

## Pectinase 생산균의 분리 및 특성

이지은, 김삼곤, 김성준\*

전남대학교 공과대학 환경공학과

전화 (062)530-0853, FAX (062) 530-0864

### Abstract

A bacterium, named as strain KL34, producing extracellular pectinase was isolated from soil. The morphological characteristics of the isolated bacterium were gram-negative, rod-shaped and endospore unformed. Production of pectinase of strain KL34 was induced only by polygalacturonic acid added to the culture media as a sole carbon source. Pectinase activity of KL34 reached a maximum value in the culture conditions of pH 8.5 at 25°C. Optimal medium for pectinase production was determined to the composition of 2% polygalacturonic acid, 0.25% yeast extract, 0.02% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.02% CaCl<sub>2</sub>, and 0.05% KCl per liter. The pectinase activity in the culture supernatant reached the highest amount of 54 U/ml after 3 days cultivation in the optimal media.

### 서론

펙틴질은 과일, 야채 등의 고등식물에 다량 함유되어 있는 다당류로서 세포막 사이의 middle lamella층에 주로 존재하면서 세포막 사이의 내부를 메워주거나 세포와 세포 사이를 접착시켜주는 물질로 작용한다<sup>1)</sup>. 따라서 펙틴질은 식물 세포의 기계적 강도를 유지하거나 세포간의 결합력, 조직의 강도, 응집성 및 점조성을 유지하는데 결정적인 영향을 미친다.

펙틴질의 주사슬은 D-galacturonic acid의  $\alpha$ -1,4 결합에 의해 형성된 polygalacturonic acid로 구성되어 있으며, polygalacturonic acid의 유기산기가 메틸화된 상태로 존재하는 펙티닌산과 카르복실기가 유리된 상태로 존재하는 펙틴산으로 구분할 수 있다. 이러한 펙틴질을 분해하는 효소균을 총칭하는 pectinase는 펙틴에 작용하는 PMG(polymethyl galacturonase), PL(pectin lyase)과 펙틴산에 작용하는 PG(polygalacturonase), PAL(pectatelyases)로 구분할 수 있다.<sup>2,3)</sup> 이중 endo-polygalacturonase (endo-PG)는 펙틴산에 잘 작용하는 효소로 무작위로 펙틴의 주사슬을 분해하여

oligo-galacturonic acid가 분해산물로 축적되며 최종분해산물로는 mono-galacturonic acid, di-galacturonic acid 등이 분해산물로 축적되기도 한다. exo-polygalacturonase (exo-PG)는 펙틴산의 비환원성 말단에 작용하여 mono-galacturonic acid를 생성한다.<sup>4)</sup>

펙틴분해 효소는 과즙이나 과일주의 생산공정에서 과즙의 청징화, 착즙률 및 여과 공정의 개선을 위해 널리 이용하고 있다.<sup>5)</sup> 특히 알칼리성 pectinase의 경우 채소를 이용하는 식품산업 공정에서 배출되는 펙틴질을 함유하는 폐수의 전처리 및 depolymerization, 식물성 섬유질 회수 등을 위해 이용되고 있다.<sup>6)</sup> 현재 상업적으로 이용되는 펙틴분해 효소들은 *Aspergillus* 종에서 생산되는 효소가 많이 이용되고 있으며<sup>7)</sup>, bacillus 등의 bacteria에 의한 효소 생산은 최근에 보고되었다.<sup>8)</sup>

본 연구에서는 pectinase 활성이 높은 bacteria를 토양으로부터 분리하였으며, 효소 생산의 최적 조건을 검토 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 균주의 분리 및 동정

광주지역 일원의 토양을 채취하여 균주 분리원으로 사용하였다. 균주 분리용 기본 배지로는 LB고체배지( NaCl 5g, tryptone 10g, yeast extract 5g, agar 15g/L, pH 8.0)를 사용하였다. 토양 샘플 1g을 생리식염수 100ml에 3단희석하고 그 상등액 100 $\mu$ l를 균주 분리용 LB 고체배지에 도말 후 37 $^{\circ}$ C에서 12시간 배양하여 형성된 colony를 LBP 고체배지(NaCl 5g, tryptone 10g, yeast extract 5g, Polygalacturonic acid 5g, agar 15g/L, pH 8.0 )에서 10회 이상 연속적으로 계대배양 하여 균을 순수 분리하였다. 분리된 균은 1g/L의 congo-red가 함유된 LBP 배지에서 37 $^{\circ}$ C, 1일간 배양하여 clear-zone을 형성하는 균을 1차 선별하였다. 선별된 균주를 polygalacturonic acid가 함유된 액체배지에 접종하여 37 $^{\circ}$ C에서 2일간 진탕배양후, pectinase 활성이 가장 높은 균주를 KL34로 명명하였다. 선별된 균주의 형태학적 특성은 SEM을 통해 관찰하였으며, 생화학적 특성은 API 20 kit를 사용해 조사하였다.

### 2. 균주의 생육도 및 효소활성

선별된 균주의 성장에 따른 효소생산성을 조사하기 위해, 효소생산용 액체배지(Polygalacturonic acid 1%, yeast extract 0.25%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.02%, KCl 0.05%, CaCl<sub>2</sub> 0.02%, pH 8.5 )에 분리균 KL34를 접종하고 37 $^{\circ}$ C에서 100rpm으로 2일간 진탕 배양하였다. 균의 생육도는 UV 준광광도계를 이용하여 660nm에서 측정하였으며, 효소 활성 측정

을 위해 배양액을 12,000rpm에서 10분간 원심분리하여 균체를 제거한 상등액을 조효소원으로 사용하였고, 기질로는 0.25% polygalacturonic acid용액(pH 8.5)을 사용하였으며, 효소활성은 Bertheau의 방법<sup>9)</sup>을 사용하였다. 즉, 효소액 100 $\mu$ l에 10mM Tris-HCl buffer(pH 9.0) 200 $\mu$ l, 기질 200 $\mu$ l를 첨가하여 40 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응 시킨후 10mM thiobarbituric acid 5ml와 0.5M HCl 2.5ml를 첨가하여 water bath에서 45분간 끓인 후 급냉하고, 3000rpm에서 5분간 원심분리후 550nm에서 흡광도를 측정한다. 이때 pectinase활성은 위 조건에서 흡광도 0.1을 1unit로 나타내었다.

## 결과 및 고찰

### 1. 균주의 분리 및 동정

Pectinase를 생산하는 균주를 선별하기 위해 LB, LBP 선택배지에서 배양한 결과 clear-zone을 형성하는 5개의 균주를 1차 선별하였다. 선별된 균주를 LBP 액체배지에서 36시간 배양 후 효소활성이 가장 높은 균주인 strain KL34를 최종 선택하여 형태학적, 생화학적 특성을 검토하였다. 최종 선별된 균주는 그램 음성의 쌍간균으로 포자를 형성하지 않는 호기성 균주이다.(Figure 1) 생화학적 특성은 API 20 kit를 사용하여 생화학적 특성을 검토한 결과 strain KL34는 beta-galactosidase, tryptophane deaminase, acetoin production, gelatinase에 양성반응을 보였으며, glucose, mannitol, rhamnose, sucrose, melibiose, amygdalin, arabinose를 산화시키는데 양성반응을 보였다.

### 2. Pectinase 생산을 위한 배양조건

Pectinase 생산을 위한 최적온도를 조사하기 위해 strain KL34를 효소생산용 액체배지 100ml가 함유된 500ml baffled flask에 접종하여 각각의 온도에서 3일간 100rpm으로 배양한 결과 25 $^{\circ}$ C에서 가장 높은 효소활성을 보여주었다.(Table 1) Pectinase 생산에 있어 배양액의 초기 pH 영향을 검토하기 위해 각각의 pH에서 3일간 25 $^{\circ}$ C, 100rpm으로 배양한 결과 초기 pH 8.5에서 가장 높은 효소활성이 나타났다.(Table 2) 탄소원의 종류에 따른 pectinase의 생산성을 조사하기 위해 탄소원이 결핍된 기본배지에 10종류의 탄소원을 0.5%(w/v)가 되도록 첨가하여 25 $^{\circ}$ C에서 3일간 배양 후 배양액에 존재하는 pectinase활성을 측정하였다. 그 결과 Table 3에서와 같이 polygalacturonic acid를 탄소원으로 사용하였을 때 효소생산성이 가장 좋았으며, polygalacturonic acid 첨가농도에 따른 효소 생산성은 Table 4에서와 같이 2%(w/v)의 농도에서 가장 좋은 결과를 나타내었다. 질소원에 따른 pectinase의 생산성을 조사하기 위하여 2%(w/v) polygalacturonic

acid를 탄소원으로 첨가하고 질소원이 결핍된 기본배지에 여러 가지 종류의 무기질소원과 유기 질소원을 0.5%(w/v)가 되도록 첨가한 후 배양 상등액의 효소활성을 측정하였다. 그 결과 yeast extract 첨가하였을 경우에 균의 생육과 효소생산이 가장 좋았으며, 무기 질소원 보다 유기 질소원에서 더 높은 활성(Table 5)을 보였다. 질소원 농도에 따른 효소 생산성을 비교한 결과 0.25% yeast extract를 첨가했을 경우 가장 높은 효소활성을 보여주었다.(Table 6) 균의 성장에 따른 pectinase 생산을 검토하기 위해 최적 배양조건에서 6시간 간격으로 효소 생산성의 변화를 검토한 결과 Figure 2에 나타난 바와 같이 균의 생육도는 3일째에 최대에 도달하였고 이때 효소활성은 최대 값을 나타내었다. 배양액의 초기 pH는 초기에는 약간 저하되다가 균체 성장과 함께 다시 상승하여 일정하게 유지되었다.

### 요약

본 연구에서는 토양으로부터 높은 pectinase 활성을 나타내는 균주를 분리하였고, pectinase 생산을 위한 최적 배양조건을 검토하였다. strain KL34의 배양특성과 pectinase 생산 조건을 검토한 결과 최적온도 25℃, 배양액 초기 pH 8.5, 최적 탄소원 2% polygalacturonic acid 및 최적 질소원 yeast extract 0.25%에서 가장 높은 효소활성을 나타내었다

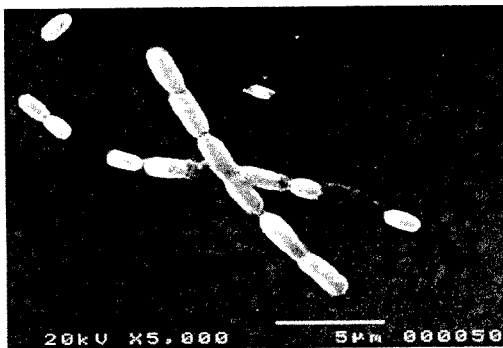


Figure 1. Scanning electron micrograph of strain KL34

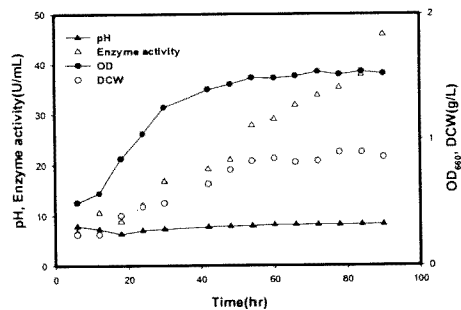


Figure 2. Time course of pectinase production in shaking culture by KL-34

## **References**

1. Lucian Biffi Crotti, V. A. P. Jobor, et. al "Syudies of pectic enzymes produce by *Talaromyces flavus* in submerged and soild substrate cultures" *Journal of Basic Microbiology* (1999), **39**(4), 227-235
2. Kim Jong-Chon, Hwa-young Kim and Yong-Jin Choi, "Production and charaterization of acid-stable pectin lyase from *Bacillus* sp. PN33" *Journal of Microbiology and Biotechnology* (1998), **8**(4), 353-360
3. G. S. N. Naidu, T. Panda "Production of pectolytic enzymes-a review" *Bioprocess Engineering* (1998), **19**, 355-361
4. Jeon Beong-Sam, J. Y. Cha, J. Y. Song, G. D. Lee, B. K. Kim, Y. C. Lee, "Isolation and characterization of pectinase producing *Bacillus* sp. BS-214" *Korean Journal of Life Science* (2000), **10**(1), 101-106
5. D. R. Kashyap, P. K. Vohra, S. Chopra, R. Tewari "Applications of pectinases in the commercial sector : a review" *Bioresource Technology* (2001), **77**, 215-227
6. G. S. Hoondal, R. P. Tiwari, R. Tewari, N.Dahiya and Q. K. Beg, "Microbial alkaline pectinases and their industrial application: a review" *Applied Microbiology and Biotechnology* (2002)
7. MC Maldonado, AM sstrasser de Saad "Production of pectinesterase and polygalacturonase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state systems" *Journal of industrial Microbiolog and Biotechnology* (1998), **20**, 34-38
8. T. Kobayashi, N. Higaki, A. Suzumatsu, K. Sawada, et. al "Purification and properties of a high-molecular-weight, alkaline exopolygalacturonase from a strain of *Bacillus*" *Enzyme and Microbial Technology* (2001), **29**, 70-75
9. Yves Bertheau, M. H. Eslam, et. al "Detection of depolymerase isoenzymes after electrophoresis or electrofocusing, or in titration curves" *Analytical Biochemistry* (1984), **139**, 383-389

**Table 1.** Effect of temperature on pectinase production of KL-34

Temperature(°C)	Total activity (U/ml)
20	26.38
<b>25</b>	<b>34.05</b>
30	25.39
35	14.33
37	27.74
40	12.18
45	16.80
50	13.32

**Table 3.** Effect of carbon sources on pectinase production of KL-34

Carbon sources	Total activity (U/ml)
None	4.90
<b>Polygalacturonic acid</b>	<b>21.45</b>
Lactose	2.74
Saccharose	2.95
Maltose	2.90
Fructose	4.68
Starch	2.83
Xylan	3.95
Glucose	3.68
Cellulobiose	2.60
Pectin	14.11

**Table 5.** Effect of nitrogen sources on pectinase production of KL-34

Nitrogen sources	Total activity (U/ml)
None	12.29
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	12.58
NH <sub>4</sub> Cl	17.21
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	8.67
Malt extract	11.49
<b>yeast extract</b>	<b>47.45</b>
Meat extract	17.94
Bacto Peptone	12.07
Tryptone	19.14
CSL	14.21

**Table 2.** Effect of initial pH on pectinase production of KL-34

Initial pH	Total activity (U/ml)
5.5	4.56
6.0	7.51
6.5	23.70
7.0	29.41
7.5	14.83
8.0	26.62
<b>8.5</b>	<b>35.39</b>
9.0	23.03

**Table 4.** Effect of polygalacturonic acid concentration on pectinase production of KL-34

Polygalacturonic acid concentration(%)	Total activity(U/ml)
0.5	10.12
1.0	17.93
1.5	26.86
<b>2.0</b>	<b>40.10</b>
2.5	41.62
3.0	32.61
4.0	12.22
5.0	11.75

**Table 6.** Effect of yeast extract concentration on pectinase production of KL-34

yeast extract concentration(%)	Total activity (U/ml)
0	12.02
<b>0.25</b>	<b>54.24</b>
0.5	50.00
1.05	46.08
1.25	48.73