

Aspergillus속이 생산하는 Polygalacturonase의 분리 및 특성

차원섭[†] · 김진구 · 박준희 · 오상룡 · 천성숙* · 조영제*

상주산업대학교 식품공학과

*영남대학교 식품가공학과

Separation and Enzymological Characteristics of Polygalacturonase by *Aspergillus* sp.

Woen-Suep Cha[†], Jin-Ku Kim, Jun-Hee Park, Sang-Yong Oh, Sung-Sook Chun* and Young-Je Cho*

Dept. of Food Science and Technology, Sangju Polytech. University, Sangju 742-170, Korea

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

Abstract

Aspergillus sp. SB-2704 was selected for its strong polygalacturonase activity among various strain of mold found in soil. It was found that production of polygalacturonase reached to maximum when the wheat bran medium containing 1% polypepton, 1% glucose, and 0.2% FeSO₄ were cultured for 3 days at 35° C. Polygalacturonase was purified 20.90 fold from *Aspergillus* SB-2704. The purification procedures include ammonium sulfate treatment, gel filtration on Sephadex G-150 and DEAE-cellulose ion exchange chromatography. Yield of the enzyme purification was 4.34%. Purified enzyme was confirmed as a single band by the polyacrylamide gel electrophoresis. When the purified enzyme was applied to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, the molecular weight was estimated to be 36,000. The optimum pH for the enzyme activity was 5.5 and optimum temperature was 50° C. The enzyme is stable in acidic condition. The activity of purified enzyme was inhibited by Pb²⁺, Hg²⁺ and Ba²⁺, whereas activated by Cu²⁺, Mn²⁺, Mg²⁺ and Fe²⁺. The activity of polygalacturonase was inhibited by the treatment with maleic anhydride, iodine, and EDTA. The result indicate the possible involvement of histidine and metal ion at active site.

Key words : *Aspergillus* sp., polygalacturonase

서 론

펙틴질은 과일의 가공과정 중에 착즙율을 저하시킬 뿐만 아니라 과즙속에서 단백질과 중합체를 형성하여 혼탁현상, 가열취 또는 짙은 착색의 원인이 되기 때문에 이러한 펙틴질을 분해시켜 착즙 및 청징효과를 높여주기 위해 펙틴질 분해 효소들이 이용되어 왔다(1-5). Pectic enzyme이 가지는 산업적 중요성 때문에 효소의 대량생산이 요구되게 되었고, 여러 가지 효소원 중에서 곰팡이가 생성하는 효소에 대해 Phaff 등(6,7), Endo(8-10)이 연구를 진행하여 왔다. 이들 pectic enzyme 중 과실 주스의 점도를 저하시키며 과즙에 혼탁성을 주는 펄프 입자를 응집하여 이를 여과, 제거함으로써 과즙의 청

징화를 가능하게 한다고 알려진(11-13) polygalacturonase(PG)는 곰팡이와 몇몇 박테리아와 효모에 의해 생성되는 것으로 알려져 있고, 대부분의 식물 병원균에 의해서도 생성된다고 보고하였으며(14-17) 특히 Endo(8-10)와 Rexova 등(18-20)은 polygalacturonase의 청징화 기작과 효소의 작용양상에 깊은 관심을 가지고 연구를 진행하였다. PG는 식물체로는 토마토, 감 등에 많이 함유되어 있고 곰팡이의 경우 *Aspergillus*속, *Penicillium*속, *Rhizopus*속 등 많은 종류의 균주들이 이 효소를 분비한다고 알려져 있으며(21) *Aspergillus* sp.이 생산하는 효소에 대해서는 박과박(22), 유 등(23), 이 등(24), Lanzarini와 Zamorani 등(25) 많은 연구자들이 PG에 대해 연구하였으나 아직 뚜렷하게 밝혀진 것은 많지 않으며(26), 또한 산업화에 유용한 균주 개발은 계속 진행되어야 할

[†]To whom all correspondence should be addressed

실정이다.

본 연구에서는 토양으로부터 기존의 polygalacturonase 생산균주 보다 활성이 강한 균주를 개발하고자 활성균주를 탐색하고 이 균주가 생성하는 효소를 정제하고 그 특성을 조사하여 산업화에의 이용 가능성을 살펴보았다.

재료 및 방법

균의 분리 및 선별

대구와 경북 지역의 토양과 부식토를 균원 시료로 하여 평판 배양법에 의해 potato dextrose agar를 사용하여 순수분리를 실시하였다. 즉, 토양 일부를 멸균수에 혼합시키고 그 상등액 1ml를 평판 배양기에 접종시킨 후 배양하였다. 배양된 균주를 다시 멸균수를 이용 10단 희석법으로 희석하고 희석액 1ml를 다시 평판배양기에 배양하여 순수분리 하였다. 분리된 균주의 효소활성을 측정하여 활성이 강한 3균주를 1차 선별하고 2차 효소 생성능 실험에서 가장 우수한 1균주를 선별하였다. 선별된 균주는 Czapek-Dox agar로 1개월에 1회씩 세대배양하여 보관하였다.

조효소액의 조제

효소 생산을 위하여 수분이 60% 정도 함유된 밀기울 배지에 균사체를 3 백금이 접종하여 35°C에서 약 3일간 배양시킨 뒤 8배의 0.05M acetate buffer (pH 5.0)를 가하여 4°C에서 24시간 동안 교반하여 효소를 추출하고 8000×g에서 30분간 원심분리한 후 상정액을 모아 여과하여 조효소액으로 사용하였다.

단백질의 정량

표준단백질로써 bovine serum albumin을 사용하여 Lowry 등 (27)의 방법에 의하여 측정하였다.

효소활성 측정

Polygalacturonase는 기질인 polygalacturonic acid를 분해하여 oligomer를 생성하므로 이 환원기의 증가량을 측정하여 polygalacturonase의 역가를 측정하였다. 환원기의 정량은 DNS법 (28)으로 실시하였으며, 이때 효소단위는 효소액 1ml가 1분간에 1μmole의 환원기(α-D-galacturonic acid)를 생성하는 것을 1 unit로 정하였다.

Polygalacturonase의 정제

Polygalacturonase의 정제는 조효소액에 황산암모늄

을 70% 포화되게 가하여 효소단백질을 응집, 침전시켰으며, 이 침전물들을 원심분리기로써 회수하고 4°C에서 0.05M acetate buffer (pH 5.0)에 대하여 투석을 행하였고 투석한 후 효소액 중의 불용성 물질은 원심분리하여 제거하였다. 투석한 효소액을 DEAE-cellulose 칼럼(3×50cm)에 주입시킨 후 약 1.5배의 상기 buffer로 비흡착 단백질을 씻어낸 다음 흡착된 단백질을 0~1.0M NaCl의 linear salt gradient로 용출하였다. 이때의 유속은 0.68ml/min이었고 10ml씩 분획하였으며, 활성분획은 모아서 농축하였다. DEAE-cellulose를 통과시킨 효소액을 농축시켜 상기 buffer로 평형화된 Sephadex G-150 column(2×90cm)에 주입하여 동일 buffer로 3.5ml/10min의 유속으로 7ml/tube씩 분획하였다. 활성단백은 모아서 동결건조하여 전기영동을 실시하였으며 전기영동은 Davis법 (29)에 의해 7.5% polyacryl-amide gel로써 튜브당 3mA로 실온에서 약 4시간 동안 수행되었다. 전기영동 후 gel은 1% amido black 10B로써 염색하였고, 7% acetic acid로 탈색하였다.

분자량 측정

전기영동에 의한 분자량 측정은 Weber와 Osborn (30)의 방법에 의하여 실시하였으며 정제된 효소는 1% SDS, 1% 2-mercaptoethanol을 함유한 0.01M phosphate buffer (pH 7.0)에 용해한 후 전기영동하였다. 전개 후 R_i치에 따라 표준곡선을 이용하여 분자량을 측정하였다. 이때 표준품으로는 bovine serum albumin (MW : 66000), egg albumin (MW : 45000), pepsin (MW : 34700), trypsinogen (MW : 24000), β-lactoglobulin (MW : 18400), lysozyme (MW : 14300)을 사용하였다.

효소학적 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 35°C에서 1시간 동안 반응시켜 효소활성을 측정하였다.

pH 안정성

효소의 pH에 대한 안정성을 조사해 보기 위하여 McIlvaine buffer용액 (pH 2~8) 1ml에 효소액 0.2ml를 가하고 4°C에서 24시간 동안 방치한 뒤 최적 pH인 5.5로 조절하고 잔존활성을 조사하였다.

온도에 의한 영향

효소활성에 미치는 온도의 영향을 알아보기 위하여 효소반응 온도를 10~70°C 까지 변화시키면서 1시간 동안 반응시켜 활성을 측정하였다.

열안정성

Polygalacturonase의 열안정성을 조사하기 위하여 20~70°C의 범위에서 10~60분간 열처리한 후 활성을 측정하였다.

금속이온의 영향

금속이온이 효소활성에 미치는 영향을 검사하기 위하여 pH 5.5로 맞춘 증류수에 각종 금속이온들을 20 mM 되게 제조하여 금속이온 용액 0.2ml에 효소액 0.2 ml를 넣어 교반하고 30°C에서 1시간 동안 방치한 뒤 효소활성을 조사하였다.

활성저해제의 영향

효소활성에 영향을 미치는 화학적 저해제 중 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), *p*-chloromercuribenzoic acid (PCMB), bromoacetic acid (BA), 2,4-dinitrophenol (DNPI) H₂O₂, maleic anhydride (MA), iodine, tris 및 mercuric chloride를 선정하여 10mM의 농도로 효소액에 첨가하여 30°C에서 1시간 동안 전 처리한 후 잔존활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

Polygalacturonase 생성균주 분리 및 동정

경북지역에서 채취한 토양으로부터 분리한 45균주를 대상으로 PG활성을 가지는 3균주를 1차 선정하여

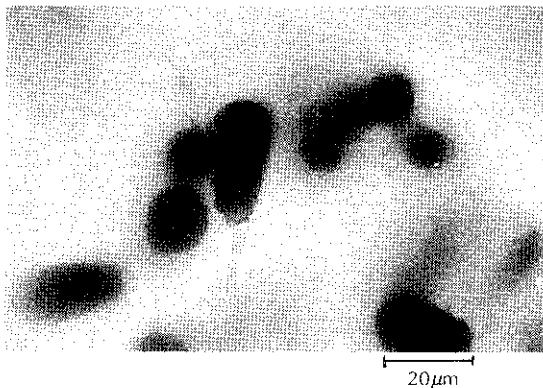


Fig. 1. Morphology of *Aspergillus* sp. SB-2704 (×400).

펙틴질 분해력이 가장 강한 1균주를 분리, 선정하였으며, Koneman 등의 방법 (31)에 따라 Czapeck-Dox-agar에 slide culture 하면서 현미경으로 관찰한 결과 Fig. 1과 같이 취락은 암녹색을 띠고 있었고 가근은 없으며 균사에는 격벽이 있고 foot cell에서 분지된 conidiophore의 선단은 비대하여 vesicle이 되고 그 끝에 타원형의 conidia가 달려 있는 것으로 보아 이 균주는 *Aspergillus* sp.으로 추정되어 이를 *Aspergillus* sp. SB-2704로 명명하고 본 실험에 사용하였다.

배양시간 및 첨가 영양원에 따른 polygalacturonase의 생성

Aspergillus sp. SB-2704의 균주에 의한 polygalacturonase의 생성은 수분이 60% 함유된 밀기를 배지로서 사용하여 35°C에서 배양시간별로 측정한 결과 Fig. 2와 같이 배양시작 후 3일이 지났을 때 효소활성이 가장 높았으며 5일이 지났을 때는 활성이 감소되기 시작하여 약 60% 까지 감소하는데 이 결과는 유 등⁽³²⁾이 *Aspergillus* sp.의 polygalacturonase가 3일 배양 후 활성이 최대에 도달하였다는 보고와 유사하였다. 탄소원, 질소원과 무기염 등이 polygalacturonase 활성에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 1%의 탄소원, 1%의 질소원과 0.2%의 무기염을 밀기울배지 제조시 수용액 상태로 첨가시킨 뒤 배양시켜 효소활성을 측정한 결과 Table 1과 같이 탄소원 중 glucose와 fructose에 의해서 활성이 촉진되었다. 이 같은 결과는 유 등⁽³²⁾이 *Verticillium* sp.의 polygalacturonase가 glucose를 첨가하였을 때 활성이 촉진되었다는 보고와 유사하였다. 또한 polypepton, albumin, (NH₄)₂SO₄와 NH₄Cl에 의해 가장 많은 효소활성 증대

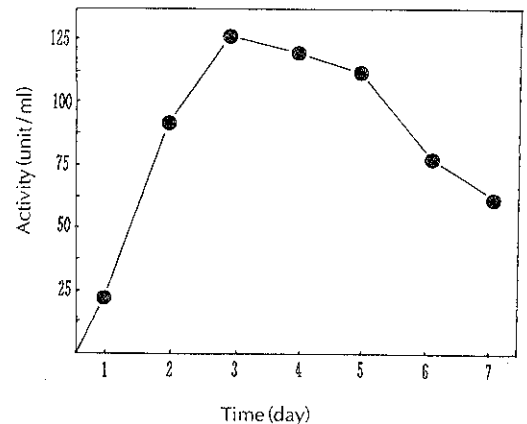


Fig. 2. Effect of culture time on production of polygalacturonase at 35°C in wheat-bran medium by *Aspergillus* sp. SB-2704.

Table 1. Production of polygalacturonase by carbon, nitrogen and inorganic salt

Source	Component	Relative activity (%)
Control	Wheat-bran medium	100.00
Carbon (1%)	Galactose	86.99
	Arabinose	77.69
	Glycerin	67.76
	Lactose	83.24
	Glucose	137.43
	Fructose	121.71
	Sorbitol	64.39
	Mannitol	76.17
	Maltose	85.65
	Mannose	73.48
Nitrogen (1%)	Starch	89.39
	Casein	106.69
	Polypepton	145.25
	Glycine	97.53
	Albumin	126.43
	Urea	83.23
	Ca(NO ₃) ₂	96.13
	(NH ₄) ₂ C ₂ O ₄	110.15
	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	100.45
	(NH ₄)HPO ₄	107.93
Inorganic salt (0.2%)	NH ₄ C(CH ₂ OH) ₃	94.39
	KNO ₃	-
	NH ₄ Cl	142.89
	(NH ₄) ₂ SO ₄	135.27
	MgSO ₄	91.35
	FeSO ₄	105.15
	KH ₂ PO ₄	90.63
	NaCl	69.69
	K ₂ HPO ₄	76.71
	NaH ₂ PO ₄	74.77
MgCl ₂	93.62	

가 관찰되었다.

Polygalacturonase의 정제

조효소액을 황산암모늄으로 염석하고 탈염한 후 DEAE-cellulose ion exchange chromatography한 결과 Fig. 3에서와 같이 5개의 분획이 검출되었으며 약 0.37M NaCl 정도에서 활성단백질이 용출되었다. DEAE-cellulose ion exchange chromatography하여 분리한 활성단백은 Amicon membrane filter (PM-10)로 농축하여 Sephadex G-150 column을 이용하여 동일 buffer로 gel filtration 하였으며, 그 결과 Fig. 4에서와 같이 2개의 분획 중 1개에서 활성이 검출되었다. 정제된 효소단백질을 Davis법 (29)에 따라 polyacrylamide gel로써 disc gel electrophoresis 행하여 본 결과 Fig. 5에서와 같이 단일

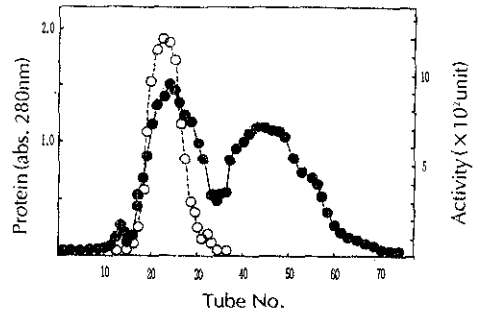


Fig. 4. Sephadex G-150 gel filtration of polygalacturonase from *Aspergillus* sp. SB-2707.

● : Protein ○ : Activity

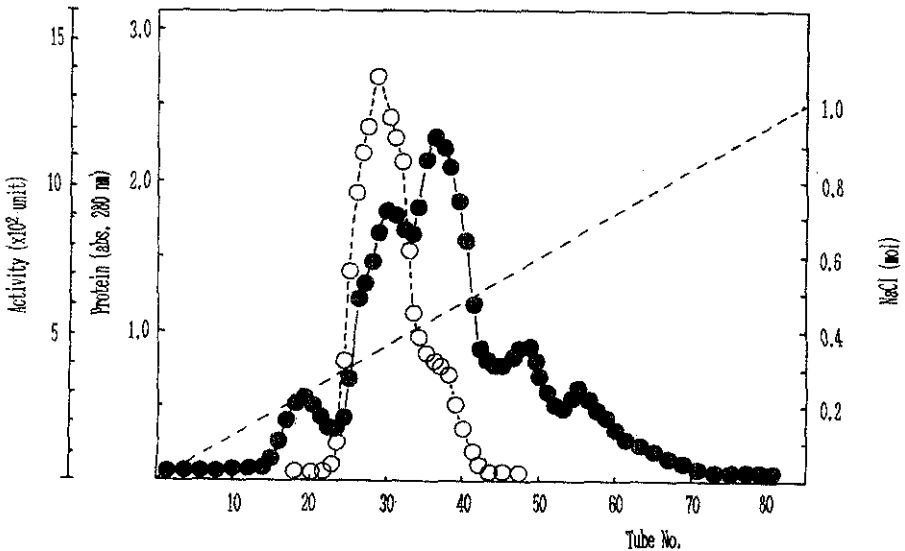


Fig. 3. DEAE-cellulose ion exchange chromatography of polygalacturonase from *Aspergillus* sp. SB-2707.

● : Protein ○ : Activity

밴드로 나타났다. 상기와 같이 정제한 결과 효소의 비활성 역가는 1003.41unit/mg이었으며, 정제배수는 20.90 배였다(Table 2). 이 등(24)은 *Aspergillus* sp.의 PG를 정제한 결과 비활성역가가 464.3U/mg으로 보고하였고, Lanzarini와 Zamorani(25)가 *Aspergillus niger*의 PG가 374.6U/mg의 비활성 역가를 가진다는 것과 비교할 때 본 효소의 활성이 약 3배 가량 강한 것으로 측정되었다.

분자량 측정

Weber와 Osborn의 방법(30)에 따라 SDS-polyacrylamide 전기영동에 의한 분자량 측정 결과는 Fig. 6에 나타난 바와 같이 36,000 정도의 단일단백이 확인되어 이 효소는 monomeric 상태로 존재하는 것으로 추측되었다. 이 등(24)은 *Aspergillus* sp.의 polygalacturonase가 35000, 유 등(32)은 *Verticillus* sp.의 polygalacturonase가 38000이라고 보고하였으며 본 균주가 생성하는 poly-

galacturonase와 비슷하였다.

Polygalacturonase의 특성

pH에 의한 영향

pH가 효소의 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 pH 2~8 까지의 pH 영역에서 효소활성을 측정한 결과 Fig. 7에서 나타난 바와 같이 효소의 최적 pH는 5.5이었다. 이는 이 등(24)이 *Aspergillus* sp.의 polygalacturonase가 산성의 영역에서 최적 활성을 가진다는 보고와 유사하였다.

pH 안정성

효소의 pH에 대한 안정성을 조사해 보기 위하여 효소를 pH 2~8 까지의 범위에서 4°C, 24시간 동안 방치한 뒤 최적 pH인 5.5로 조절하고 잔존활성을 조사한 결과는 Fig. 7과 같다. *Aspergillus* sp. SB-2704가 생산하는 polygalacturonase는 그 안정범위가 pH 4~7 까지로 비교적 안정한 편이었다. 이는 이 등(24)의 *Aspergillus* sp. 보다는 pH 안정범위가 넓었으며 Kazuo 등(33)의 *Stereum purpureum*의 polygalacturonase 안정범위가 pH 3.5~8.5

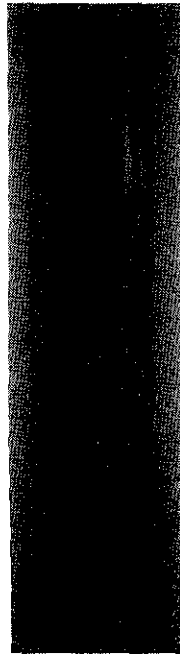


Fig. 5. Polyacrylamide gel electrophoresis of polygalacturonase from *Aspergillus* sp. SB-2704.

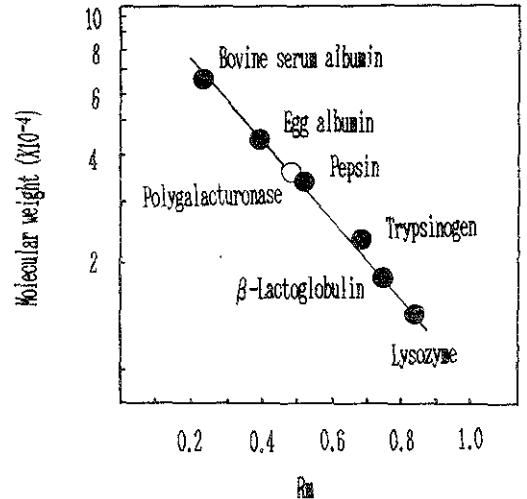


Fig. 6. The calibration curve for determination of molecular weight of polygalacturonase by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

Table 2. Purification procedure of polygalacturonase from *Aspergillus* sp. SB-2704

	Total protein(mg)	Total activity(lunit)	Specific activity (unit / mg)	Yield (%)	Purification fold
Crude enzyme solution	4312.30	207033.52	48.01	100.00	1.00
Ammonium sulfate	97.34	19412.52	199.43	9.38	4.15
DEAE-cellulose	18.73	13596.60	725.93	6.57	15.12
Sephadex G-150	8.96	8990.55	1003.41	4.34	20.90

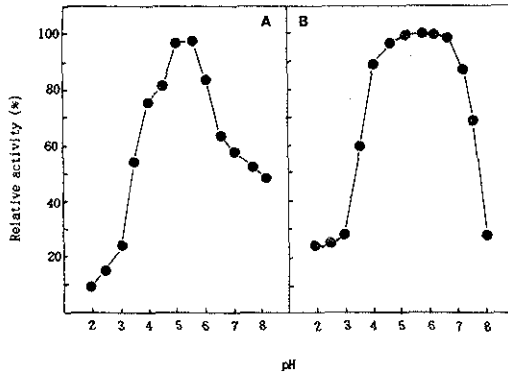


Fig. 7. Effect of pH on the activity (A) and pH stability (B) of polygalacturonase from *Aspergillus* sp. SB-2704.

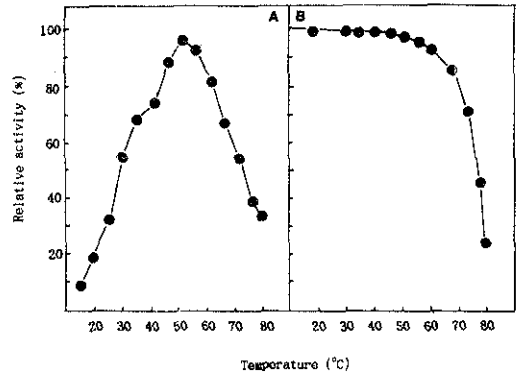


Fig. 8. Effect of temperature on the activity (A) and temperature stability (B) of polygalacturonase from *Aspergillus* sp. SB-2704.

까지라고 보고한 것과 유사하였다. 본 효소가 산성에서 안정하다는 점은 과실의 pH가 산성인 점을 감안하면 과실쥬스 가공과 관련된 산업적 이용가치가 있다고 판단되었다.

온도에 의한 영향

효소활성에 미치는 온도의 영향을 알아보기 위하여 효소반응 온도를 10~70°C 까지 변화시키면서 1시간 동안 반응시켜 활성을 측정된 결과는 Fig. 8과 같으며 50°C에서 반응시켰을 때 그 상대활성이 가장 높게 나타났다. 이는 이 등(24)이 *Aspergillus* sp.의 polygalacturonase 최적 반응온도가 40°C라고 보고한 것 보다 높았다.

열 안정성

Polygalacturonase의 열 안정성을 조사하기 위하여 20~70°C의 범위에서 10~60분간 열처리한 결과 Fig. 8에서와 같이 60°C 까지는 활성감소가 별로 없었으나 70°C에서는 약 30%의 효소활성 감소가 관찰되었으며 박과 박(22)은 *Aspergillus niger*의 polygalacturonase가 30°C이하의 온도에서 안정하였고 이 등(24)은 *Aspergillus* sp.의 polygalacturonase가 30°C 이상의 온도에서는 불안정하였다고 보고한 것에 비하면 본 효소는 열에 상당히 안정하였다.

금속이온의 영향

금속이온이 효소활성에 미치는 영향을 검사하기 위하여 각종 금속이온들과 효소액을 혼합하고 30°C에서 1시간 동안 방치한 뒤 효소활성을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 본 효소는 Na⁺, Fe²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺와 Cu²⁺에 의해서 활성이 촉진되며, Hg²⁺, Ba²⁺와 Pb²⁺ 등에 의해서 약간의 저해를 받았다. 이는 *Rhizopus* sp.의 polygal-

Table 3. Effect of metal ion on the activity of polygalacturonase produced by *Aspergillus* sp. SB-2704

Ion (10mM)	Metal	Relative activity (%)
Control	-	100.00
Cu ²⁺	CuSO ₄ · 5H ₂ O	109.27
Zn ²⁺	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	103.60
Ca ²⁺	CaCl ₂	98.31
Pb ²⁺	Pb(CH ₃ COO) ₂	61.22
Mn ²⁺	MnSO ₄ · H ₂ O	111.76
Hg ²⁺	HgCl ₂	70.03
Mg ²⁺	MgSO ₄ · 7H ₂ O	124.58
Fe ²⁺	FeSO ₄	116.14
Ba ²⁺	BaCl ₂ · 2H ₂ O	62.32
Na ⁺	NaCl	105.56

The reaction mixture, consisted of 0.5ml enzyme solution and 0.5ml metal ion solution (20mM), was incubated at 35°C for 5hrs and the residual activity were assayed

acturonase가 Hg²⁺, Ba²⁺, Pb²⁺ 등에 의해 저해되었다는 정 등(26)의 보고와 비슷하였다.

활성저해제의 영향

금속과 결합하여 chelate를 형성하는 EDTA, 효소분자 중 SH기의 가역적 저해제로 쓰이는 PCMB, 효소분자 중의 SH기와 alkyl화 되어 불가역적으로 저해하는 BA, 말단 아미노기와 친화력이 강하여 이 말단 아미노기가 효소활성단인 경우 활성을 저해하게 되는 2,4-DNP, methionine과 cysteine의 modifier인 H₂O₂, N-terminal amino group과 histidine의 imidazole group을 저해하는 MA, tryptophan의 phenolic hydroxyl group, histidine의 imidazole group을 저해하는 iodine 및 화학적 저해제로 tris와 mercuric chloride를 선정하여 효소액에 첨가하여 30°C에서 1시간 동안 전 처리한 후 잔존활성을 측정된 결과 Table 4와 같이 maleic anhydride와 io-

Table 4. Effect of various inhibitors on the activity of polygalacturonase produced by *Aspergillus* sp. SB-2704

Inhibitor (10mM)	Relative activity (%)
Control	100.0
2,4-Dinitrophenol	95.3
Ethylenediaminetetraacetic acid	63.7
Mercuric chloride	82.9
Maleic anhydride	46.4
Trishydroxymethylaminomethane	90.1
Iodine	43.9
Hydrogen peroxide	89.4
p-Chloromercuribenzoic acid	91.2
Bromoacetic acid	92.6

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

dine에 의해서 활성저해가 관찰되었으며, EDTA에 의해서도 활성저해가 발생하였다. 이같은 결과로 보아 본 효소의 active site에 histidine잔기가 존재하며 그 histidine잔기의 imidazole group이 효소활성에 관여함을 추측할 수 있었다. Westhead (34)와 Rexova (18-20)가 fungal source의 polygalacturonase의 활성단에 histidine 잔기가 존재하며 그 histidine 잔기의 imidazole기가 효소활성에 필수적이라고 보고한 바를 뒷받침하여 주었다. 또한 EDTA에 의한 효소활성이 저해되는 것으로 보아 금속이온이 active site에 관여하는 것으로 추측되었다.

요 약

Aspergillus sp. SB-2704의 polygalacturonase생성을 위한 최적 조건은 수분이 60% 함유된 밀기를 배지에 1% polypepton, 1% glucose, 0.2% FeSO₄를 첨가하여 3일간 배양시 최대활성을 나타내었으며, Sephadex G-150을 사용한 gel filtration과 DEAE-cellulose에 의한 이온교환 크로마토그래피를 통하여 이 효소를 20.90배 정제할 수 있었고, 수율은 4.34%였다. 정제효소는 polyacrylamide gel 전기영동에 의하여 단일밴드로 확인되었으며 분자량은 SDS-polyacrylamide 전기영동에 의하여 36,000 정도로 측정되었다. *Aspergillus* sp. SB-2704가 생산하는 polygalacturonase의 최대활성을 위한 pH는 5.5, 최적온도는 50°C였으며, 산성의 pH에서 안정성을 보였고, 온도에 의한 안정성은 65°C였으며 70°C 이상에서는 급격한 효소단백질의 불활성화가 진행되었다. 금속이온 중 Na⁺, Cu²⁺, Mn²⁺, Mg²⁺와 Fe²⁺이온에 의해 활성이 촉진되고 Pb²⁺, Hg²⁺, Ba²⁺이온 등은 효소활성을 저해하였다. 효소저해제 중 maleic anhydri-

de, iodine와 EDTA 등에 의해 효소활성이 저해되어 효소분자 중의 histidine의 imidazole기와 금속이온이 효소활성에 관여함이 입증되었다.

감사의 글

이 논문은 상주산업대학교 학술연구 조성비에 의한 것이며 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Brady, C. J., Mac Alpine, G., Mcglasson, W. D. and Ueda, Y. : Polygalacturonase in tomato fruits and induction of ripening. *Austr. J. Plant Physiol.*, **9**, 171 (1982)
2. Brown, M. R. and Ough, C. S. : A comparison of activity and effect of two commercial pectic enzyme preparations on white grape musts and wines. *Amer. J. Enol. Viticult.*, **32**, 272 (1981)
3. Buescher, R. W. and Hobson, G. E. : Role of calcium and chelating agents in regulating the degradation of tomato fruits tissue by polygalacturonase. *J. Food Biochem.*, **6**, 147 (1982)
4. Minquez, M. M. Z. : Evolution of pectic components and pectinolytic enzymes during the ripening and storage of Hojiblanca olives. *Grasasy Acetics*, **33**, 327 (1982)
5. Pressey, R. and Avants, J. K. : Pectic enzymes in long keeper tomatos. *Holt. Sci.*, **17**, 398 (1982)
6. Rokhlenko, S. G., Vanyushkina, L. D., Panikhina, S. I. and Tokhmakhchi, N. S. : Effects of enzyme preparations on wine stability. *Appl. Biochem. Microbiol.*, **16**, 220 (1980)
7. Kawabe, S. and Usami, S. : Immobilization of papain with citrus inner-peel pectin. *J. Jap. Soc. Food Sci. Tech.*, **30**, 140 (1983)
8. Wordsack, C., Baum, F., Leuchtenberger, A. and Ruttloff, H. : Production of pectolytic enzyme. German Democratic Republic Patent, p.149 (1983)
9. Phaff, M. J. and Luh, B. S. : The preparation of pure di and trigalacturonic acid. *Arch. Biochem. Biophys.*, **36**, 231 (1952)
10. Phaff, H. J. and Dcmain, A. I. : The unienzymatic nature of yeast polygalacturonase. *J. Biol. Chem.*, **218**, 855 (1956)
11. Endo, A. : Studies on pectolytic enzymes of mold. Part 8. Purification and properties of endopolygalacturonase I. *Agric. Biol. Chem.*, **28**, 535 (1964)
12. Endo, A. : Studies on pectolytic enzymes of mold. Part 4. Purification and properties of endopolygalacturonase II. *Agric. Biol. Chem.*, **28**, 543 (1964)
13. Endo, A. : Studies on pectolytic enzymes of mold. Part 5. Purification and properties of endopolygalacturonase III. *Agric. Biol. Chem.*, **28**, 551 (1964)
14. Basham, H. G. and Bateman, D. F. : Relationship cell death in plant tissue treated with a homogeneous endo-

- pectate lyase to cell wall degradation. *Physiol. Plant Pathol.*, **5**, 249(1975)
15. Beuchet, L. R. and Rice, S. L. : *Byssochlamys* sp. and their importance in processed fruits. *Advan. Food Res.*, **25**, 237(1979)
 16. 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)
 17. 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)
 18. Rexova, B. L., Omelkova, J. and Veruovic, B. : Endopolygalacturonase immobilized on a porous poly 2,6-dimethyl- β -phenyleneoxide. *Biotechnology Letters*, **5**, 737(1983)
 19. 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)
 20. Rexova, B. L., Omelkova, J., Filka, K. and Kocourek, J. : Selective isolation of endo-D-galacturonase of *Aspergillus niger* based on interaction with D-galactosiduronic acid covalently bound to polyhydroalkyl methacrylate. *Carbohydr. Res.*, **122**, 269(1983)
 21. Rombouts, F. M. and Pilnik, W. : In "Critical Reviews in Food Technology" Vol. 3, Chem. Rubber Pub. Co., Cleveland, p.1(1972)
 22. 박경빈, 박관화 : *Aspergillus niger*가 생산하는 endopolygalacturonase의 분리와 특성. *한국식품과학회지*, **16**, 41(1984)
 23. 유주현, 이봉기, 양령, 조세훈, 유준 : *Aspergillus* sp.가 생산하는 pectic enzyme에 관한 연구(제 1보). *한국산업미생물학회지*, **4**, 57(1976)
 24. 이봉기, 유주현, 양용, 조세훈, 유준 : *Aspergillus* sp.가 생성하는 pectic enzyme에 관한 연구. *한국산업미생물학회지*, **4**, 63(1976)
 25. Lanzarini, G. and Zamorani, A. : Some simple methods for the purification of pectic enzymes from *Aspergillus usarii*. *J. Sci. Food Agric.*, **26**, 197(1975)
 26. 정영건, 조영제, 천성숙, 최청 : *Rhizopus oryzae* CJ-2114가 생성하는 polygalacturonase의 특성 및 작용양상. *한국영양식품학회지*, **21**, 195(1992)
 27. Lowry, O. H., Rosebrogh, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265(1951)
 28. Miller, G. L. : Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, **31**, 426(1959)
 29. Davis, B. J. : Disc electrophoresis II. Method and application of human serum protein. *Ann New York Acad. Sci.*, **121**, 404(1964)
 30. Weber, K. and Osborn, M. : The reliability of molecular weight determination sodium dodesyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406(1969)
 31. Koneman, E. W., Roberts, G. D. and Wright, S. E. : Partical laboratory mycology. The Williams and Wilkins Company, Baltimore, p.20(1979)
 32. 유주현, 진효상, 변우량, 오두환 : *Verticillium* sp.가 생성하는 protopectin-용해효소에 관한 연구. *한국산업미생물학회지*, **10**, 197(1982)
 33. Kazuo, M., Okuno, T. and Sawai, K. : Purification and properties of endopoly-galacturonase I from *Stereum purpureum*, a factor inducing silver-leaf symptoms on apple trees. *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 1111(1985)
 34. Westhead, E. F. : Photooxidation with Rose Bengal of a critical histidine residue in yeast enolase. *Biochemistry*, **4**, 2139(1965)

(1995년 3월 2일 접수)