

## Polygalacturonase의 활성 증진 및 이를 이용한 식물 단세포 제조 방법 - 연구노트 -

김 혁 화

한국폴리텍 바이오대학 바이오식품과

### Method for Increasing the Stability and Activity of Polygalacturonase and Its Application to the Production of Vegetable Single Cell

Hyuk-Hwa Kim

Dept. of Bio-Food Technology, Korea Bio Polytechnic College, Chungnam 320-905, Korea

#### Abstract

This study was carried out to enhance the stability and activity of polygalacturonase (PGase) purified from *Kluyveromyces marxianus* IFO 0288. Gums such as xanthan gum, guar gum, and locust bean gum were capable of increasing the catalytic stability and activity of the PGase. At 30°C, the rate constants for the inactivation of the PGase with xanthan gum, guar gum, and locust bean gum were estimated to be 0.0003 min<sup>-1</sup>, below 0.0001 min<sup>-1</sup>, and 0.0001 min<sup>-1</sup> respectively, whereas control was estimated to be 0.0082 min<sup>-1</sup>. The yield of the maceration reaction catalyzed by the PGase for the production of carrot single cells increased by 13% in the presence of guar gum, where the relative enzyme activity supplemented with guar gum was two-fold greater than that of the PGase alone.

**Key words:** polygalacturonase, xanthan gum, guar gum, locust bean gum, single cells

#### 서 론

Polygalacturonase(PGase)는 펙틴의 일종인 polygalacturonic acid의 α-1,4결합을 가수분해하는 효소로 알려져 있다. 이러한 PGase는 식물 내에 존재하고 특히 미숙한 과실이 숙성함에 따라 그 활성이 증가하는 것으로 알려져 있으며, 각종 미생물 중에도 존재하고 있다(1-7). PGase는 과즙의 펙틴에 의한 혼탁화의 방지, 즉 청징화의 목적으로 이용되고, 식물의 세포간 물질을 선택적으로 분해시켜 각각의 단위 세포가 갖고 있는 식물의 천연성분들을 파괴시키지 않고 유지시킬 수 있는 식물 단세포의 생성에도 이용되는 등 그 응용 가치가 증가되고 있는 효소이다(8,9).

한편 PGase를 포함하는 통상의 효소들은 단백질이 가지는 특성상 자연계에서 분리되면 시간이 지날수록 그 활성이 감소하는, 즉 안정성이 저하되는 문제가 있어 그 안정성을 증진시키고자 하는 노력들이 시도되어 왔다. 이는 효소 용액 내에 알부민 혹은 텍스트린과 같이 안정제의 역할을 수행할 수 있는 물질을 첨가하던지 또는 보다 선택적인 방법으로 분자수준에서의 효소 단백질의 정보를 이용하여 그 분자 자체를 변형시켜 안정성을 확보 하는 등의 진보된 방법이 보고되고 있다(10).

그러나 상기의 안정제 첨가 방법들은 효소의 안정화제로서의 역할은 수행하지만 효소가 갖는 활성자체를 증진시키는 활성 촉진제로서의 역할은 전혀 알려진 바 없다. 또한, 선택적인 방법에 의한 균주의 변이 유발이나 단백질의 분자 변형에 의해 안정성을 증진시키는 경우는 일부 효소의 활성이 증진된다는 보고도 있으나(11), 이 경우 변이된 균주 또는 변형된 단백질들의 안정성을 확보해야 하며, 이러한 효소들을 인체와 관련된 목적으로 이용코자 할 때는 그 안전성 또한 검증이 이루어져야 하며, 매우 선택적인 방법이기 때문에 특정한 효소의 분자수준에서의 구체적인 정보 확립이 선행되어야 한다.

한편 자연에서 얻어지는 교질물질들은 식품에 있어서 겔 착제, 칼로리 조정제, 유화제, 피막형성제, 안정제 등의 용도로 사용되고 있으며 이는 수용성 교질물질들이 거의 대부분 친수성 콜로이드를 형성하는 성질을 활용한 것으로서, 예를 들면 젤라틴과 같은 단백질 및 xanthan gum, guar gum, locust bean gum, arabic gum, carrageenan과 같은 다당류들이 이에 속한다. 일반적으로 교질물질들의 존재 시 효소의 안정성도 증진되는 것으로 보나 교질물질을 사용하여 효소의 활성을 증진시키는 방법에 대해서는 전혀 알려진 바 없었다.

본 연구에서는 효소의 활성을 증진시킬 수 있는 새로운

†Corresponding author. E-mail: biohugh@gmail.com  
Phone: 82-41-746-7355, Fax: 82-41-746-7350

방법의 개발을 위하여 미생물로부터 분리, 정제된 PGase에 xanthan gum, guar gum, locust bean gum 등과 같은 교질물질을 첨가함으로써 효소의 안정성 외에 활성을 특이적으로 향상시킬 수 있는 방법을 살펴보았다. 또한, PGase를 이용한 단세포 야채의 제조에 있어서 교질물질을 첨가하여 야채 단세포화 효소반응의 수율을 증진시키는 새로운 방법을 제시하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

PGase는 다양한 미생물로부터 발견되는데, *Aspergillus niger*(1), *Sclerotinia sclerotiorum*(2), *Sclerotinia borealis*(3), *Trichosporon penicillatum*(4), *Saccharomyces cerevisiae*(5), *Kluyveromyces fragilis*(6), *Saccharomyces fragilis*(7) 등이 생산 균주로 알려져 있다. Lee는 *Kluyveromyces marxianus* IFO 0288로부터 PGase를 분리, 정제하여, 식물 단세포를 생산하였다(12). 본 연구에서는 Lee에 의해 분리, 정제된 PGase를 제공받아 사용하였으며, 교질물질로 사용한 xanthan gum, guar gum, locust bean gum은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

### PGase 활성 측정

PGase의 활성은 Honda 등(13)의 방법을 사용하여 측정하였다. 0.5 mg의 polygalacturonic acid sodium salt를 pH 3.5, 35 mM sodium acetate buffer에 녹인 후 기질용액으로 사용하였다. 기질용액 0.4 mL에 희석된 효소용액 0.1 mL를 가하여, 48°C에서 20분간 반응시킨 후, 1.2 mL의 TBC(100 mM sodium tetraborate decahydrate, 100 mM boric acid, 0.1% 2-cyanoacetamide) reagent를 가하여 반응을 정지시켰다. 100°C에서 10분간 가열하여 실온에서 냉각한 후 276 nm에서 흡광도를 측정하여 D-galacturonic acid의 양을 측정하였다(Shimatzu UV-1601). 효소활성은 48°C에서 1분간 1  $\mu$ mol의 D-galacturonic acid를 생성하는 것을 1 unit로 하였다. PGase의 안정성에 대한 지표는 효소의 불활성화 속도에 대한 1차 반응 속도상수인 k값( $\text{min}^{-1}$ )을 구하여 사용하였다.

### 단세포 야채의 제조 및 수율 측정

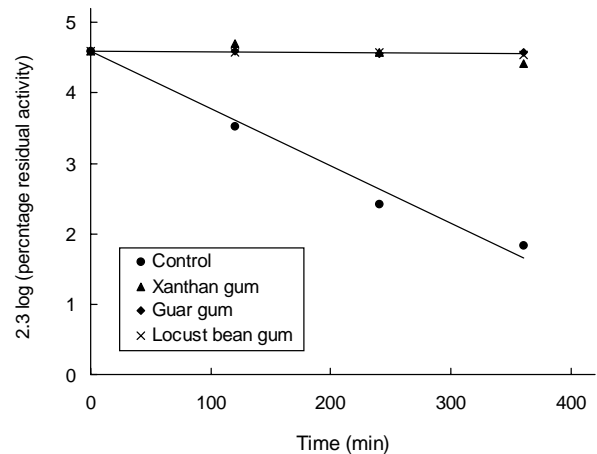
단세포화물의 제조는 Sakai 등의 방법을 응용하였다(14, 15). 선별, 세정한 1~3 mm 크기로 절단된 당근을 블렌칭한 후 반응용액에 침지, 단세포화 분리 효소인 PGase와 증진제로서 guar gum을 가한 후 45°C, pH 5.0 조건에서 2시간 동안 교반하면서 단세포화 하였다. 이로서 얻어진 단세포화 페이스트를 여과한 후 광학현미경을 이용하여 단세포화 반응이 효과적으로 수행되었음을 확인하였다. 제조된 단세포화 페이스트를 원심분리(3,500  $\times$  g, 4°C)하여 상등액을 제외한 부분의 무게를 측정함으로써 단세포화 수율을 계산하였다.

## 결과 및 고찰

### PGase의 활성 및 안정성

PGase를 pH 5.0의 20 mM sodium acetate 완충용액 또는 0.2%의 xanthan gum, guar gum, locust bean gum을 함유하는 동일한 완충용액에 잘 혼합시켜 30°C에서 배양하였다. 배양 중 일정 시간 간격으로 일정량의 효소를 취하여 잔존하는 PGase의 활성을 측정하여 효소의 불활성화에 대한 일차 반응 속도상수 k값을 구하였다. Fig. 1에 그 결과를 나타내었으며, Table 1에 각각의 교질물질 존재 시 PGase의 불활성화에 대한 1차 반응 속도상수 k값을 나타내었다. 대조군의 k값이 0.0082  $\text{min}^{-1}$ 인데 반해 xanthan gum 첨가 시는 0.0003  $\text{min}^{-1}$ , guar gum 첨가 시는 0.0001  $\text{min}^{-1}$ 이하, locust bean gum 첨가 시는 0.0001  $\text{min}^{-1}$ 로서 교질물질 첨가에 의해 효소의 안정성이 현저히 증가하였다.

동일한 조건과 방법으로 교질물질 처리 여부에 따라 정제된 PGase와의 반응 30분 후 상대 활성을 비교하였으며, 그



**Fig. 1.** Effect of gums on the stability of the purified polygalacturonase.

The enzymes were incubated in 20 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) at 30°C.

**Table 1.** Summary of the parameters representing the function of gums as enhancer of catalytic activity as well as stabilizers of the polygalacturonase

	$k^{(1)}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	Relative activity <sup>(2)</sup> (%)	Activation energy <sup>(3)</sup> (cal/mole)
Control <sup>(4)</sup>	0.0082	100	13,300
Xanthan gum <sup>(5)</sup>	0.0003	189	-
Guar gum <sup>(5)</sup>	<0.0001	197	10,900
Locust bean gum <sup>(5)</sup>	0.0001	190	11,400

<sup>1)</sup>The first-order rate constant for the inactivation of the polygalacturonase at 30°C.

<sup>2)</sup>The relative activity of polygalacturonase.

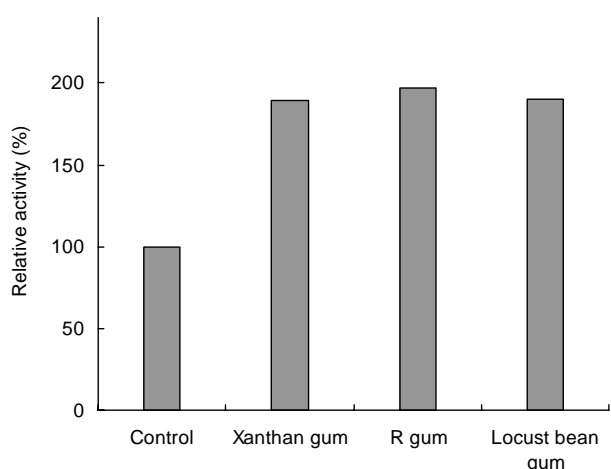
<sup>3)</sup>The activation energy for the hydrolysis of polygalacturonic acid by the polygalacturonase.

<sup>4)</sup>In 20 mM sodium acetate buffer (pH 5.0).

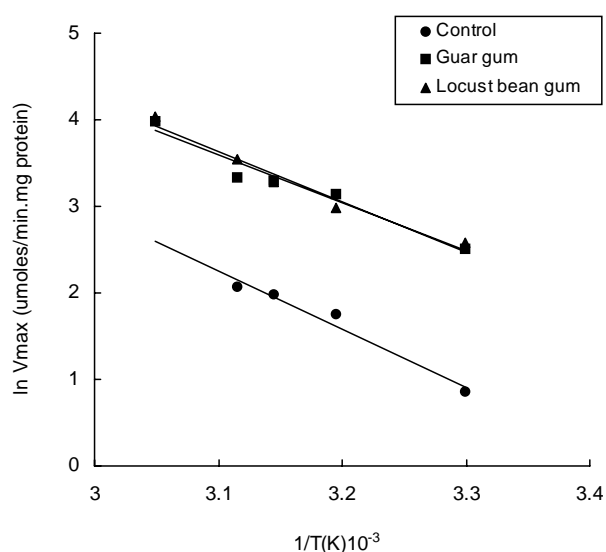
<sup>5)</sup>In the same buffer with 0.2% of each gum.

결과를 Fig. 2와 Table 1에 나타내었다. 대조군에 비해 xanthan gum 첨가 시는 PGase의 상대 활성이 89% 증가되었으며, guar gum 첨가 시는 97%, locust bean gum 첨가 시는 90% 증가되어 상술한 교질물질들이 효소의 활성 촉진제로서의 기능이 있음을 확인할 수 있었다.

교질물질들이 PGase의 활성을 촉진시킴을 증명하기 위하여, 각각의 교질물질 처리 유무 시의 효소 활성에 대한 아레니우스 그래프를 Fig. 3에 나타내었다. 여기서 T는 효소 반응 시의 절대온도 값을 의미한다. Fig. 3의 직선의 기울기의 절대치로부터 PGase가 polygalacturonic acid와 반응하는 효소반응의 활성화 에너지를 Table 1에 나타내었다. 단, 이 때 xanthan gum 첨가 시의 활성화 에너지는 반응액의



**Fig. 2. Comparison of the relative activity of the purified polygalacturonase in the presence and absence of gums.** The enzymes were incubated in 20 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) at 30°C.

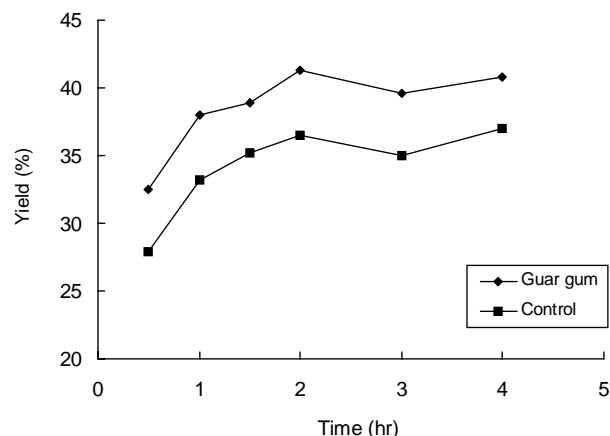


**Fig. 3. Arrhenius plot for the determination of activation energy for the hydrolysis of polygalacturonic acid by the purified polygalacturonase with and without gums.**

점도가 상대적으로 매우 높아 아레니우스 그래프에 의해 유도되는 활성화 에너지를 구하기 어려웠다. 그러나 이를 제외한 나머지 교질물질의 경우에 있어서는 대조군에 비해 효소 반응의 활성화 에너지가 낮아진 것을 확인하였으며, 이는 상술한 교질물질들이 이 효소의 활성 촉진제 역할을 한다는 것을 의미한다.

**단세포 야채의 제조 및 수율**

선별, 세정, 절단한 등황색의 당근 10 g을 95°C 물에서 2분간 블랜칭한 후 food cutter로 1~3 mm로 다시 세절하여 반응용기에 투입하고 증류수 10 mL을 가한 후 20 mM sodium acetate buffer를 사용하여 pH 5.0로 맞추었다. 단세포화 분리 효소인 PGase 0.005 g과 증진제로서 guar gum 0.02 g을 가하고, 다른 반응용기는 PGase 0.005 g만을 가하여 대조군으로 하였다. 45°C, pH 5.0에서 4시간 동안 교반하면서 얻어진 단세포화 페이스트를 여과한 후 원심분리(3,500×g, 4°C)하여 상등액을 제외한 부분의 무게를 측정함으로써 단세포화 수율을 계산하였다. PGase의 활성 증진 및 안정성 실험에서 가장 우수한 결과를 확인한 guar gum을 증진제로 사용하여 당근 단세포를 제조하였으며, 수율을 비교한 결과 모든 반응시간에서 guar gum을 가했을 때가 PGase만을 가하여 단세포화 반응을 수행한 경우보다 높은 수율을 보였다. 단세포화 반응 후 2시간째에 대조군 대비 13%의 가장 높은 수율 향상을 보였다(Fig. 4). 광학 현미경으로 반응물을 관찰한 결과, 단세포화 반응이 성공적으로 수행되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 5). 이상의 결과에서 PGase에 xanthan gum, guar gum, locust bean gum 등과 같은 교질물질을 첨가함으로써 효소의 안정성과 활성을 특이적으로 향상시킬 수 있으며, 이를 이용한 단세포 야채의 제조에 있어서 효소반응의 수율 증진을 위한 방법으로서 활용될 수 있으리라 사료된다.



**Fig. 4. Comparison of the yield for the production of carrot single cell by the polygalacturonase with and without guar gum.**

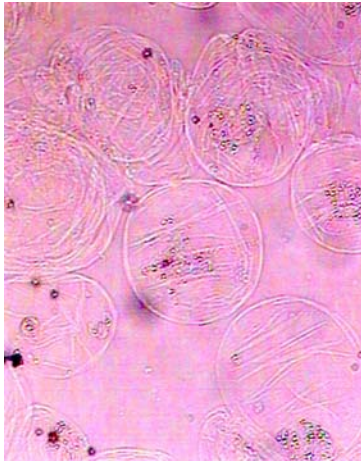


Fig. 5. Photomicrograph of carrot single cell ( $\times 125$ ).

## 요약

본 연구에서는 효소의 활성을 증진시킬 수 있는 새로운 방법의 개발을 위하여 미생물로부터 분리, 정제된 polygalacturonase(PGase)에 xanthan gum, guar gum, locust bean gum 등과 같은 교질물질을 첨가함으로써 효소의 안정성 외에 활성을 특이적으로 향상시킬 수 있는 새로운 방법 조사하였다. 정제된 PGase를 0.2%의 상술한 교질물질을 함유하는 동일한 완충용액에 잘 혼합시켜 30°C에서 배양하여 효소의 불활성화에 대한 일차반응 속도상수  $k$ 값을 구한 결과, 대조군의  $k$ 값이  $0.0082 \text{ min}^{-1}$ 인데 반해 xanthan gum 첨가 시는  $0.0003 \text{ min}^{-1}$ , guar gum 첨가 시는  $0.0001 \text{ min}^{-1}$  이하, locust bean gum 첨가 시는  $0.0001 \text{ min}^{-1}$ 로서 교질물질 첨가에 의해 효소의 안정성이 현저히 증가하였다. 또한 대조군에 비해 xanthan gum 첨가 시는 PGase의 상대활성이 89%가 증가되었으며, guar gum 첨가 시는 97%, locust bean gum 첨가 시는 90%가 증가되어 상술한 교질물질들이 효소의 활성 촉진제로서의 기능이 있음을 확인할 수 있었다. Guar gum 처리에 의해 약 2배의 활성이 증진된 상태로 당근 단세포 생성 반응을 수행한 결과 모든 반응시간에서 guar gum을 가했을 때가 PGase만을 가하여 단세포화 반응을 수행한 경우보다 높은 수율을 보였으며, 단세포화 반응 2시간 경과 후에 대조군 대비 13%의 가장 높은 수율 향상을 보였다.

## 문헌

1. Maldonado MC, Saad AM. 1998. Production of pectinester-

- ase and polygalacturonase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state systems. *J Ind Microbiol Biotechnol* 20: 34-38.
2. Martel MB, Letoublon R, Fevre M. 1998. Purification and characterization of two endopolygalacturonases secreted during the early stages of the saprophytic growth of *Sclerotinia sclerotiorum*. *PFEMS Microbiol Lett* 158: 133-138.
3. Takasawa T, Sagisaka K, Yagi K, Uchiyama K, Aoki A, Takaoka K, Yamamoto K. 1997. Polygalacturonase isolated from the culture of the psychrophilic fungus *Sclerotinia borealis*. *Can J Microbiol* 43: 417-424.
4. Iguchi K, Kishida M, Sakai T. 1996. Purification and characterization of three extra cellular protopectinases with polygalacturonase activity from *Trichosporon penicillatum*. *Biosci Biotechnol Biochem* 60: 603-667.
5. Gainvors A, Frezier V, Lemaire H, Lequart C, Aigle M, Belbarbi A. 1994. Detection of polygalacturonase, pectin-lyase and pectin esterase activities in a *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Yeast* 10: 1311-1319.
6. Sakai T, Okushima M, Yoshidake S. 1984. Purification, crystallization, and some properties of endo-polygalacturonase from *Kluyveromyces fragilis*. *Agric Biol Chem* 48: 1951-1961.
7. Lim JY, Yamasaki Y, Ozawa J. 1980. Multiple forms of endo-polygalacturonase from *Saccharomyces fragilis*. *Agric Biol Chem* 44: 473-480.
8. Gomez-Ruiz L, Garcia-Garibay M, Barana E. 1988. Utilization of endo-polygalacturonase from *Kluyveromyces fragilis* in the clarification of apple juice. *J Food Sci* 53: 1236-1240.
9. Call HP, Waler J, Emeis CC. 1985. Maceration activity of an endo-polygalacturonase from *Candida macedoniensis*. *J Food Biochem* 9: 325-348.
10. Mozhaev VV, Melik-Nuvarov NS, Levitsky VY, Siksnis VA, Martnek K. 1992. High stability to irreversible inactivation at elevated temperatures of enzymes covalently modified by hydrophilic reagent. *Biotechnol Bioeng* 40: 650-662.
11. Moreau A, Shareck F, Kluepfel D, Morosoli R. 1994. Increase on catalytic activity and thermostability of the xylanase A of *Streptomyces lividans* 1362 by site-specific mutagenesis. *Enz Microb Technol* 16: 420-424.
12. Lee JH. 1999. Preparation of microbial polygalacturonase and its application to the production of vegetable single cell. *PhD Dissertation*. Yonsei University, Korea.
13. Honda S, Nishimura Y, Takahashi M, Chiba H, Kakehi K. 1982. A manual method for the spectrophotometric determination of reducing carbohydrates with 2-cyanoacetamide. *Anal Biochem* 119: 194-199.
14. Nakamura T, Hours RA, Sakai T. 1995. Enzymatic maceration of vegetables with protopectinases. *J Food Sci* 60: 468-472.
15. Sakai T, Sakamoto T, Hallaert J, Vandamme EJ. 1993. Pectin, pectinase, and protopectinase: Production, properties, and applications. *Adv Appl Microbiol* 39: 213-294.

(2007년 10월 11일 접수; 2007년 11월 9일 채택)