

Aspergillus nidulans 가 생산하는 Naringinase 에 관한 연구

(제 4 보) DEAE-Sephadex A-25에 의한 Naringinase 의 고정화

宋 忠 錫 · 卞 裕 亮 · 柳 洲 鉉

延世大學校 工科大學 食品工學科

(1979년 4 월 10일 수리)

Studies on Naringinase Produced from *Aspergillus nidulans*

(Part 4) Immobilization of Naringinase on DEAE-Sephadex A-25

Chung Seog Song, Yu Ryang Pyun and Ju Hyun Yu

Department of Food Engineering, College of Engineering

Yonsei University, Seoul.

(Received April 10, 1979)

Abstract

Naringinase from *Aspergillus nidulans* was immobilized on DEAE-Sephadex A-25 and its characteristics were studied.

The optimal conditions for the preparation of the immobilized enzyme were as follow; optimal pH, incubation time and the suitable amount of enzyme were 6.0, 30 min. and 110 units per gram of the dried ion exchange resin, respectively. The optimal pH of the immobilized enzyme was higher than that of the native enzyme. The optimal temperature increased from 40°C to 50°C.

The heat and pH stability of the immobilized enzyme were better than those of the native enzyme.

No significant difference in the Michaelis constant was detected.

Activation energy of the immobilized enzyme was 7.96 Kcal/mole, and the apparent Michaelis rate equation was used to describe the action of this material. The degree of hydrolysis was dependant on the flow rate at low rate of perfusion through the column. As the flow rate increased, the value of the apparent Km decreased.

서 론

밀감류의 고미 성분의 주체로 존재하는 naringin 을 제거하기 위하여 여러 방법이 제안되어 있으나^(1~5), 그 가운데 naringinase (EC. 3. 2. 1. 40 and EC. 3. 2. 1. 21)에 의한 naringin 의 효소적 가수분해로서 non-bitter 물질로 전환시키는 방법이 가장 유망한 방법으로 이에 대하여 여러가지로 연구 되고 있다.^(6~11)

전보^(12, 16, 17)에서는 *Aspergillus nidulans* 가 생산하는 naringinase 의 생산 조건 및 효소의 물리 화

학적 성질과 acrylamide gel 을 이용한 naringinase 의 고정화에 관하여 보고하였다.

본보에서는 DEAE-Sephadex A-25를 사용하여 *Aspergillus nidulans* 의 naringinase 를 고정화시키는 조건과 그 성질에 관하여 보고 한다.

실험 방법

1. 효소의 조제

前報에서와 같이 밀기울에 *Aspergillus nidulans* 를 접종 배양한 후, 過량의 물로서 실온에서 추출 여과하고 ethyl alcohol (70%)로 침전시킨 후, 분

리된 침전물을 진공 동결건조기 (Model M-5 Shimadzu Seisakusho LTD)로 분말 상태로 건조하여 상온에서 desiccator 에 보존하였다.

이 분말효소 1g 당 naringin 분해활성은 5,700 units 였으며 실험 할 때는 0.2% 효소액으로 조제하여 사용하였다.

2. 擔體 및 그 전처리

擔體로서는 DEAE-Sephadex A-25 를 사용하였고 0.5 N NaOH 와 0.5 N HCl 로 수차례 반복 세척하여 활성화시킨 후 ethyl alcohol 로 洗淨脫水하고 감압 건조하여 분말로서 desiccator 에 보존하였다.

3. 고정화 효소의 조제

활성화시킨 擔體 1g (dry basis) 을 0.01 M phosphate buffer (pH 6.0) 100 ml 에 충분히 수화시킨 후 0.2% 효소액 10 ml 를 加하고 30°C 에서 30분간 교반하여 흡착시킨 다음 1,000×g 에서 15분간 원심분리하였다.

침전물은 세척한 여액에 단백질농도가 없을 때 즉 280 nm 에서 0.D 가 0 일 때까지 증류수로 세척하였다.

4. 효소의 활성측정

Naringinase 의 활성은 Davis 法⁽¹³⁾을 변형시킨 中林 및 井上^(14,15)의 변법으로 측정하였다. 즉, 0.02% naringin 용액 5 ml 에 고정화한 naringinase 1g 을 加하여 40°C 에서 1시간 반응시킨 후 측정하였다.

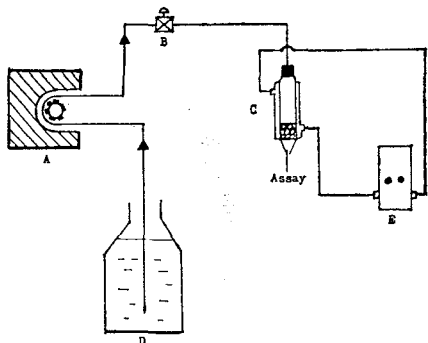


Fig. 1. Schematic Diagram of Packed Bed Reactor System.

- A ; Peristaltic pump
- B ; Velocity adjusting valve
- C ; Jacket type packed bed reactor
- D ; Feed reservoir
- E ; Thermostat circulator

5. 고정화 효소의 연속반응

연속반응에는 Fig. 1 과 같은 장치로서 전보⁽¹²⁾와 같으며, 반응기를 통과하여 나온 반응액은 Davis 변법에 의하여 naringin 함량을 계산하여 그 가수분해도를 환산하였다.

결과 및 고찰

1. 고정화 효소의 조제조건

Naringinase 의 이온결합량은 단위 擔體의 교환기수에 비례하는 것 이외에 접촉시간, 효소농도, pH, 이온강도 등의 영향이 있다고 생각되어 DEAE-Sephadex 에 효소가 결합되는 조건에 대하여 검토하였다.

(1) 吸着時 pH 의 영향 DEAE-Sephadex 를 0.1 M McIlvan buffer 와 phosphate buffer 를 사용하여 pH 3 에서 8 까지 각각의 pH 에서 효소를 흡착시킨 후에 증류수로 세척하고 복합체의 효소활성을 측정하여 吸着時 pH 의 영향을 보았다. Fig. 2 에 나타낸 것 같이 흡착시 최적 pH 는 6.0 으로 나타났다. *Aspergillus niger* 가 생산하는 naringinase 를 DEAE-Cellulose 에 흡착시킨 Matsubara⁽¹⁴⁾ 등의 결과와 일치하였다.

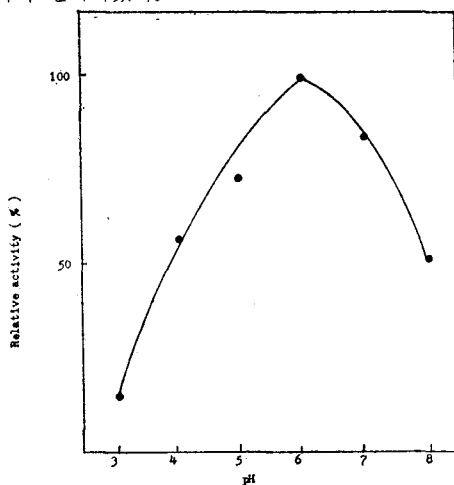


Fig. 2. Effect of pH for the Preparation of Immobilized Enzyme.

(2) 결합되는 효소량에 미치는 접촉시간의 영향 Magnetic stirrer 를 사용하여 5분, 15분, 30분, 60분간 교반하여 접촉시간의 영향을 검토한 결과, Fig. 3 에서 보이듯이 15분간 접촉한 후에는 큰 차이가 없었다.

(3) 흡착 및 세척에 있어서 이온강도의 영향
 吸着時 最適 pH는 6.0 이었으며 이 최적 pH에서 효소의 화학적 흡착에 미치는 이온 강도의 영향과 세척액의 이온강도가 물리적으로 흡착된 효소의 세척에 미치는 영향을 검토하였다.

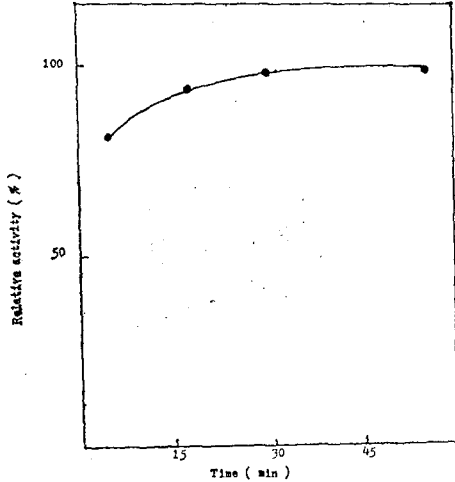


Fig. 3. Effect of Incubation Time on the Amount of Linked Enzyme.

Table 1에서 보는 바와 같이 흡착시의 이온강도의 영향은 매우 크지는 않으며, 세척액의 경우는 이온강도가 작을수록 효소의 이탈이 적은 경향을 보여주었다.

Table 1. The Recovery of Activity on Various Ion Concentrations of Adsorbing and Washing Solution.

Washing solution	Adsorbing solution	
	exp. 1	exp. 2
(phosphate buffer pH 6)		
0.01 M	84%	85%
0.05 M	72%	78%
0.10 M	71%	78%
water	78%	81%

Exp. 1; The enzyme was resolved into 0.10 M phosphate buffer. (pH 6)

Exp. 2; The enzyme was resolved into 0.01 M phosphate buffer. (pH 6)

The enzyme assay was carried out under the standard condition.

(4)擔體量과 효소의 吸着量의 관계 효소액 11 units(0.2% 용액 1ml)에 대해 건조된 분말擔體를 30 mg에서 150 mg까지 변화시키면서 그 때의

복합체 효소 활성을 측정하여 담체량과 고정화 효소의 활성과의 量的 관계를 검토하였다.

Fig. 4에서 보이듯이 상대적 효소활성을 비교한 결과 100 mg 이상에서는 효소활성의 변화가 없었으나 그 이하에서는 효소활성이 감소한 것으로 보아 효소가 흡착되지 않고 세척되어 나간 것으로 생각된다.

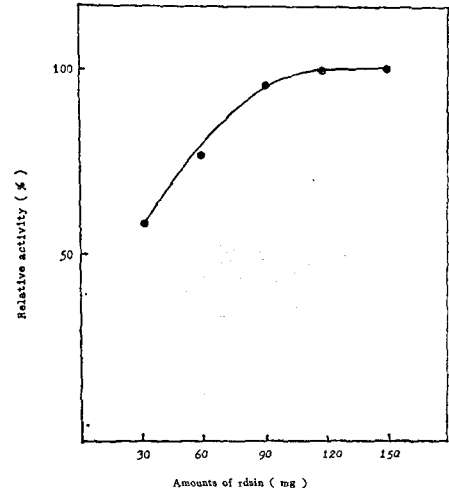


Fig. 4. The Amounts of the Dried Ion Exchange-Resin Required for the Immobilization of 11 Units of Free Enzyme.

이상의 결과로 고정화 효소의 조제는 吸着時 pH 6.0 이고 흡착액은 0.01 M phosphate buffer를 사용하였으며, 접촉시간은 15분 이상에서 별 차이가 없었으나 확실성을 기하기 위해 30분간 교반하였다.

또한 세척시에는 0.01M phosphate buffer를 사용하였고 담체 1g (dry basis)에 대하여 110 units의 효소를 흡착시켰다. 이는 Matsubara⁽¹⁴⁾등의 결과와 유사하였다.

2. 固定化 Naringinase의 성

(1) 효소반응에 미치는 pH의 영향 : McIlvaine-buffer와 phosphate buffer를 사용하여 0.02% naringin 용액을 각각의 pH로 만들고 0.5g의 효소 gel과 반응시켜 효소활성을 측정하고 수용성 효소와 비교하였다.

Fig. 5에서와 같이 pH 7.0에서 최대의 활성을 나타냈으며 이 결과는 수용성 효소와는 달리 알카리성으로 이동하였다^(16,17).

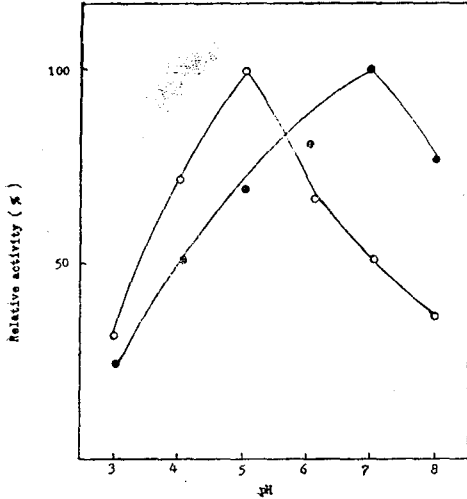


Fig. 5. Effect of pH on the Activity of Immobilized Naringinase.

The enzyme assay was carried out under standard except that 0.02 M citrate-phosphate buffers were used.

The enzymatic activities are expressed as percentage of the maximum activity attained at the appropriate optimum pH of the enzymes.

○ free enzyme, ● immobilized enzyme.

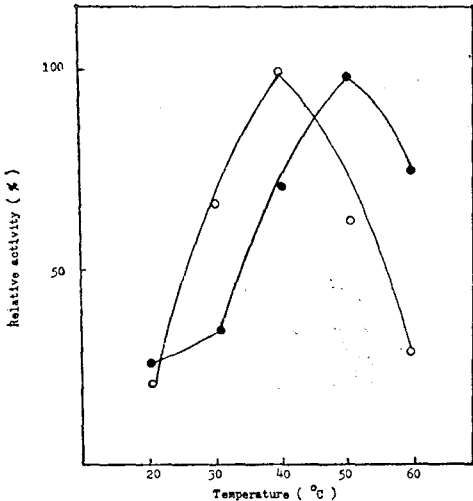


Fig. 6. Effect of Temperature on the Activity of Immobilized Naringinase.

The enzyme assay was carried out under standard condition with varied incubation temperature.

○ free enzyme ● immobilized enzyme

(2) 효소반응에 미치는 온도의 영향: 고정화 효소의 최적반응 온도는 Fig. 6에서 보는 것과 같이 50°C 이었다. 이는 수용성 효소에 비하여 10°C 상승되었고 Acrylamide gel 로 고정화한 naringinase 와 유사한 결과⁽¹²⁾를 보여주었다.

(3) pH 안정성: 고정화 효소의 안정성에 미치는 pH의 영향을 검토하기 위해 McIlvain buffer 와 phosphate buffer 를 사용하여 pH를 각각으로 조절 한 것에 고정화 효소 0.5 g 을 加하여 실온에서 60 분간 정치시킨 후 증류수로 세척하였다. 세척한 고정화 효소에 다시 pH 7.0 의 0.02% naringin 용액 을 加하여 각각 반응시켜 잔존 효소 활성을 비교하였다.

Fig. 7 에 나타난 것과 같이 pH 5 이상에서는 안정한 것으로 나타났다.

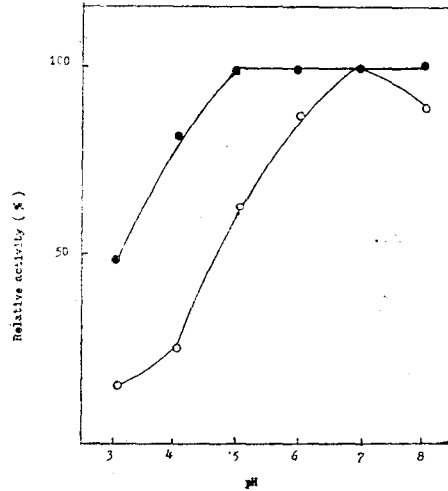


Fig. 7. Effect of pH on the Stability of Immobilized Naringinase.

○ free enzyme, ● immobilized enzyme

(4) 열 안정성: 각 온도에서 30분간 처리한 고정화효소 0.5 g 에 0.02% naringin 용액을 加하여 50°C 에서 1 시간 반응시킨 것으로 그 잔존 효소 활성을 비교한 것이다.

그 결과, 잔존 효소활성은 전보⁽¹²⁾와 Matsubara⁽¹⁴⁾ 등의 결과와 유사하게 50°C 이상에서 감소하였다.

(5) 反應速度에 미치는 온도의 영향: 반응속도에 미치는 온도의 영향을 Arrhenius plot 하여 Fig. 9 에 나타내었다.

직선의 기울기로 부터 활성화 에너지를 구하면

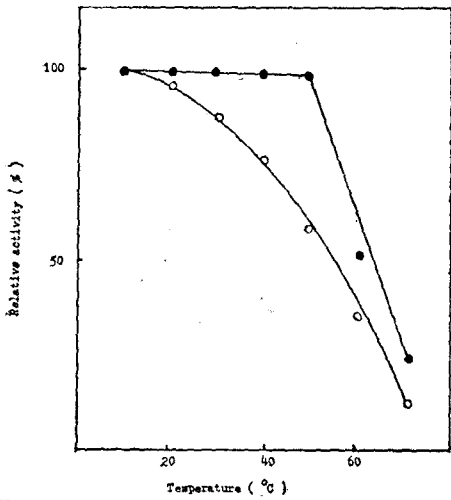


Fig. 8. Effect of Temperature on the Stability of Immobilized Naringinase.

○ free enzyme, ● immobilized enzyme

7.96 kcal/mole 이 되었다. 전보⁽¹²⁾의 13 kcal/mole 에 비하여 낮은 값을 보였다.

(6) 반응속도에 미치는 기질농도의 영향: 기질 농도를 0.03%에서 0.01%까지 변화시키면서 각 기질 농도에서의 반응 속도를 측정하여 Lineweaver-Burk plot 한 결과(Fig. 10), 고정화 효소의 겐보기 K_m 값은 $5.88 \times 10^{-4} M$ 이고 수용성 효소는 $6.67 \times 10^{-4} M$ 로 나타났다. 전보⁽¹²⁾보다 K_m 값이 약 10 배 감소하였으나 *Aspergillus niger* 가 생산하는 Naringinase 를 DEAE-Sephadex 에 고정화시킨 Ono

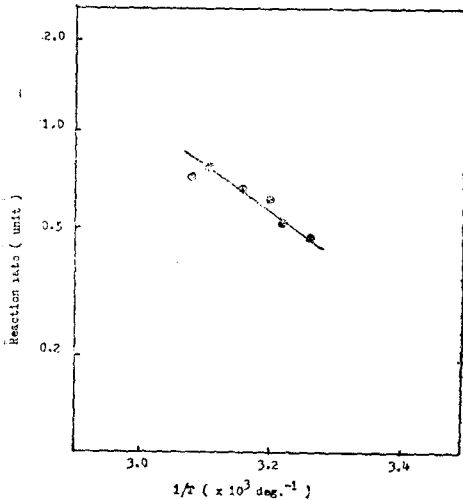


Fig. 9. Arrhenius Plot of Reaction Rate vs. Temperature.
 $E_a = 7.96 \text{ kcal/mole}$

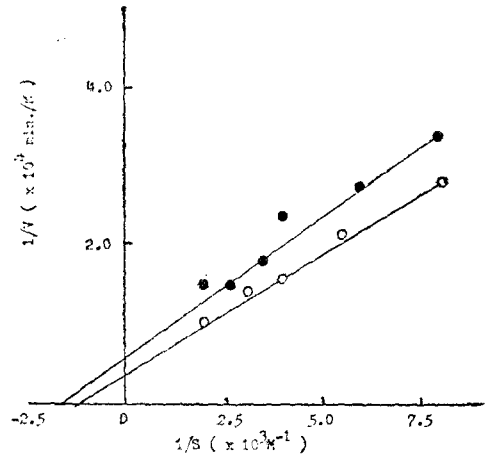


Fig. 10. Lineweaver-Burk Plot of the Effect of Concentration of Naringin on the Immobilized Naringinase and the Free Enzyme.

Reaction rates were measured under standard enzyme condition except for the concentration of naringin.

○ free enzyme $K_m' = 6.67 \times 10^{-4} M$,

● immobilized enzyme $K_m' = 5.88 \times 10^{-4} M$

(18) 등의 값($K_m' = 4.8 \times 10^{-4} M$)과는 거의 유사하였고 고정화 효소의 K_m' 값이 수용성보다 작은 것도 일치하였다.

고정화 효소의 K_m' 값이 작아지는 것에 대하여 Hornby⁽¹⁹⁾ 등은 그 원인의 하나로써擔體와 기질사이의 靜電氣的인 상호 작용으로 설명하였다.

3. 고정화 효소의 연속반응

고정화 naringinase 를 column 에 충전하고 Naringin 의 연속 가수분해 반응을 실시하고 column 내에서의 효소 반응을 검토하였다.

Column 내에서의 효소반응의 동력학적 고찰은 Bar-Eli 와 Katchalski⁽²⁰⁾가 이용한 Michaelis-Menten 식의 적분형을 변형한 식이 이용되었다. 즉,

$$[So] - [St] = K_m' \ln \left(\frac{[St]}{[So]} \right) + c/Q \quad \dots (1)$$

단, $[So]$ = 流入時 기질농도

$[St]$ = 流出時 기질농도

P = 기질변환율 $\left(\frac{[So] - [St]}{[So]} \right)$

C = column 내의 반응용량

Q = column 내의 유속

K_m' = column 내의 겐보기 Michaelis-constant

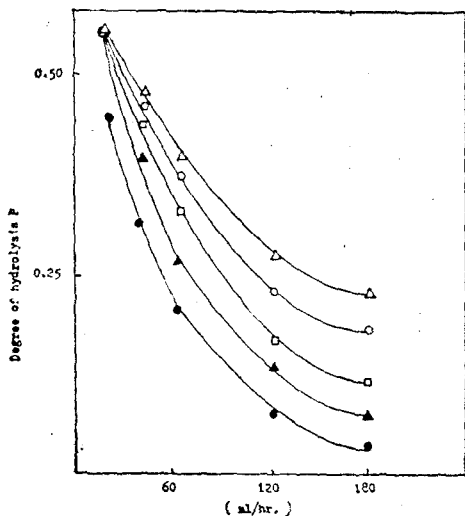


Fig. 11. Relationship between Degree of Hydrolysis of Naringin P, and Flow Rate Q, for a Column of Immobilized Naringinase with Initial Substrate Concentrations $1.16 \times 10^{-4} \text{M} (\Delta)$, $1.62 \times 10^{-4} \text{M} (\circ)$, $2.22 \times 10^{-4} \text{M} (\square)$, $3.40 \times 10^{-4} \text{M} (\blacktriangle)$ and $4.87 \times 10^{-4} \text{M} (\bullet)$ in Citrate-Phosphate Buffer, pH 7.

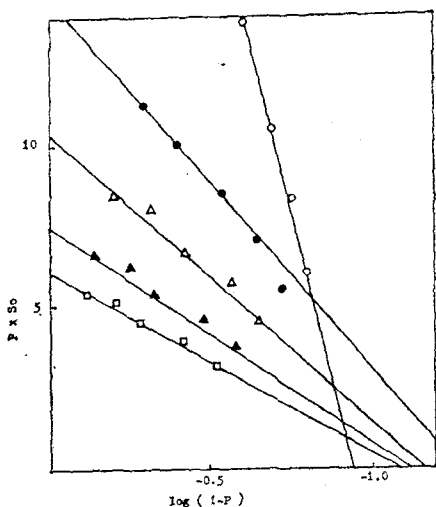


Fig. 12. Relationship between PS Log (1-P) for the Hydrolysis of Naringin in M/10 Citrate Phosphate Buffer, pH 7.0 by a Column of Immobilized Naringinase with Flow Rates 40 ml/hr. (○), 60 ml/hr. (●), 80 ml/hr. (▲) and 120 ml/hr. (□).

Column 에 충전된 고정화 효소는 擔體 1g (dry basis)을 넣고 충전한 것이며 column 내의 연속 가

수분해 반응에 대한 P와 Q의 관계는 Fig. 11에 나타내었다.

결과로 부터 流速에 따라 기질의 변환율이 제어되는 것을 알 수 있다.

이는 Shoji 등^(21,22)의 결과와 비교할 때, 流速이 낮을 때는 본 실험 결과가 가수분해율이 기질농도에 관계없이 일정한 점으로 집중하는 것이 다르지만 Lilly⁽²³⁾ 등의 결과와는 유사한 경향을 보여주고 있다.

Fig. 12에서는 P·[So]와 log(1-p)의 관계를 각각의 유속에서 구한 것으로 직선의 관계를 나타내고 있다.

위 직선의 절편에서 반응 용량 C를 구하여 유속 Q와의 관계를 Table 2에 나타내었다.

Table 3에서 Km'값이 수용성 Naringinase 보다는 작은 값을 보여주고 있다.

Table 2. Effect of Flow Rate on Column Reaction Capacity.

Flow rate; Q (ml/hr)	Column reaction capacity; C (mole/hr)
40	1.64×10^{-5}
60	0.89×10^{-5}
80	0.82×10^{-5}
100	0.75×10^{-5}
120	0.72×10^{-5}

Table 3. Values of the Michaelis Constant.

Conditions	Km'
Free naringinase	$6.67 \times 10^{-4} \text{M}$
Immobilized naringinase	
stirred suspension	$5.88 \times 10^{-4} \text{M}$
column Q=40(ml/hr)	4.74 × "
60 "	1.16 "
80 "	0.90 "
100 "	0.68 "
120 "	0.56 "

연속반응에 있어서도 유속이 증가함에 반비례하여 Km' 값이 감소하고 있다.

이와같은 Km' 값의 감소는 유속의 증가에 따라 경막의 물질 이동에 대한 저항이 감소되는 것으로 설명할 수 있다.

요 약

Aspergillus nidulans 가 생산하는 naringinase 를 DEAE-Sephadex A-25 를 사용하여 이온결합법으로 固定化시키는 조건과 그 고정화효소의 성질 및 column reactor 에서의 연속 반응에 대하여 연구 검토한 것을 요약하면 다음과 같다.

고정화 효소를 조제할 때에 효소가 擔體에 吸着되는 최적 pH 는 6.0 이었고 건조된 擔體 1g 에 대해 이상적인 수용성 효소의 量은 110 units 이었다.

고정화 naringinase 의 반응 최적 온도와 pH 는 각각 50°C 와 7.0 이며, 그 pH 안정성과 열 안정성은 수용성 효소보다 모두 높았다.

고정화 naringinase 의 활성화 에너지는 Arrhenius plot 에 의해 7.96 kcal/mole 이었고 겉보기 Km 값은 $5.88 \times 10^{-4} M$ 이었다.

고정화 naringinase 를 column 內에서 연속 반응시킬 때 Bar-Eli 등의 Michaelis-Menten 식의 적분형을 변형하여 流速와 가수분해도의 관계를 검토한 결과, 유속이 증가하면 가수분해도가 감소되었고 동시에 겉보기 Km 값도 감소하였다. 또한 반응량 (column reaction capacity) 은 유속이 증가함에 따라 서서히 감소하였다.

참고 문헌

- 1) Burdick, E. M., and R. H. Maurer: *U. S. Patent*, 2510797 (June 6, 1950).
- 2) Fox, D. W., W. L. Savage and S. H. Wender: *J. A. m. Chem. Soc.*, **75**, 2504 (1953).
- 3) Hall, D. H.: *Chemistry and Industry*, **57**, 473 (1938).
- 4) Ting, S. V.: *J. Agr. Food Chem.*, **6**, 546 (1958).
- 5) Thomas, D. W., C. V. Smythe and M. D. Labbee: *Food Res.*, **23**, 591 (1958).
- 6) 岸清: *科工*, **29**, 140 (1955).
- 7) Griffith, F. P., and B. J. Lime: *Food Technol.*, **13**, 430 (1959).
- 8) Dunlap, W. J., R. E. Hagen and J. H. Wender: *J. Food Sci.*, **27**, 597 (1962).
- 9) Okada, S., K. Kishi, M. Higashihara, and J. Fukumoto: *J. Agr. Chem. Soc.*, **37**, 84 (1963).
- 10) Bram, B. and G. L. Solomons: *Appl. Microbiol.*, **13**, 842 (1965).
- 11) 津坂辰男: *日本食品工業學會誌* **12**, 168 (1965).
- 12) 배동훈·변유량·유주현: *한국식품과학회지*, **10**, 209 (1978).
- 13) Davis, W. B.: *Analytical Chemistry*, **38**, 726 (1966).
- 14) Matsubara, M., M. Doi, Y. Kawamura and S. Morishita: *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **21**, 390 (1974).
- 15) 井上雅資, 岡田茂孝: *科工*, **43**, 642 (1969).
- 16) 유주현·문순옥·변유량: *한국산업 미생물학회지*, **6**, 59 (1978).
- 17) 변유량, 문순옥, 유주현: *한국산업미생물학회지*, **6**, 65 (1978).
- 18) Ono, M., T. Tosa and I. Chibata: *J. Ferment. Technol.*, **55**, 493 (1977).
- 19) Hornby, W. E., M. D. Lilly and E. M. Crook: *Biochem. J.*, **98**, 420 (1966).
- 20) Bar-Eli, A. and E. Katchalski: *J. Biol. Chem.*, **238**, 160 (1963).
- 21) Usami, S., N. Jiro and K. Goto: *J. Ferment. Technol.*, **49**, 598 (1971).
- 22) Uramii S. and Y. Kuratsu: *Ferment. Technol.*, **51**, 789 (1973).
- 23) Lilly, M. D., M. E. Hornby, and E. M. Crook: *Biochem. J.*, **100**, 718 (1966).