEAE-cellulose. The experimental conditions are described in the text.

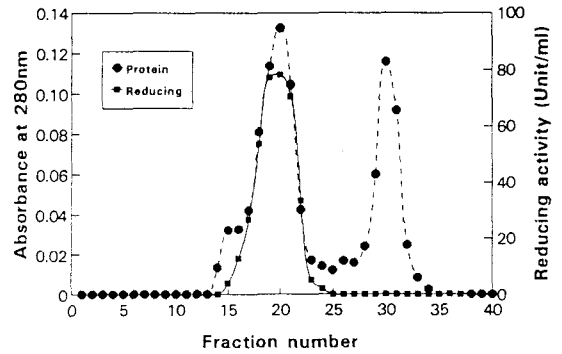


Fig. 4. Gel filtration of PG-I on Sephadex G-150. The experimental conditions are described in the text.

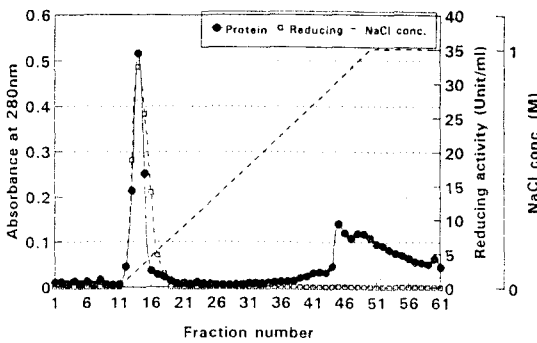


Fig. 3. Anion exchange chromatogram of PG-II from *Ganoderma lucidum* on DEAE-cellulose. The experimental conditions are described in the text.

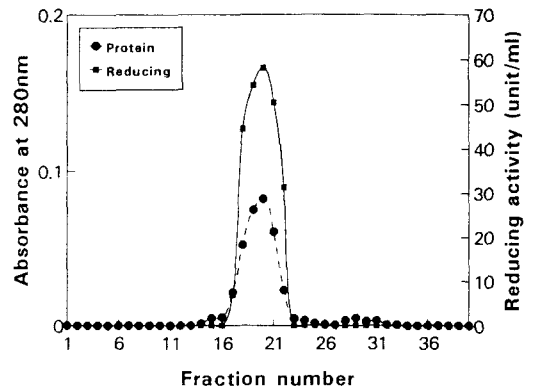


Fig. 5. Regel filtration of PG-I on Sephadex G-150. The experimental conditions are described in the text.

Table 1. Purification step of polygalacturonase from *Ganoderma lucidum*

Purification steps		Total activity* (unit)	Total protein (mg)	Specific activity (unit/mg protein)	Yield (%)
Culture filtrate	PG	18,100	—	—	100.0
Ammonium sulfate precipitation	PG	7,766	173.00	45	42.9
Biogel P-100 gel filtration	Endo-PG	4,973	18.02	276	27.5
	Exo-PG	113	0.84	135	0.6
DEAE cellulose ion exchange	Endo-PG	1,884	4.17	452	10.4
	Exo-PG	20	0.14	147	0.1
Sephadex G-150 gel filtration	Endo-PG	927	1.13	823	5.1
Sephadex G-150 regel filtration	Endo-PG	491	0.55	892	2.4

romatography의 활성부분을 10 mM sodium acetate buffer(pH 5.0)에서 투석시킨 후 효소특성 실험을 위한 부분정제 효소로 사용하였다. Endo-polygalacturonase(PG-I)는 정제도를 더 높이기 위하여 DEAE-cellulose anion exchange chromatography 상에서 활성을 나타낸 peak 부분을 모아 투석 및 동결건조하고 소량의 10 mM sodium acetate buffer (pH 5.0)에 용해시켜 Sephadex G-150에서 gel filtration을 실시한 결과는 Fig. 4와 같다. Sephadex G-150 column 상에서 endo-polygalacturonase(PG-I)의 gel filtration을 행한 결과, PG-I의 활성은 fraction No. 17~23 사이에서 주 peak가 나타났다. Endo-polygalacturonase의 순도를 더 높이기 위하여 활성 부위를 모아 또 다시 동결건조하고 Sephadex G-150 column에서 re-gel chromatography를 실시한 결과 (Fig. 5) 거의 단일 peak로 나타났기 때문에 이를 동결건조시켜 endo-polygalacturonase(PG-I)의 정제 효소로 하였다. 상기와 같은 방법으로 endo- 및 exo-polygalacturonase를 순차적으로 정제한 결과는 Table 1과 같이 배양 여액 중의 polygalacturonase의 specific activity는 16 ± 2 unit/mg protein이었으며, ammonium sulfate 침전에 의한 분획은 배양액에 비하여 약 2.8배 정제되어 42.9%의 회수율을 나타내었다. 또한 Biogel P-100 gel filtration에 의하여 endo- 및 exo-polygalacturonase의 specific activity

는 각각 17.3, 8.4배 증가되었고 회수율은 27.5%와 0.6%이었으며, DEAE-cellulose column chromatography에서의 endo- 및 exo-polygalacturonase의 specific activity는 각각 28.3배, 9.2배 증가하였고 회수율은 10.4%와 0.1%로 나타났다. Endo-polygalacturonase는 Sephadex G-150 column chromatography에서 최종 re-gelfiltration까지 실시한 결과 specific activity는 892 unit/mg protein으로 약 56 배의 정제도를 나타내었다. 또한 본 효소를 50% 점도감소활성을 기준 단위(1 unit)로 환산하면 배양액은 33 unit/mg protein, ammonium sulfate 분획물은 350 unit/ml, 정제 효소는 23,000 unit/mg protein의 specific activity를 나타냈다. Sakai와 Takaoka(1985)는 각종 미생물로부터 생산한 정제 endo-polygalacturonase의 활성(50% 점도감소 활성)을 비교한 결과 *Aureobasidium pullulans*는 3,492 unit/mg protein, *Trichosporon penicillatum*은 24,900 unit/mg protein, *Galactomyces reessii*은 16,219 unit/mg protein, *Kluyveromyces fragilis*는 5,890 unit/mg protein이었다고 보고한 바 있는데 본 endo-polygalacturonase는 *Trichosporon penicillatum*과는 거의 비슷한 수준이었으나 다른 균주에 비해서는 높은 specific activity를 나타내었다.

정제효소의 순도 및 분자량 측정

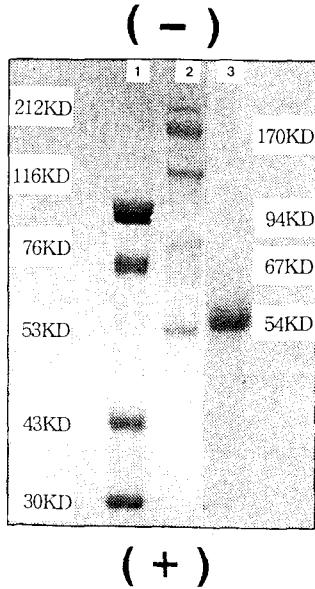


Fig. 6. Electrophoresis diagram of purified PG-I in SDS polyacrylamide gel. 1 lane; Low M. W. calibration kit, 2 lane; High M. W. calibration kit, 3 lane; Purified endo-polygalacturonase from *Ganoderma lucidum*

효소의 정제정도와 분자량을 확인하기 위하여 SDS polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 실시한 결과는 Fig. 6과 같다. SDS-PAGE 상에서 단일 band를 확인할 수 있었기 때문에 거의 확실히 정제되었다. 또한 정제효소단백의 분자량 확인을 위하여 Pharmacia 제 high molecular weight calibration kit와 low molecular weight calibration kit의 protein standards와 비교한 결과 Rf 0.42로 표준 단백질 중 glutamic dehydrogenase (M.W. 53,000)과 거의 유사한 Rf 치를 나타내어 *Ganoderma lucidum*이 생산하는 endo-polygalacturonase의 분자량은 54,000으로 추정하였다. 이는 *Aureobasidium pullulans*의 42,000(Sakai 등, 1985), *Kluyveromyces fragilis*의 33,000(Sakai 등, 1984), *Verticillium albo-atrum*의 30,000(Wang 등, 1970), *Aspergillus niger*의 46,000과 35,000(Hara 등, 1983) 등에 비하면 약간 분자량이 높은 경향이였다.

효소의 특성

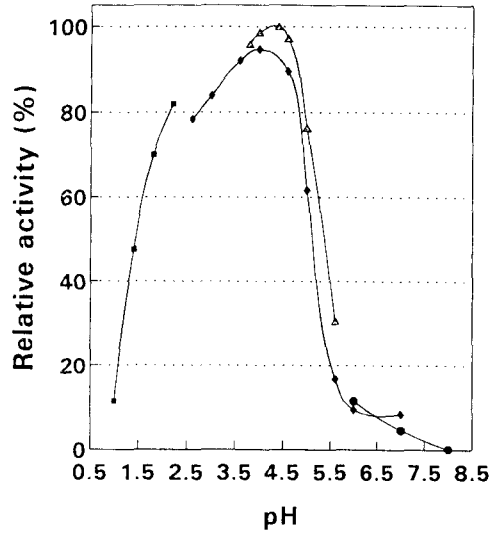


Fig. 7. Effect of pH on the activity of endo-polygalacturonase (PG-I). -■-; Clark & Lubs buffer, -◇-; McIlvaine buffer, -△-; Na-acetate buffer, -●-; Phosphate buffer

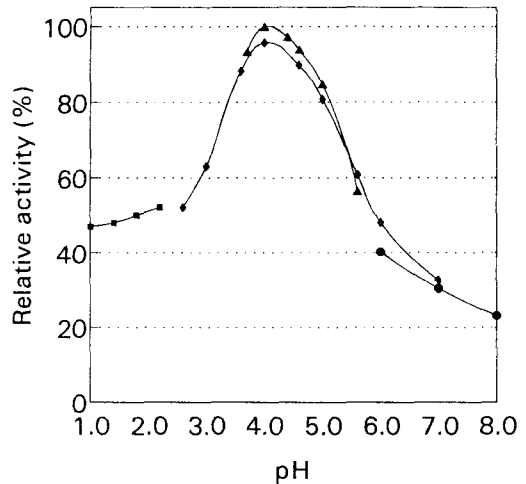


Fig. 8. Effect of pH on the activity of exo-polygalacturonase (PG-II). -■-; Clark & Lubs buffer, -◇-; McIlvaine buffer, -△-; Na-acetate buffer, -●-; Phosphate buffer

최적 pH 정제된 endo-polygalacturonase와 부분 정제한 exo-polygalacturonase의 작용 최적 pH를 검토하기 위하여 pH 1.0~8.0까지 각종 완충용액으로 pH 별 효소활성을 검토한 결과는 Fig. 7 및 8과

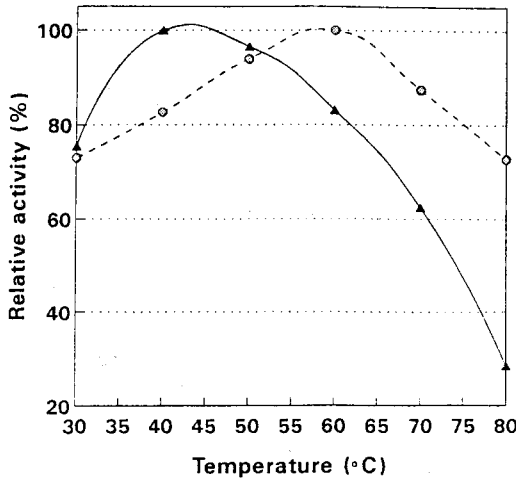


Fig. 9. Effect of temperature on the activity of endo- and exo-polygalacturonase.
 -△-; Endo-PG, -●-; Exo-PG

같다. Endo-polygalacturonase(PG-I)의 활성은 pH 1.0부터 급격히 증가하였고, 4.5 이상에서는 급속히 감소하여 5.5 이상의 pH에서는 거의 활성을 나타내지 않았다. 최대 활성은 pH 4.0이었으며 pH 1.7~5.0 영역에서 60% 이상의 활성을 나타내었다. 이는 *Verticillium albo-atrum*의 최적 pH인 6.5보다는 낮았으나(Wang 등, 1970), 효모(Phaff 등, 1956), 세균(Nasuno 등, 1966), 곰팡이류(Yamasaki 등, 1966; Kaji 등, 1969; Yoshihara 등, 1977) 등의 최적 pH가 4.0~5.0이라고 한 보고와는 유사하였다. Exo-polygalacturonase(PG-II)의 활성은 pH 2.5부터 급격히 증가하였고, 5.0 이상에서는 급속히 감소하는 경향을 나타냈다. 최대 활성은 endo-polygalacturonase(PG-I)와 마찬가지로 pH 4.0이었으며 pH 3.0~5.5 범위에서 60% 이상의 활성을 나타내었다. Kimura 등(Kimura 등, 1974)은 *Acrocyldrium* sp.의 exo-polygalacturonase 최적 pH가 4.5, Hara 등(1984)은 *Aspergillus niger*가 생산하는 exo-PG I과 exo-PG II의 최적 pH가 각각 3.8과 4.8이었다고 보고한 바 있다.

최적 온도 본 효소들의 작용 최적 온도를 검토하기 위하여 여러 온도에서 효소활성을 비교한 결과는 Fig. 9와 같다. Endo- 및 exo-polygalacturonase는 최적 온도에서 약간 차이를 나타내었는데 exo-polygalacturonase가 endo-polygalacturonase보

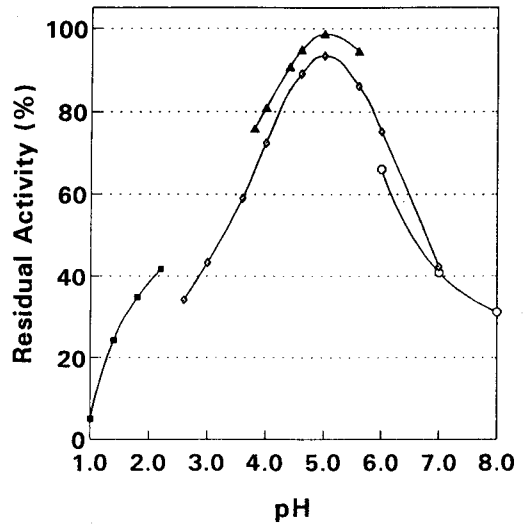


Fig. 10. pH stability of endo-polygalacturonase (PG-I).
 -■-; Clark & Lubs buffer, -◇-; McIlvaine buffer, -△-; Na-acetate buffer, -●-; Phosphate buffer

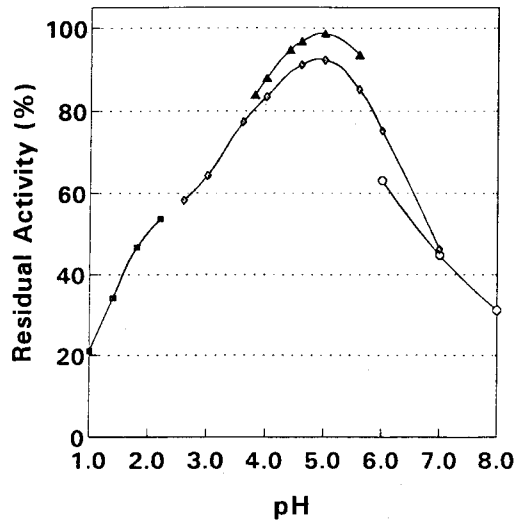


Fig. 11. pH stability of exo-polygalacturonase (PG-II).
 -■-; Clark & Lubs buffer, -◇-; McIlvaine buffer, -△-; Na-acetate buffer, -●-; Phosphate buffer

다 더 고온에서 반응하였다. Endo-polygalacturonase(PG-I)는 40°C 에서 높은 활성을 나타내었고, 32~62°C 범위에서 80% 이상의 활성을 유지하여

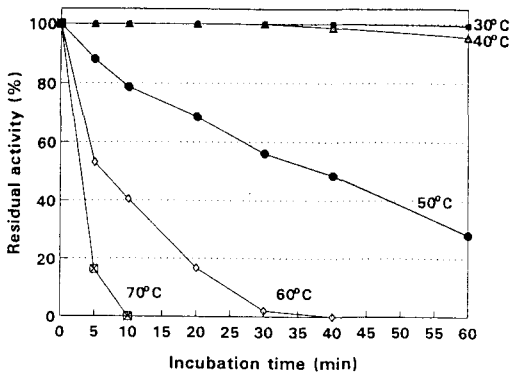


Fig. 12. Thermal stability of endo-polygalacturonase (PG-I).

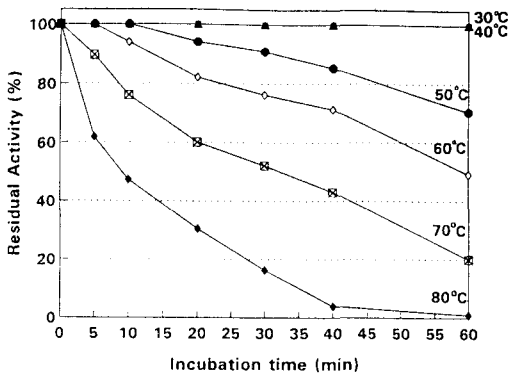


Fig. 13. Thermal stability of exo-polygalacturonase (PG-II).

*Coniothyrium diplodiella*와 유사(Endo, 1964)하였으나 *Aspergillus niger*(55°C)보다는 약간 낮은 경향이 있었다(Hara 등, 1983). Exo-polygalacturonase(PG-II)는 60°C에서 최고의 활성을 나타내었고 40~75°C 범위에서 80% 이상의 활성을 나타내어 *Aspergillus niger*의 경우와 유사하였다(Hara 등, 1984).

pH 안정성 본 효소들의 pH 안정성을 검토하기 위하여 각종 완충용액에서 40°C에서 30분간 incubation 한 후 잔존하는 효소활성을 비교한 결과는 Fig. 10 및 11과 같다. Endo-polygalacturonase(PG-I)를 각 pH 별로 40°C에서 30분간 보존하였을 때 pH 5.0 부근에서 가장 안정하였으며 pH 4.0~6.0 범위에서는 80% 이상의 잔존활성을 유지하였다. 완충용액의 종류에 따라서는 McIlvaine buffer보다도 sodium acetate buffer에서 안정성이 더 컸다. Exo-polygala-

Table 2. Substrate specificity of polygalacturonase from *Ganoderma lucidum*

Substrates (1%)	Relative activity (%)	
	Endo-PG	Exo-PG
Apple pectin	100	100
Citrus pectin	89.6	85.6
Pectic acid	97.3	38.6

cturonase(PG-II)의 경우도 endo-polygalacturonase (PG-I)와 거의 유사하여 pH 3.5~5.5 범위에서 80% 이상의 잔존활성을 유지하였으며, 산성 측에서 endo-polygalacturonase보다 안정성이 약간 높은 경향이였다. 양 효소 모두 pH 5.0에서 가장 안정한 활성을 유지하였다. 이는 *Coniothyrium diplodiella*와 *Aureobasidium pullulans*가 4.0~6.0 범위의 pH에서 비교적 안정하였다는 보고와 유사한 경향이였다 (Endo, 1964; Sakai, 1985).

열 안정성 본 효소들의 열 안정성을 검토하기 위해 효소액을 여러 온도에서 보존하면서 경시적으로 그 활성을 비교한 결과는 Fig. 12 및 13과 같다. Endo-polygalacturonase(PG-I)를 40°C 이하의 온도에서 30분간 방치하였을 때 효소활성의 저하는 거의 나타나지 않았으나 그 이상의 온도에서는 급격한 감소를 나타내어 50°C에서 40분, 60°C에서 5분내에 50%의 활성이 실활되었다. 반면에 exo-polygalacturonase(PG-II)는 endo-polygalacturonase보다 열에 대한 안정성이 비교적 우수하여 40°C 이하의 온도에서는 효소활성이 거의 저하되지 않았으나 60°C 이하의 온도에서는 50% 이상의 잔존활성을 나타낸 반면 70°C에서는 30분, 80°C에서는 10분 이상에서 50% 이상의 효소가 실활되었다. Ishii 등(1972)은 *Aspergillus japonicus*가 생산하는 endo-polygalacturonase는 65°C, 10분에 활성이 완전 실활되었으며, Sakai 등(1985)은 *Aureobasidium pullulans*의 endo-polygalacturonase가 40°C 이하의 온도에서는 안정 하였으나 75°C, 30분에서는 대부분의 활성이 실활 되었다고 보고한 바 있다. *Aspergillus niger*의 endo-polygalacturonase는 45°C 까지, exo-polygalacturonase는 50°C 까지는 열에 안정하다고 보고(Hara 등, 1983; Hara 등, 1984)된 바 있다.

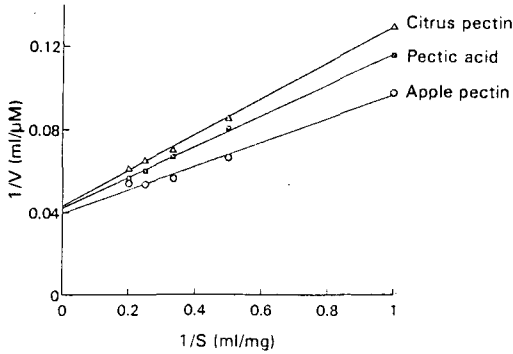


Fig. 14. Determination of Km value of *Ganoderma lucidum* endo-polygalacturonase (PG-I) for apple pectin, citrus pectin and pectic acid.

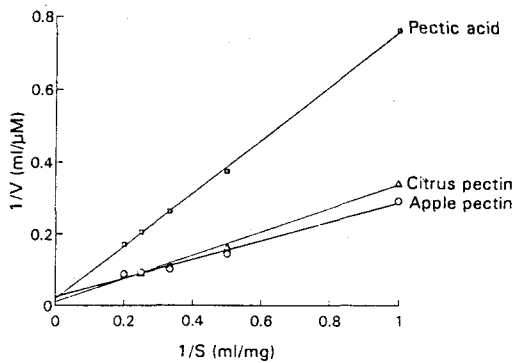


Fig. 15. Determination of Km value of *Ganoderma lucidum* exo-polygalacturonase (PG-II) for apple pectin, citrus pectin and pectic acid.

기질 특이성 Polygalacturonase의 기질 특이성을 검토하기 위하여 1%의 apple pectin, citrus pectin, pectic acid 용액을 기질로 사용하여 기질 특이성을 조사한 결과는 Table 2와 같다. Endo-polygalacturonase는 apple pectin과 pectic acid에서 높은 특이성을 나타내었으나 citrus pectin에는 비교적 특이성 낮았던 반면 exo-polygalacturonase는 pectic acid에 특이성이 극히 저조하여, 본 효소들의 최적 기질은 apple pectin으로 나타났다. Apple pectin은 고 methoxyl pectin(esterification degree ca. 90%)(Endo, 1965)으로, *Ganoderma lucidum*이 생산하는 polygalacturonase들은 고 methoxyl pectin에 친화성이 높은 endo-polymethylgalacturonase(endo-PMG) 및 exo-polymethylgalacturonase(exo-PMG)로 추정되

Table 3. Effect of salts on polygalacturonase activity

Salts	Conc. (mM)	Relative activity (%)	
		Endo-PG	Exo-PG
None	0	100	100
NaCl	50	105	100
	100	109	98
CaCl ₂	1	124	101
	5	136	113
	10	121	115
MgSO ₄	1	109	100
MnSO ₄	1	122	100
CuSO ₄	1	69	76
ZnSO ₄	1	90	86
FeSO ₄	1	103	100
Pb-acetate	1	92	57

었다.

기질 농도의 영향 Endo- 및 exo-polygalacturonase의 기질로서 apple pectin, citrus pectin, pectic acid를 0.2 M sodium acetate buffer(pH 4.0)에 0~5 mg/ml의 농도로 가하여 endo- 및 exo-polygalacturonase 활성을 측정하고 기질의 농도와 활성도의 관계를 Lineweaver-Burk 방법(Lineweaver 등, 1934)에 따라 plot 한 결과는 각각 Fig. 14 및 15와 같다. *Ganoderma lucidum*이 생산하는 endo-polygalacturonase의 apple pectin, citrus pectin, pectic acid에 대한 Km 치는 각각 1.44, 2.01, 1.78 mg/ml, Vmax 치는 25.5, 23.1, 23.5 μM/ml이었으며, exo-polygalacturonase의 apple pectin, citrus pectin, pectic acid에 대한 Km 치는 각각 10.6, 31.8, 35.0 mg/ml, Vmax 치는 41.3, 98.8, 52.5 μM/ml이었다.

금속 ion의 영향 각종 금속 ion이 endo- 및 exo-polygalacturonase의 효소활성에 미치는 영향을 검토하기 위하여 NaCl 50 mM과 100 mM, CaCl₂ 1~10 mM, 기타 금속 ion은 1 mM 농도로 첨가한 결과는 Table 3과 같다. Ca⁺⁺ ion과 Mn⁺⁺ ion은 endo-polygalacturonase에서, Ca⁺⁺ ion은 exo-polygalacturonase에서 각각 효소활성을 증대시켰던 반면, Cu⁺⁺, Zn⁺⁺, Pb⁺⁺ ion 등은 효소활성을 감소

시켰다.

본 효소의 활성화에 가장 큰 촉진 효과를 나타내었던 Ca^{++} ion의 경우 1 mM이나 10 mM보다도 5 mM 농도에서 효소의 활성화에 가장 큰 촉진 효과를 나타내었다. 각종 미생물이 생산하는 polygalacturonase의 활성화에 미치는 금속 ion들의 영향을 살펴보면 *Erwinia caratovora*의 polygalacturonase는 Na^+ , K^+ , NH_4^+ ion에 의해 촉진되었던 반면 Ca^{++} , Mg^{++} , Ba^{++} ion은 촉진 효과가 없었으며 (Nasuno 등, 1966), *Verticillium albo-atrum*의 endo-polygalacturonase는 Hg^{++} , Cu^{++} ion에 의해 활성이 저해되었으며(Wang 등, 1970), *Trichosporon penicillatum*의 endo-polygalacturonase는 Ag^{++} , Ca^{++} , Co^{++} , Cu^{++} , Hg^{++} ion에 의해 저해되고 K^+ , Pb^{++} ion에 의해 촉진되었으며(Sakai 등, 1982), *Galactomyces reessii*는 Ag^{++} , Ba^{++} , Ca^{++} , Cd^{++} , Cu^{++} , Hg^{++} , Hg^+ ion에 의해 저해되는(Sakai 등, 1984) 등, 같은 polygalacturonase인 경우에도 미생물의 종류에 따라 상당한 차이를 나타내고 있다. 그러나 이 등(1976)과 정(1978)은 우리나라에서 수집한 *Aspergillus* sp.로부터 생산된 endo-polygalacturonase가 Ca^{++} , Mn^{++} ion에 의해 활성이 촉진되었다는 보고와는 유사한 경향이였다.

摘 要

*Ganoderma lucidum*이 생산하는 polygalacturonase의 유용활용 방안을 위한 효소의 특성을 연구하기 위하여 버섯배양물로부터 효소를 생산하고 정제하여 그 특성을 검토한 결과는 다음과 같다.

Endo-polygalacturonase는 배양여액으로부터 ammonium sulfate 침전, Biogel P-100, DEAE-cellulose, Sephadex G-150 column chromatography에 의하여 순차적으로 정제되었고, Sephadex G-150 column chromatography에서 re-gel filtration까지 실시한 결과 specific activity가 892 unit/mg protein로 배양여액보다도 약 56배의 정제도를 나타냈으며, exo-polygalacturonase는 ammonium sulfate 침전, Biogel P-100, DEAE-cellulose column chromatography까지 부분정제한 결과 9.2배의 정제도를 나타냈다. SDS polyacrylamide gel에서 전기영동을 실시한 결과 단일 band를 나타냈으며, 분자량

은 54,000 dalton이었다. Endo-polygalacturonase와 exo-polygalacturonase는 citrus pectin이나 pectic acid보다 apple pectin에 친화도가 높았으며, Lineweaver-Burk plot로부터 계산된 apple pectin에 대한 K_m 치는 각각 1.44와 10.6 mg/ml이었다. 이 두 효소의 작용 최적 pH는 4.0이었으나 pH 안정성에서는 endo-polygalacturonase는 pH 4.0~6.0에서, exo-polygalacturonase는 pH 3.5~5.5 범위에서 안정하였다. 효소반응 최적 온도는 endo-polygalacturonase는 40°C이었으나 exo-polygalacturonase는 60°C에서 최대의 활성을 나타냈고 열안정성도 exo-polygalacturonase가 endo-polygalacturonase보다 더 높은 온도에서도 안정하였다. 또한 endo-polygalacturonase는 Ca^{++} ion과 Mn^{++} ion에, exo-polygalacturonase에는 Ca^{++} ion에 의해 효소반응이 촉진되었다.

參考文獻

- Endo, A. 1964. Studies on pectolytic enzymes of molds, Part IX. Purification and properties of endo-polygalacturonase II. *Agr. Biol. Chem.* **28**: 543-550.
- Endo, A. 1965. Studies on pectolytic enzymes of molds, Part XIV. Properties of pectin in apple juice. *Agr. Biol. Chem.* **29**: 137-143.
- Endo, A. and Y. Miura. 1961. Studies on pectolytic enzymes of molds, Part I. Survey of enzyme-producing microorganisms by fruit juice clarification. *Agr. Biol. Chem.* **25**: 382-388.
- Fennema, O. R. 1985. Ed. "Food chemistry", Marcel Dekker Inc., New York p 439-441.
- Hara, T., J. Y. Lim, Y. Fujio and S. Ueda. 1983. Purification and properties of endo-polygalacturonase of *Aspergillus niger* cultured in the medium containing satsuma mandarin peel. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* **30**: 610-617.
- Hara, T., J. Y. Lim, Y. Fujio and S. Ueda. 1984. Purification and some properties of exo-polygalacturonase from *Aspergillus niger* cultured in the medium containing satsuma mandarin peel. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* **31**: 581-586.
- Ishii, S. and T. Yokotsuka. 1972. Purification and properties of endo-polygalacturonase from *Aspergillus japonicus*. *Agric. Biol. Chem.* **36**: 1885-1893.
- Kaji, A. and T. Okada. 1969. Purification and properties of an unusually acid-stable endo-polygalacturo-

- nase produced by *Corticium rolsii*. *Arch. Biochem. Biophys.* **131**: 203-209.
- Kimura, H. and S. Mizushima. 1974. Induction of pectinases in *Acrocyndrium*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **20**: 33-45.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* **227**: 680-685.
- Lineweaver, H. and D. Burk. 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.* **56**: 658-666.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Nasuno, S. and M. P. Starr. 1966. Polygalacturonase of *Erwinia carotovora*. *J. Biol. Chem.* **241**: 5298-5306.
- Phaff, H. J. and A. L. Demain. 1956. The unienzymatic nature of yeast polygalacturonase. *J. Biol. Chem.* **218**: 875-884.
- Roboz, E., R. W. Barratt and E. L. Tatum. 1952. Breakdown of pectic substances by a new enzyme from *Neurospora*. *J. Biol. Chem.* **195**: 459.
- Sakai, T. and A. Takaoka. 1985. Purification, crystallization and some properties of endo-polygalacturonase from *Aureobasidium pullulans*. *Agric. Biol. Chem.* **49**: 449-458.
- Sakai, T. and S. Yoshitake. 1984. Purification and some properties of a protopectin-solubilizing enzyme from *Galactomyces reessii* strain L. *Agric. Biol. Chem.* **48**: 1941-1950.
- Sakai, T., M. Okushima and M. Sawada. 1982. Some properties of endo-polygalacturonase from *Trichosporon penicillatum* SNO-3. *Agric. Biol. Chem.* **46**: 2223-2231.
- Sakai, T., M. Okushima and S. Yoshitake. 1984. Purification, crystallization and some properties of endo-polygalacturonase from *Kluyveromyces fragilis*. *Agric. Biol. Chem.* **48**: 1951-1961.
- Wang, M. C. and N. T. Keen. 1970. Purification and characterization of endo-polygalacturonase from *Verticillium albo-atrum*. *Arch. Biochem. Biophys.* **141**: 749-757.
- Yamasaki, M., T. Yasui and K. Arima. 1966. Studies on pectic enzymes of microorganisms. Part II. Production of endo-polygalacturonase with *Aspergillus saitoi*. *Agric. Biol. Chem.* **30**: 142-148.
- Yoshihara, O., T. Matsuo and A. Kaji. 1977. Purification and properties of acid pectinesterase from *Corticium rolsii*. *Agric. Biol. Chem.* **41**: 2335-2341.
- 島英治. 1985. 食品工業と酵素. 朝倉書店 p 73-81.
- 畑中千歳, 小澤潤二郎. 1968. 酵素によるペクチン酸の分解 (第6報) ペクチン質のDEAE-セルロースカラムクロマトグラフィ-(2). *日本農藝化学會誌* **42**: 645-650.
- 川端晶子, 澤山茂. 1977. ペクチンの分子量と分子の廣がり. *日本農藝化学會誌* **51**: 15-21.
- 이봉기, 유주현, 양응, 조세훈, 유준. 1976. *Aspergillus* sp.가 생산하는 pectic enzyme에 관한 연구-제2보 endo-polygalacturonase의 정제와 물리·화학적인 성질. *한국산업미생물학회지* **4**: 63-69.
- 정만재. 1978. 식품공업에 이용되는 효소의 생산과 제품화에 관한 연구. *한국식품과학회지* **10**: 237-244.