

Bacillus subtilis EK11로부터 Protopectinase 생산을 위한 배지성분의 영향

이대희 · 박은경 · 문철환 · 하정욱 · 이승철 · 황용일*
경남대학교 생명과학부

Effect of Medium Composition on Protopectinase Production from *Bacillus subtilis* EK11. Lee, Dae-Hee, Eun-Kyung Park, Chul-Hwan Mun, Jung-Uk Ha, Seung-Cheol Lee, and Yong-Il Hwang*. Division of Life Sciences, Kyungnam University, Masan 637-701, Korea – Protopectinases (PPases) are heterologous group of enzymes that degrade pectin from the insoluble protopectin which is constituent of the middle lamella and primary cell wall of higher plants by restricted depolymerization. From the previous report[6], enzymatically separated plant cells, which are produced from plant tissues by PPases treatment, showed well-conserved cellular components with their rigid cell wall and this characteristic is applicable to preparation of novel food material. The purpose of this study is to investigate the effect of medium composition on PPase production from *Bacillus subtilis* EK11 which was selected as a PPase producer. Various carbon sources and concentrations on PPase production were studied and corn starch at 0.7% was the most effective for production of PPase. Among the nitrogen sources, yeast extract was the most effective for PPase production and the effect of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ was notable as inorganic nitrogen source. Inorganic compounds such as KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $\text{Na}_3\text{-citrate} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and MgSO_4 were optimized for PPase production. PPase activity was inhibited by the addition of Ba^{2+} or Zn^{2+} . The optimal medium for PPase production was devised: 0.7% corn starch, 0.3% yeast extract, 1.4% KH_2PO_4 , 0.6% K_2HPO_4 , 0.1% $\text{Na}_3\text{-citrate} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and 0.02% MgSO_4 . PPase production by using the optimum medium was carried out with shaking cultivation at 37°C. The maximum PPase activity of 256 unit/ml could be obtained after the cultivation for 48hrs. The activity was increased about 2.2 times than the activity, 112 unit/ml, in basal medium.

Key words : *Bacillus subtilis*, protopectinase, medium optimization

식물 세포의 형태 유지 및 특성에 중요한 역할을 하는 세포벽은 cellulose, hemicellulose, pectin질 등의 탄수화물로 구성되어 있다[3, 4]. 이들 탄수화물들을 구성하는 당당류는 β -결합으로 연결되어 있어 자연상태에서 대체로 분해되기 힘들다, 이들의 대사에 관여하는 효소들이 발견되어 효소를 이용한 산업적 이용이 가능하여졌다. 식품산업에서의 경우, cellulase를 이용한 주류제조공정의 개선[10], pectinase를 이용한 과즙의 청징화[5], 세포벽 분해효소 혼합물을 이용한 수용성 고형분 함유 식품의 제조공정의 효율성 제고[12] 등에 응용되고 있다.

Pectin질은 식물조직 중에 다양하게 분포하며, galacturonic acid와 methoxyl기로 이루어지는 heteropolysaccharide로서, 세포벽에서 유효작용 또는 점착역할을 하는 것으로 알려져 있으며[11], 과일의 숙성[6], 식품가공에서의 역할[13, 22], 기능성 식이섬유로의 이용 등이 연구되어 있다. Pectin질은 화학적, 물리적 성상으로 protopectin, pectin (pectinate), pectic acid(pectate) 등으로 나눌 수 있으며, 서로간에 밀접한 관계를 갖는다.

세포벽에서 protopectin의 화학적 구조에 관한 모델은

Fig. 1과 같이 제안되어지며, 중성당 측쇄의 유리를 통해 pectin이 유리되는 것으로 알려져 있다. Protopectin은 불용성으로 pectin의 모체가 되며, 식물세포에 있어 세포와 세포간의 중엽부(middle lamella)의 주성분을 이루고 있으며, 식물체가 숙성됨에 따라 일부가 가용성 pectin으로 전환된다. Protopectin은 pectin에 비해 매우 큰 분자량을 가지며, 카르복시기와 세포벽의 다른 성분들의 수산기와 에스터 결합을 형성한다. Protopectin을 제한 가수분해하여 수용성 펙틴을 생산하는 효소를 pectin-releasing enzyme, protopectin-solubilizing enzyme, 또는 protopectinase(PPase)라고 명명하고 있으며[14], Fig. 1에서와 같은 작용기작과 종류가 보고되고 있다[16-18, 21]. 이러한 작용기작을 통해 식물 조직을 구성하는 세포들 사이에 형성되어 있는 protopectin을 가수분해하면 각각의 세포로 유리되어질 수 있다. PPase의 기원은 다양하며 특히 식물의 부패에 관여하는 미생물에 많이 존재하는 것으로 알려져 있으며, cellulose와 결합된 펙틴의 중성당 결사슬을 분해하거나, homogalacturonan 부분을 분해한다[16-18, 21]. PPase는 최근 식품산업과 의약 산업에 이용되는 pectin생산[8, 15], 식물성 식품소재에 대한 단세포화[9], 식물세포의 protoplast 생산[7] 등에 응용성을 가진다고 보고되었으며, 그 중요성은 점차 증가하고 있다.

본 연구는 *B. subtilis* EK11균주가 생산하는 PPase를 산

*Corresponding author

Tel. 82-551-249-2685, Fax. 82-551-243-8133

E-mail: yihwang@kyungnam.ac.kr

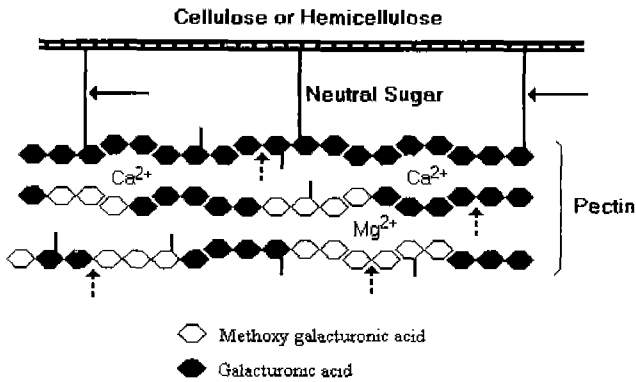


Fig. 1. Schematic illustration of the structure of protopectin and reaction site of A-type(↑) and B-type(←) of PPase.

업적으로 이용하기 위하여 이 균주가 이용하는 배지성분이 PPase 생산에 미치는 영향을 살펴보고 PPase의 생산성을 증가시키기 위하여 최적배지성분 및 농도를 구하고자 한다.

재료 및 방법

사용 균주 및 배지

본 연구에 사용한 균주는 *B. subtilis* IFO12113로부터 변이유도에 의하여 선발된 *B. subtilis* EK11을 사용하였다. 먼저 모균주를 LB배지(0.5% yeast extract, 1% trypton, 1% sodium chloride)에서 배양하여 대수증식기 후기의 세포를 회수하여 nitrosoguanidine으로 40분간 처리한 후에 충분히 수세하였다. 회수된 세포를 LB-arabinogalactan배지에 도말하여 콜로니 주변에 형성된 투명환의 크기로 효소 생산성의 향상을 관찰하였다. 이들 균주 중에서 기본배지[1% glucose, 0.2% (NH₄)₂SO₄, 1.4% KH₂PO₄, 0.6% K₂HPO₄, 0.1% Na₃-citrate · 2H₂O, 0.02% MgSO₄ · H₂O, pH 6.8]에서 배양하여 효소활성이 가장 우수한 균주로써 *B. subtilis* EK11을 얻었다. 성장배지로는 LB배지를 사용하였고 생산용 배지는 상기의 기본배지에서 PPase의 생산성을 높이기 위하여 각 구성성분을 적당하게 변화시켜 영향을 조사하였으며 이들 결과로부터 배지를 조제하였다. 본 실험에 사용한 시약류는 Sigma사(St. Louis, MO, USA) 제품과 기타 1등급 이상의 시약을 사용하였다.

배양조건

B. subtilis EK11의 효소생산을 위한 종배양은 LB 평판 배지 상의 단일 colony를 취하여 성장배지 50 ml가 들어 있는 250 ml 플라스크에 접종한 후 진탕배양기에서 37°C, 180 rpm에서 12시간 동안 배양하였다. 본배양은 종배양액 0.5 ml를 PPase 생산배지가 들어 있는 250 ml 플라스크에 접종하여 배양온도는 37°C, 교반속도는 180 rpm으로 하여 40시간 동안 배양하여 포자수, 생균수, PPase 활성을 측정

하였다.

포자 및 생균수의 측정

포자수(spore number)의 측정은 배양액을 100°C에서 3분 30초 동안 열처리하여 영양세포를 사멸시키고, 멸균수로 희석한 다음, 평판배지(LB)에 0.1 ml씩 분주한 후 37°C에서 24시간 배양 후, 콜로니 형성단위(Colony Forming Unit; CFU)를 측정하여 포자수를 계산하였다. 또한, 배양액을 멸균수로 희석한 다음, 평판배지(LB)에 0.1 ml씩 분주한 후 37°C에서 24시간 배양 후, 콜로니 형성단위(CFU)를 측정하여 전체 균수를 계산하였다.

Protopectinase의 활성측정

효소활성 측정은 Sakai 방법[19]에 따라 50 µg/ml bovine serum albumin을 함유한 40 µM acetate buffer(pH 5.0) 2 ml를 protopectin 10 mg과 혼합하여 37°C, 10분간 방치 후 0.5 ml의 효소용액을 반응혼합액에 첨가하여 37°C, 30분간 반응시켰다. 반응종료 후 Toyo No.2 filter paper로 여과하여 여액을 얻었으며 galacturonic acid의 함량측정은 *m*-hydroxy-diphenyl법[1]에 따라 실시하였다. 1 unit의 PPase는 상기의 조건에서 분당 1 µmole의 galacturonic acid를 생성하는 효소량으로 하였다.

결과 및 고찰

기본배지에서의 PPase의 생산

B. subtilis EK11로부터 PPase 생산 양상을 파악하기 위하여 기본배지에서 배양하여 본 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 세포의 성장은 배양 8시간째 최고에 이르렀고 PPase 활성은 생장곡선의 대수기의 후반에서 활성이 나타나기 시작하여 정지기의 후반부(20 hrs)에서 최대의 활성(112 unit/ml)을 나타내었다. PPase 활성과 포자수의 관계는 비례관계로, PPase 활성은 포자수가 증가되면서 함께 증가하다가 포자수가 최고점에 이르렀을 때 PPase 활성도 가장 높았다. pH의 경우는 조금 증가하였을 뿐 거의 일정하게 유지되었다.

탄소원의 영향

PPase의 생산에 미치는 탄소원의 영향을 알아보기 위하여 기본배지의 glucose 대신 다른 탄소원을 1.0% 되게 첨가하여 배양하면서 PPase의 활성을 비교 검토하였다. 그 결과 Table 1에서 보는 바와 같이 단당류인 glucose, fructose, sucrose는 20시간 배양하였을 경우 PPase의 활성은 112, 83, 102 unit/ml로 측정되었으며, 다당류인 starch류는 40시간 배양하였을 경우 약 134, 120, 118 unit/ml로 비교적 높은 활성을 나타내었다. 여기에서 특히 효소생산에 대한 탄소원의 영향은 단당류나 이당류의 경우에는 배양초기인 20시간에서 최대의 활성이 관측되었으나 arabinose를 제

Table 1. Effect of 1.0% carbon sources on PPase production from *B. subtilis* EK11

Carbon source	20 h			40 h		
	PPase activity (Unit/ml)	Cell number (Log cfu/ml)	Spore number (Log cfu/ml)	PPase activity (Unit/ml)	Cell number (Log cfu/ml)	Spore number (Log cfu/ml)
Glucose	112.38	8.95	3.22	67.39	7.84	2.93
Fructose	82.94	8.98	3.54	76.75	7.65	2.48
Sucrose	101.87	8.71	3.44	80.67	7.80	2.34
Maltose	112.13	8.63	4.73	95.40	8.17	3.65
Maltodextrin	103.45	8.80	4.28	89.52	8.09	3.2
Dextrin	84.96	8.69	3.63	78.54	7.85	3.60
Galactose	62.27	8.34	3.63	35.11	8.10	6.37
Arabinose	121.66	8.53	3.38	123.45	8.33	5.42
Corn starch	117.90	8.92	4.78	134.16	8.50	4.88
Potato starch	77.88	8.70	6.20	119.54	8.43	6.89
Soluble potato starch	103.72	9.04	5.90	117.50	7.95	5.17

PPase activity, total cell and spore number were measured after the cultivation for 20 h or 40 h at 37°C, 180 rpm in a shaking-flask cultivation.

외한 starch류는 배양 후기인 40시간 부근에서 높은 효소활성을 보였다(결과 미제시). 이는 기질의 이용속도와 관계가 있는 것으로 사료되며 이들 결과로부터 향후의 배지성분에 대한 실험은 배양 중의 20시간과 40시간에서 각각 조사 비교하기로 하였다. Corn starch와 arabinose가 40시간 배양할 때 각각 134 및 123 unit/ml의 높은 PPase 활성을 보여 glucose 40시간째의 대조구에 비하여 약 2배의 효소활성을 나타내었다(Table 1). 위의 결과로 볼 때 *Bacillus*가 이용하기 좋은 단당류 및 이당류의 경우는 20시간 배양시 PPase의 활성이 최고에 달하였으며, 다당류의 경우는 40시간 배양시 높은 활성을 보였다. Fig. 2의 기본배지에서와 같이 포

자수가 많을 때 높은 PPase 활성을 보였다.

최고 활성을 보이는 corn starch와 arabinose를 이용하여 탄소원의 최적 농도를 검토하기 위하여 이들을 glucose와 혼합하여 배양하였다. 이때 Table 2에서 보는 바와 같이 활성이 가장 높게 나온 corn starch에 arabinose를 첨가 시에는 40시간에 80 unit/ml로 활성이 아주 낮게 나왔고, corn starch에 glucose를 첨가한 경우는 1~2 unit/ml로 거의 활성이 나타나지 않았으며 특히, glucose의 농도가 2.0% 이상일 때는 PPase를 거의 생산하지 않았다. Arabinose의 농도가 0.5%이었을 때 PPase의 활성이 127 unit/ml이었으며,

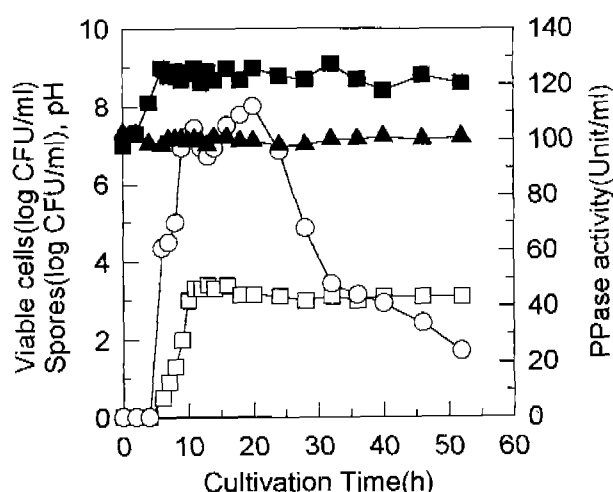


Fig. 2. Time course of PPase production by *B. subtilis* EK11 in basal medium.

Symbol: ■, Viable cells(log CFU/ml); □, Spores(log CFU/ml); ▲, pH; ○, Activity(Unit/ml).

Table 2. Effect of mixed carbon sources on PPase production from *B. subtilis* EK11

Carbon source	Concentration (%)	PPase activity(Unit/ml)	
		20 h	40 h
Arabinose+corn starch	1.0+1.0	ND*	80.11
Arabinose+corn starch	0.5+1.0	ND	80.55
Arabinose	1.5	ND	81.79
Arabinose	1.0	ND	123.45
Arabinose	0.5	ND	127.02
Corn starch	1.0	ND	134.16
Corn starch	0.5	ND	134.12
Glucose+corn starch	1.0+1.0	0.82	0
Glucose+corn starch	0.5+1.0	2.71	0
Glucose	3.0	0	0
Glucose	2.0	0	0
Glucose	1.5	0	30.53
Glucose	1.0	112.38	67.39

*ND means not determined. PPase activity, total cell and spore number were measured after the cultivation for 20 h or 40 h at 37°C, 180 rpm in shaking-flask cultivation.

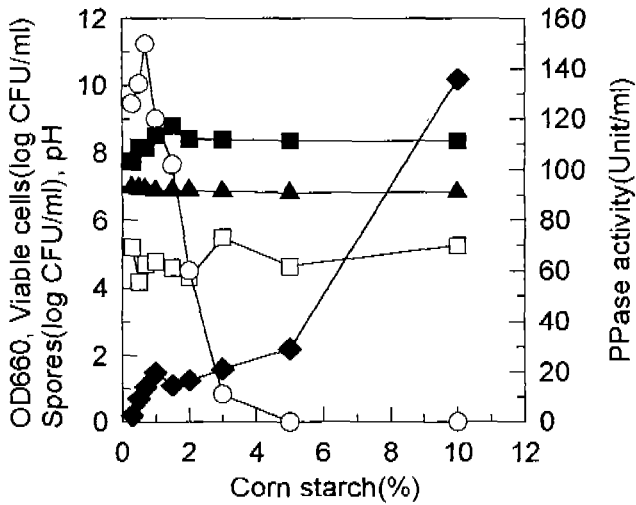


Fig. 3. Effect of corn starch concentrations on the PPase production by *B. subtilis* EK11.

PPase activity, total cell and spore number were measured after the cultivation for 40 h at 37°C, 180 rpm in shaking-flask cultivation. Symbol: ◆, Growth (OD₆₆₀); ■, Viable cells(log CFU/ml); □, Spores(log CFU/ml); ▲, pH; ○, Activity(Unit/ml).

corn starch의 농도가 1.0~0.5%일 때의 PPase의 활성은 각각 134 unit/ml로 경제성을 고려할 때 탄소원으로 0.5% corn starch가 바람직하다(Table 2). 본 실험에서 glucose에 의한 균체증식과 arabinose 또는 corn starch에 의한 PPase의 생산을 기대하였으나 효소 생산은 오히려 감소하였다. 그 이유로는 배양후기 잔존 glucose에 의한 catabolite repression으로 추측되며 PPase생산을 위해서는 단순한 균체농도의 증가보다는 잔존 탄소원 농도와 생육중의 균체의 포자형성 시기가 적절해야 할 것으로 사료된다. 이후의 실험에서는 단일 탄소원으로 corn starch를 선택하여 농도

별로 PPase 생산량, 생균수와 포자수를 조사하였다(Fig. 3). Corn starch의 농도가 2.0% 이상의 농도에서는 PPase활성이 60 unit/ml 이하로 낮았고, 1.0~0.3%에서는 높은 활성(120~150 unit/ml)을 보였다. 본 실험에서는 가장 높은 활성(150 unit/ml)을 보인 0.7% corn starch를 최적농도로 결정하였다.

질소원의 영향

선정된 탄소원의 최적농도를 기본배지로 하여 PPase의 생산에 미치는 질소원의 영향을 조사하였다. 기본배지의 (NH₄)₂SO₄를 포함한 여러 무·유기 질소원을 0.2% 되도록 첨가하여 실험하였다. Table 3에서 나타낸 것과 같이 40시간 배양시 무기 질소원인 (NH₄)₂SO₄, (NH₄)₂HPO₄, (NH₄)H₂PO₄, NH₄NO₃, NaNO₃, KNO₃ 중에서 NH₄H₂PO₄가 가장 낮은 활성(43 unit/ml)을 보였고 (NH₄)₂SO₄가 가장 높은 활성(150 unit/ml)을 보였다. 40시간 배양시 유기 질소원인 yeast extract, peptone, soybean flour, trypton, casein 중에서는 peptone이 가장 낮은 활성(40 unit/ml)을 보였고 yeast extract가 가장 높은 활성(168 unit/ml)을 보였다. 여기에서 NH₄H₂PO₄와 peptone의 경우 배양 40시간에서의 효소활성이 다른 질소원과 비교하여 비교적 낮은 활성치를 보이고 있으며 이는 이들 분해물이 효소생성과 직접 또는 간접적인 영향이 있는 것으로 사료되나 정확한 원인의 규명을 위해서는 발효 생리적인 변화에 대한 추가적인 실험이 요구된다.

Table 3의 결과로부터 배양 중의 포자의 증가는 PPase생산량에 큰 영향을 미침을 알 수 있다. 즉, (NH₄)₂SO₄와 yeast extract의 경우 40시간의 배양에서 포자수가 4.73 및 5.13(log CFU/ml)으로서 다른 질소원보다 많음을 알 수 있다.

가장 높은 활성을 보인 (NH₄)₂SO₄와 yeast extract을 농

Table 3. Effect of nitrogen sources(0.2%) on PPase production from *B. subtilis* EK11

Nitrogen source	20 h			40 h		
	PPase activity (Unit/ml)	Cell number (Log CFU/ml)	Spore number (Log CFU/ml)	PPase activity (Unit/ml)	Cell number (Log CFU/ml)	Spore number (Log CFU/ml)
(NH ₄) ₂ SO ₄	116.53	8.92	5.18	150.17	8.18	4.73
(NH ₄) ₂ HPO ₄	82.94	7.34	4.19	124.47	7.43	4.06
NH ₄ H ₂ PO ₄	101.87	8.04	3.67	42.50	7.33	3.61
NH ₄ NO ₃	98.78	7.92	3.85	104.94	7.31	3.53
NaNO ₃	98.70	7.48	3.30	120.06	8.28	3.49
KNO ₃	84.55	7.45	2.38	119.92	6.84	2.69
Peptone	104.05	7.60	2.82	40.38	7.63	3.49
Soytone	117.62	7.63	1.90	120.52	7.44	3.52
Yeast extreat	121.66	8.18	5.00	168.11	8.54	5.13
Soybean flour	97.35	7.60	4.71	125.61	8.13	4.05
Trypton	114.85	8.48	3.57	137.04	7.69	3.74
Casein	101.55	7.71	1.90	80.53	7.22	2.48

PPase activity, total cell and spore number were measured after the cultivation for 20 h or 40 h at 37°C, 180 rpm in shaking-flask cultivation.

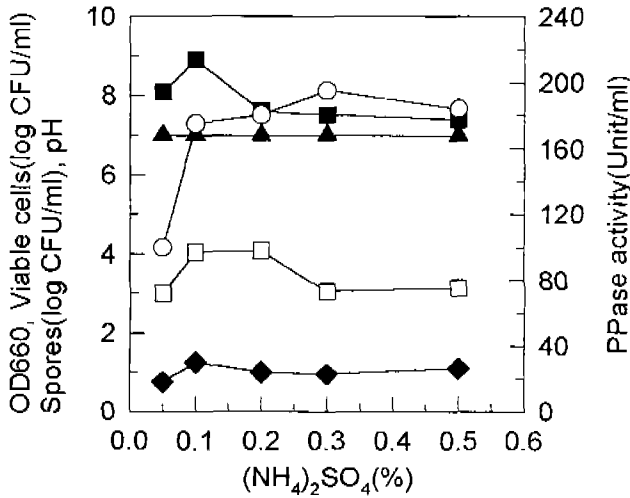


Fig. 4. Effect of (NH₄)₂SO₄ concentrations on the PPase production by *B. subtilis* EK11.

PPase activity, total cell and spore number were measured after the cultivation for 40h at 37°C, 180 rpm in shaking-flask cultivation. Symbol: ◆, Growth(OD₆₆₀); ■, Viable cells(log CFU/ml); □, Spores(log CFU/ml); ▲, pH; ○, Activity(Unit/ml).

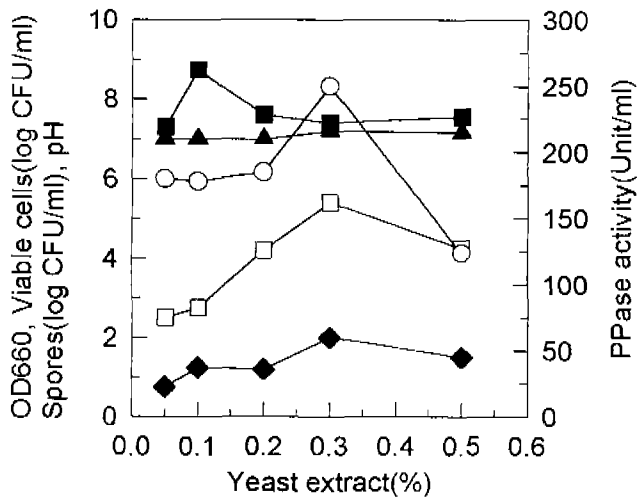


Fig. 5. Effect of yeast extract concentrations on the PPase production by *B. subtilis* EK11.

PPase activity, total cell and spore number were measured after the cultivation for 40 h at 37°C, 180 rpm in shaking-flask cultivation. Symbol: ◆, Growth (OD₆₆₀); ■, Viable cells(log CFU/ml); □, Spores(log CFU/ml); ▲, pH; ○, Activity(Unit/ml).

도별로 PPase 생산량을 조사한 결과는 Fig. 4와 Fig. 5에 나타내었다. 각각 0.3% (NH₄)₂SO₄에서 195 unit/ml, 0.3% yeast extract에서 250 unit/ml로 가장 높은 활성을 보였다. (NH₄)₂SO₄의 경우 0.1~0.5% 농도에서 PPase 생산량에 많은 차이는 보이지 않았으나, yeast extract는 농도별로 차이를 보였다. 이는 yeast extract의 한 성분이 많을 경우 PPase 생산을 저해하는 것으로 여겨진다.

Table 4는 PPase 생산에 최적농도인 0.3%를 기초로 두

Table 4. Effect of mixed nitrogen sources on PPase production by *B. subtilis* EK11

Nitrogen source	Concentration (%)	PPase activity (Unit/ml)	
		20 h	40 h
Yeast extract	0.3	200.13	250.29
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.3	165.09	195.09
Yeast extract+(NH ₄) ₂ SO ₄	0.1+0.5	42.08	87.12
Yeast extract+(NH ₄) ₂ SO ₄	0.2+0.3	60.69	86.55
Yeast extract+(NH ₄) ₂ SO ₄	0.3+0.2	48.38	61.16
Yeast extract+(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5+0.1	34.73	100.57
Yeast extract+(NH ₄) ₂ SO ₄	0.2+0.2	42.46	76.24
Yeast extract+(NH ₄) ₂ SO ₄	0.3+0.3	42.46	79.10
Yeast extract+(NH ₄) ₂ SO ₄	0.2+0.4	45.41	62.88
Yeast extract+(NH ₄) ₂ SO ₄	0.2+0.5	33.79	53.05
Yeast extract+soybean flour	0.1+0.5	57.54	95.23
Yeast extract+soybean flour	0.2+0.3	97.61	130.15
Yeast extract+soybean flour	0.3+0.2	93.13	143.61
Yeast extract+soybean flour	0.5+0.1	84.54	120.42
Yeast extract+soybean flour	0.2+0.2	79.48	67.08
Yeast extract+soybean flour	0.3+0.3	104.10	208.78
Yeast extract+soybean flour	0.2+0.5	89.60	208.68

PPase activity, total cell and spore number were measured after the cultivation for 20h or 40h at 37°C, 180 rpm in shaking-flask cultivation.

질소원을 혼합하여 첨가했을 때 PPase의 생산량을 조사하였다. 먼저 yeast extract와 (NH₄)₂SO₄을 각 농도별로 혼합하여 PPase의 활성을 본 결과 yeast extract나 (NH₄)₂SO₄ 중 어느 한가지 성분만을 첨가했을 때 보다 훨씬 낮은 활성을 보였다. Sakai 등[20]은 유기질소원으로 soybean flour를 첨가했을 때 PPase의 생산성이 향상되었다고 보고하였다. 그래서 본 실험에서도 yeast extract와 soybean flour를 혼합하여 PPase 생산을 살펴보았다. 그 결과, Table 4에 나타낸 것과 같이 0.2%의 yeast extract와 0.5% soybean flour를 혼합하여 첨가했을 때 비교적 높은 활성(209 unit/ml)을 보였으나, 0.3% yeast extract만을 첨가했을 때 가장 높은 활성(250 unit/ml)을 보였다. 따라서 질소원의 최적 농도는 0.3% yeast extract를 첨가했을 경우이나, 공업적 생산을 위해서는 무기질소원인 (NH₄)₂SO₄가 좋을 것으로 사료된다(Table 4).

무기염류와 저해제의 효과

선정된 탄소원과 질소원의 농도를 최적화한 배지를 이용하여 다양한 무기 염류들을 각각 20 mM농도로 첨가하여 그 영향을 살펴보았다(Table 5). 40시간의 배양 결과에서 보면 MgCl₂와 FeCl₃는 별 영향을 주지 않았지만 그 외의 금속 이온은 PPase 생산을 저해하는 것으로 나타났다. 특히, BaCl₂, ZnCl₂의 경우 확실한 저해현상을 보였다. 전반

Table 5. Effect of metal ions and inhibitors on PPase production by *B. subtilis* EK11

Metal ions and inhibitor sources	Concentration (mM)	PPase relative activity(%)	Cell number (Log(CFU/ml))	Spore number (Log(CFU/ml))
Control	0	100	8.03	5.50
CaCl ₂	20	56.3	8.20	4.03
MgCl ₂	20	85.48	8.52	4.91
BaCl ₂	20	15.39	9.50	4.59
NaCl	20	65.41	8.03	4.25
FeCl ₃	20	98.54	5.85	4.95
ZnCl ₂	20	11.37	5.60	3.56
SnCl ₂	20	53.65	8.26	2.00
NaHAsO ₄	20	11.82	5.00	2.00
<i>o</i> -Phenanthraline	20	0.97	6.20	0.00
NaF	20	93.34	8.24	3.00

PPase activity, total cell and spore number were measured after the cultivation for 20h or 40h at 37°C, 180 rpm in shaking-flask cultivation.

적으로 무기염류의 첨가는 PPase 생산을 저해하는 것으로 나타났다. 이러한 이유는 효소생산의 저해 또는 효소활성의 저해로 생각되며 정확한 원인을 밝히기 위해서는 추가적인 실험이 요구된다.

최적의 탄소원과 질소원을 첨가한 배지에 각 저해제를 20 mM되게 조정하여 활성을 측정하였을 때 NaHAsO₄의 경우 세포 성장을 저해하여 PPase의 생산이 적어졌고 *o*-phenanthraline의 경우 PPase의 생산에 중요한 영향이 있는 포자를 형성하지 않아 낮은 PPase 활성을 보였다. 그러나 NaF의 경우는 세포 성장과 PPase 생산에 큰 영향을 주지 않았다.

최적 배지조성에서 PPase의 생산

이상의 실험에서 최적화된 배지 즉, 0.7% corn starch, 0.3% yeast extract, 1.4% KH₂PO₄, 0.6% K₂HPO₄, 0.02%

MgSO₄ · H₂O, 0.1% Na₃-citrate · 2H₂O를 첨가한 배지에서 생산된 PPase 활성은 Fig. 6에서 보는 바와 같이 기본 배지에서와 유사한 경향을 볼 수 있는데 PPase의 경우는 생장곡선의 대수기의 후반에서 활성이 나타나기 시작하여 20 시간대에서 감소한 후 다시 증가하여 정지기의 후반부에서 최대의 활성이 측정되었다. 기본배지에 비해 생균수와 포자수는 증가하였고 PPase의 활성이 48시간에서 260 unit/ml로 기본배지의 최대활성(20시간)에 비하여 2.2배의 증가를 보였다. pH의 변화는 거의 없었으며 그 양상은 기본배지와 유사하였다.

요 약

PPase는 식물세포 중엽부의 주성분인 protopectin를 분해하여 maceration(죽화: 단세포화)한다. PPase는 대부분의 야채류 및 과일류의 단세포화에 응용 가능하므로 새로운 식품재료로 이용이 가능하다. PPase 생산을 위한 최적 배지 조성을 조사하였다. 탄소원으로는 0.7% corn starch 첨가시 가장 높은 효소생산을 보였으며, 질소원으로는 yeast extract와 (NH₄)₂SO₄가 우수하였고 특히, 0.3% yeast extract 첨가시 가장 높은 효과를 보였다. 전반적으로 금속이온의 첨가는 PPase 생산을 저해하는 것으로 나타났다. 최적 배지 조성은 0.7% corn starch, 0.3% yeast extract, 1.4% KH₂PO₄, 0.6% K₂HPO₄, 0.1% Na₃-citrate · 2H₂O, 0.02% MgSO₄이었다. 본 배지를 효소생산용 배지로 사용할 때 배양 48시간에 가장 높은 PPase 활성인 256 unit/ml 나타났다. 이는 기본배지에서의 PPase 활성 112 unit/ml에 비해 약 2.2배의 증가를 보였다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 핵심기초연구(971-0604-021-2)지

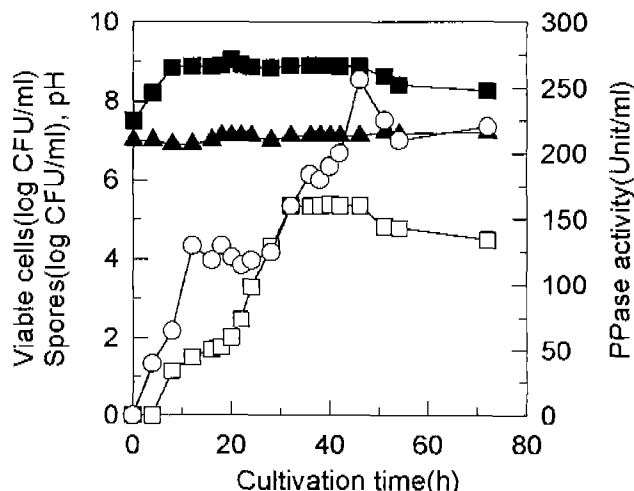


Fig. 6. Time course of PPase production by *B. subtilis* EK11 in the optimized medium.

Symbol: ■, Viable Cells(log CFU/ml); □, Spores(log CFU/ml); ▲, pH; ○, Activity(Unit/ml).

원으로 수행된 결과로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Blumenkrantz, N. and G. Asboe-Hansen. 1973. New method for quantitative determination of uronic acid. *Anal. Biochem.* **54**: 484–489.
2. Fry, S. C. 1988. *The Growing Plant Cell Wall: Chemical and Metabolic Analysis*. Longman Scientific and Technical, New York.
3. Jackman, R. L. and D. W. Stanley. 1995. Perspectives in the textural evaluation of plant foods. *Trends. Food Sci. Technol.* **6**: 187–194.
4. Kertesz, Z. I. 1930. A new method for enzymic clarification of unfermented apple juice. *New York State Agricultural Experiment Station (Geneva) Bull.* No. 689. U.S. Patent No. 1,932,833.
5. Knee, M. 1978. Metabolism of polymethylgalacturonate in apple fruit cortical tissue during ripening. *Phytochemistry* **17**: 1261–1264.
6. Lee, S. C., B. S. Ko, D. H. Lee, and Y. I. Hwang, 1997. Cell separation of vegetable tissues by protopectinase. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **26**: 430–435.
7. Mitsui, T., N. Hashimoto, K. Deguchi, M. Hirano, and I. Igaue. 1990. Isolation of plant mesophyll protoplasts with an endopolygalacturonase from *Trichosporon penicillatum*. *Plant Tissue Cult. Lett.* **7**: 14–18.
8. Miyazaki, H. and K. Terata. 1974. Treatment of waste rind of citrus fruits and extraction of the components. *Shokuhin Kogyo* **17**: 81–87.
9. Nakamura, T., R. Hours, and T. Sakai. 1995. Enzymatic maceration of vegetables with protopectinases. *J. Food Science* **60**: 468–472.
10. Nielsen, E. B. 1971. Brewing with barley and enzymes-A review. *Proc. Eur. Brew. Conv.(Estoril)* **15**: 149–170.
11. Rees, D. A. and N. J. Wight. 1969. Molecular cohesion in plant cell walls. *Biochem. J.* **115**: 431–439.
12. Rombouts, F. M. and W. Pilnik. 1978. Enzymes in fruit and vegetable juice technology. *Process Biochem.* **13**: 9–13.
13. Rombouts, F. M. and W. Pilnik. 1979. Utilization of pectic enzymes in food production. *Dev. Food Sci.* **2**: 264–268.
14. Sakai, T. and M. Okushima. 1978. Protopectin-solubilizing enzyme from *Trichosporon penicillatum*. *Agric. Biol. Chem.* **42**: 2427–2429.
15. Sakai, T. and M. Okushima. 1980. Microbial production of pectin from citrus peel. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**: 908–912.
16. Sakai, T. and M. Okushima. 1982. Purification and crystallization of a protopectin-solubilizing enzyme from *Trichosporon penicillatum*. *Agric. Biol. Chem.* **46**: 667–676.
17. Sakai, T. and S. Yoshitake. 1984. Purification and some properties of a protopectin-solubilizing enzyme from *Galactomyces reesei* strain L. *Agric. Biol. Chem.* **48**: 1941–1950.
18. Sakai, T., M. Okushima, and S. Yoshitake. 1984. Purification, crystallization and some properties of endopolygalacturonase from *Kluyveromyces fragilis*. *Agric. Biol. Chem.* **48**: 1951–1961.
19. Sakai, T. 1988. Protopectinase from yeasts and yeast-like fungus. *Methods in Enzymol.* **161**: 335–350.
20. Sakai, T., K. Ikemoto, and Y. Ozaki. 1989. Purification, crystallization, and characterization of a novel protopectinase from *Bacillus subtilis*. *Agric. Biol. Chem.* **53**: 1213–1223.
21. Sakai, T. and T. Sakamoto. 1990. Purification and some properties of a protopectin-solubilizing enzyme that has potent activity on sugar beet protopectin. *Agric. Biol. Chem.* **54**: 879–889.
22. Van Buren, J. P. 1979. The chemistry of texture in fruits and vegetables. *J. Text. Stud.* **10**: 1–23.

(Received May 12, 1999)