

Aspergillus sp. AN-11이 분비하는 도토리 Tannin 分解酵素의 精製와 物理化学的 性質

蔡洙圭 · 劉太鍾* · 金炳默**

서울保健專門大學 食品加工科

*高麗大學校 食品工學科

**中央大學校 食品加工學科

(1983년 4월 7일 수리)

Purification of Acorn Tannin Hydrolyzing Enzyme of *Aspergillus sp.* AN-11 and Physiochemical Properties of It

Soo Kyu Chae, Tai Jong Yu* and Byung Mook Kim**

Department of Food Technology, Seoul College of Health, Seoul 100

*Department of Food Technology, Korea University, Seoul 132

**Department of Food Processing, Choongang University, Seoul 151

(Received April, 7, 1983)

Abstract

Tannase of *Aspergillus sp.* AN-11 isolated from contaminated acorns was purified by a procedure involving ammonium sulfate precipitation, DEAE-cellulose column chromatography and Sephadex G-200 gel filtration. Physiochemical properties of the purified tannase was investigated. Tannase was purified about 37 folds with the yield of 49% from the culture broth of *Aspergillus sp.* AN-11. The purified tannase was homogeneous on polyacrylamide gel disc electrophoresis and was dissociable into two identical subunits on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The molecular weight of the tannase was determined to be 200,000 by gel filtration on Sephadex G-200. The purified tannase showed a typical protein ultraviolet spectrum. The enzyme had a optimum pH 5.5 and optimum temperature at 30 to 40 °C. The enzyme was stable at a pH range from 5.0 to 6.5 and at the temperature below 30 °C. The enzyme was inactivated remarkably by CuCl₂ and ZnCl₂. The Km value of the enzyme was 7.58 x 10⁻⁴ M.

序 論

Tannase (Tannin acyl hydrolase)는 tannin의 ester 및 depside 結合을 가수분해하여 gallic acid와 glucose를 생성하는 酵素로서 五倍子, Divi-divi pods 등 tannin 함량이 높은 植物組織 중에 존재하며, *Aspergillus* 및 *Penicillium*屬의 糸狀菌이나 일부 酵母에 의해 강

력히 분비되는 것으로 알려져 있다.⁽¹⁻³⁾

Haslam 등⁽⁴⁾은 Dowex-2 column chromatography에 의해 *Aspergillus niger*의 부분적으로 精製된 酵素를 얻었으며, Yamada 등⁽⁵⁻⁸⁾은 *Aspergillus oryzae* No. 7의 배양액으로부터 tannase를 精製하였고 加水分解 經路, 基質特異性 및 酵素의 阻害 등에 관하여 연구하였으며 Adachi 등⁽⁹⁻¹¹⁾은 *Aspergillus flavus*의 菌体

抽出液으로부터 酵素를 精製하였고 그의 物理化学的 및 触媒의 성질을 보고하였다. 한편 Nishira 등⁽¹²⁻¹⁴⁾은 토양으로부터 분리한 酵母 *Candida sp.* K-1의 배양액으로부터 tannase를 精製하여 몇가지 物理化学的 성질에 관해 보고하였다.⁽¹⁵⁻¹⁸⁾

이와같이 微生物 tannase에 관한 많은 연구가 수행되었으나 대부분이 基質로서 tannic acid나 methyl gallate를 이용한 酵素化学的인 연구였으며 실제로 加工에 障礙가 되는 식품 중의 tannin 성분의 분해를 목적으로 미생물을 분리하여 酵素를 생산, 정제 및 응용하고자 하는 연구보고는 그렇게 많지않다.

본 연구자들은 前報⁽¹⁹⁾에서 미생물 tannase를 이용하여 韓國産 도토리 중의 tannin 성분을 분해하기 위해 강력한 tannin분해 효소 생산 균주를 도토리 부패물로부터 분리하여 그의 효소 생산을 위한 최적 배양 조건을 검토한 바 있다.

본 실험에서는 이 균주 즉 *Aspergillus sp.* AN-11이 분비하는 tannase의 정제를 실시하였고, 그의 物理化学的 성질을 규명하였기에 이에 報告하는 바이다.

材料 및 方法

實驗材料

배지 조제용 도토리는 淸平 근교에서 채취한 것으로 서울 京東市場에서 구입하여 剝皮한 후 風乾시켜 분쇄하였고, 酵素基質로서 사용한 tannin은 이 도토리로부터 前報⁽¹⁹⁾와 같은 방법으로 抽出 精製한 것이다. Diethyl amino ethyl(DEAE)-cellulose는 Brown 사(U. S. A) 제품, Sephadex G-200은 Pharmacia Fine Chemicals사(Uppsala, Sweden) 제품을 사용하였다.

酵素 活性度 測定

Tannase활성도는 前報⁽¹⁹⁾와같은 방법으로 측정하였다. 단 酵素單位는 35°C에서 酵素液 1ml가 1分間에 1 μg의 도토리tannin 當量을 가수분해하는 酵素活性를 1單位(unit)로 정하였으며, 比活性은 酵素蛋白質 1mg당 酵素活性의 單位로 표현하였다.

蛋白質 濃度 測定

배양액을 여과한 粗酵素液의 蛋白質 농도는 micro-kjeldahl 법⁽²⁰⁾에 의해 측정하였으며, 精製 과정에서 효소액의 단백질 농도는 Layne⁽²¹⁾의 방법에 의해 280nm에서 흡광도를 측정하였다.

酵素의 精製

가. 粗酵素의 調製

前報⁽¹⁹⁾에서 報告한 바와같은 도토리 tannin분해 효소 생산 최적배지에서 *Aspergillus sp.* AN-11을 30°C, 72시간 연속 진탕배양(Stroke 5 cm, Oscillation

Crude enzyme extract, culture broth

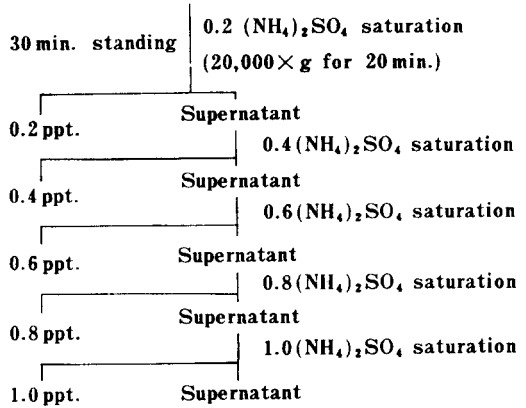


Fig. 1. Fractionation of crude enzyme extract with (NH₄)₂SO₄ saturation

120/min). 한 후 배양액을 여과하여 얻어진 여액을 粗酵素液으로 사용하였다.

나. 황산암모늄에 의한 침전

粗酵素液에 황산암모늄을 Fig. 1과 같은 방법으로 가하여 얻은 침전물을 증류수로 용해하여 20,000×g에서 20분간 냉동원심분리하여 모은 상정액을 증류수에 2일간 투석한 후 재원심분리하여 상정액을 0.01M acetate buffer, pH 5.0, 용액에서 24시간 투석하였다.⁽²²⁻²³⁾

다. DEAE-cellulose 컬럼크로마토그래피

透析한 酵素液을 0.01M acetate buffer, pH 5.0, 용액으로 평형시킨 DEAE-cellulose column(3.0×40cm)에 주입시킨 후 0.01M buffer, acetate pH 5.0, 용액과 0.01M acetate buffer 용액에 0.1M-NaCl 0.2M NaCl, 0.3M-NaCl의 농도로 하여 각각 300ml을 농도 순서대로 단계적으로 용출시켰다. 이때 용출속도는 시간당 20ml였으며 10ml획분으로 받았다.

라. Sephadex G-200에 의한 gel-filtration DEAE-cellulose column chromatography에서 酵素活性이 높게 나타난 획분의 효소액을 모아 투석한 후에 polyethylene glycol 6000 속에 묻어두어 농축시킨 후 Sephadex G-200 column(2×90cm)에 주입시킨 다음 0.01M acetate buffer, pH 5.0, 용액으로 시간당 10ml의 속도로 용출시켰다. 이상과 같은 精製方法을 Fig. 2에 요약하여 圖示하였다.

精製酵素의 物理化学的 性質

Ornstein⁽²⁴⁾과 Davis⁽²⁵⁾방법에 따라 polyacryl amide gel disc 전기영동을 실시하였으며, Spectrophotometer(Perkin-Elmer Model Lambda 1)에 의해 UV 흡수스펙트럼을 측정하였다. Sephadex G-200에

Culture broth
Precipitated with ammonium sulfate, filtered.

Precipitate
Dissolved in distilled water, centrifuged, The supernatant was dialyzed against distilled water

Dialyzed solution
Centrifuged.

Supernatant
Dialyzed against 0.01M-acetate buffer, pH 5.0, for 24 hrs at cold room.

Dialyzed solution (fraction 1)
Chromatographed on DEAE cellulose column, stepwise elution of the concentration of sodium chloride.

Active fraction
Dialyzed against 0.01M-acetate buffer, pH 5.0

Dialyzed solution (fraction 2)
Concentrated with polyethylene glycol 6000 (J.P.).

Concentrated solution
Chromatographed on Sephadex G-200 column, eluted with 0.01M-acetate buffer, pH 5.0.

Active fraction (fraction 3)
Rechromatographed on Sephadex G-200 column.

Active fraction (fraction 4)
(Lyophilized)

Purified tannase

Table 1. Tannase activities in fractions of the crude extract with ammonium sulfate

Fractions	Total protein (mg)	Total protein (units)	Specific activity (units/mg protein)
0.2	20.0	—	—
0.4	16.1	38.64	2.40
0.6	38.5	222.18	5.77
0.8	41.2	5475.22	132.89
1.0	65.8	354.40	5.39
Super.	57.6	209.30	3.63

Fig. 2. Purification of tannase

의한 gel-filtration을 실시하여 분자량을 측정하였으며, sodium dodecyl sulfate (SDS) - polyacrylamide gel 전기영동을 실시하여 Subunit의 구조 및 분자량을 조사하였다. (26-35)

pH안정성, 最適 pH, 溫度 安定性, 最適溫度, 金屬 이온의 영향 및 基質濃度의 영향 등 一般的 性質을 常法에 따라 검토하였다.

結果 및 考察

酵素의 精製

황산 암모늄의 각 포화도별 회분의 침전에 포함된 효소의 활성도를 측정된 결과는 Table 1과 같다. 즉, (NH₄)₂SO₄ 포화도 0.8에서 효소 활성이 가장 우수하였으며, 효소 활성의 회수율은 약 87% 정도로 높게 나타났다. 황산암모늄의 포화도 0.8의 회분의 침전을 모아 투석한 효소액을 DEAE cellulose column에 흡

착시켜 0.01M acetate buffer, pH 5.0, 과 0.01M acetate buffer 용액에 0.1M, 0.2M, 0.3M-NaCl을 사용하여 단계적으로 용출시킨 결과는 Table 2 및 Fig. 3과 같다. 즉 Fig. 3의 溶出曲線에서 보는 바와 같이 粗tannase의 蛋白質帶는 4개의 劃分으로 분리되었으며, 그중 3개의 劃分만이 tannase의 활성을 보였다. 이들 중 tannase의 比活性 및 回收率이 가장 높은 0.01M acetate buffer 용액에 0.1M NaCl 농도에서 용출되는 劃分(No. 31~60)을 모아 투석한 후 5℃에서 500g의 polyethylene glycol 6000속에서 묻어두어 용액의 부피가 약 10ml가 되도록 농축한 다음 S-sephadex G-200 column에 주입하여 0.01M acetate buffer, pH 5.0, 용액으로 용출시켜 5 ml씩 劃分하였다. 蛋白質의 농도와 酵素活性度를 측정된 결과는 Fig. 4와 같다. Fig. 4의 溶出曲線에서 효소 활성도가 높은 劃分(No. 56~85)을 모아 透折 및 濃縮을 실시한 후 Sephadex G-200에 의한 gel filtration을 반복 실

Table 2. Tannase activities of each fraction in DEAE cellulose column chromatography

Fractions	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg protein)	Recovery (%)
D ₁	15.05	—	—	—
D ₂	17.44	8754.5	501.98	78.1
D ₃	18.57	1402.9	75.55	12.5
D ₄	11.93	334.2	28.01	3.0
Crude tannase	85.10	11214.5	131.78	100.0

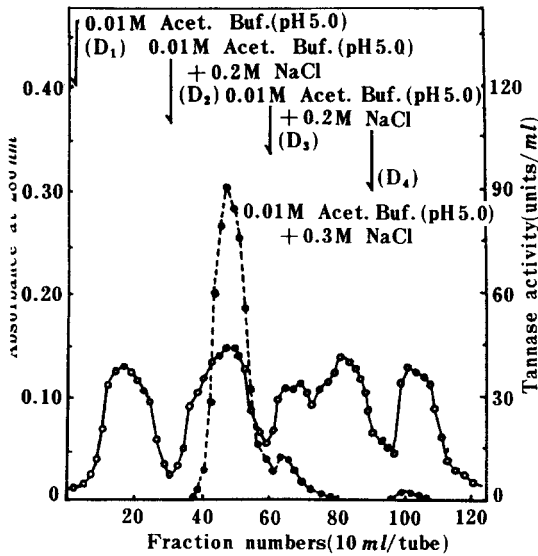


Fig. 3. Stepwise elution pattern of crude tannase on DEAE cellulose column.

Size of column: 3.0×40 cm, flow rate: 20 ml/hr. DEAE cellulose was equilibrated with 0.01M acetate buffer, pH 5.0.

—○—: protein, ----●----: tannase activity.

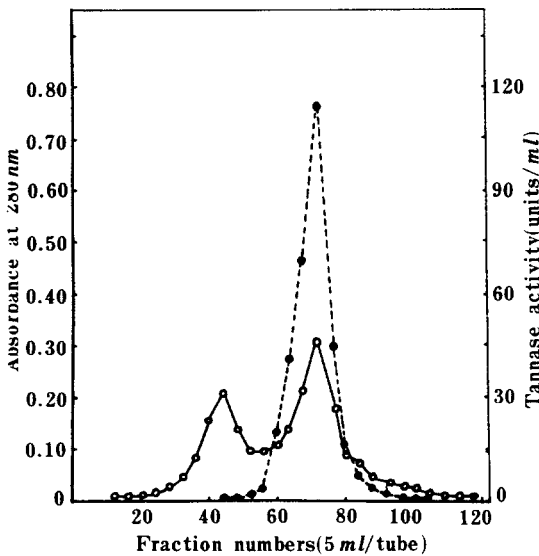


Fig. 4. Gel-filtration of the tannase on Sephadex G-200

Size of column: 2.0×90 cm, flow rate: 10 ml/hr. A column of Sephadex G-200 was equilibrated with 0.01M acetate buffer, pH 5.0. Elution was performed with the same buffer.

—○—: protein, ----●----: tannase activity.

시하였다. 단백질의 농도와 효소 활성도를 측정한 결과는 Fig. 5와 같다. 즉, 용출곡선에서 단일 peak가 얻어졌으며 단백질대와 효소활성도가 거의 비슷하게 일치되고 있어 효소가 비교적 고도로 정제되었음을 알 수 있다. 따라서 No. 60~80의 획분을 모아 精製酵素로 사용하였으며, Table 3에서 보는 바와 같이 比活性은 934.55(units/mg protein)로 粗酵素에 비하여 약 37배 정제되었고 효소활성의 回收率도 49%를 나타내었다.

精製酵素의 物理化学的 性質

가. polyacrylamide gel disc 전기영동

7.5% polyacrylamide gel (pH 8.3)을 조제하여 전기영동을 실시한 결과는 Fig. 6과 같다. 즉 Fig. 6의 전기영동 패턴에서 보는 바와같이 본 정제 효소는 단일한 것으로 판단할 수 있다.

나. UV 흡수 스펙트럼

UV-spectrophotometer를 이용하여 본 tannase의 UV흡수 스펙트럼을 측정한 결과는 Fig. 7과 같다. 즉 본 효소는 전형적인 단백질 스펙트럼을 나타내었으며 280nm에서 최대 흡수 스펙트럼을 보였고, 280nm와

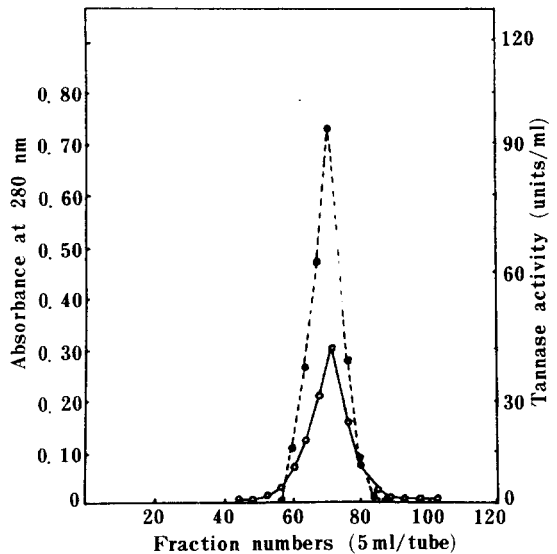


Fig. 5. Regel-filtration of the tannase on Sephadex G-200.

Size of column: 2.0 x 90 cm, flow rate: 10 ml/hr. A column of Sephadex G-200 was equilibrated with 0.01M acetate buffer, pH 5.0. Elution was performed with the same buffer.

—○—○— : protein, ----●---- : tannase activity.

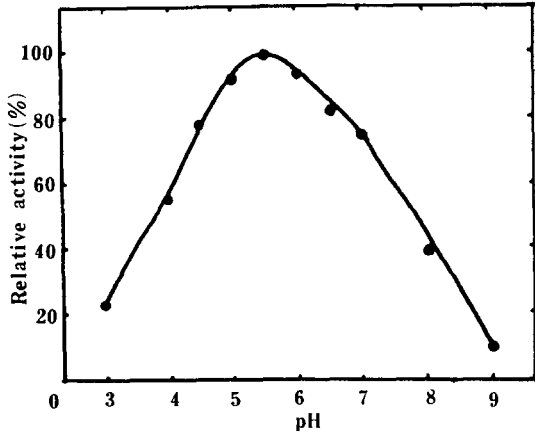


Fig. 12. Effect of pH on the activity of tannase
Buffers used were 0.01M acetate buffer (pH 3~4), 0.01M phosphate buffer (pH 5~7), 0.01M carbonate buffer (pH 8~9).

서 높은 활성을 나타내고 있으며 최적 pH는 5.5로 볼 수 있다. *Aspergillus oryzae* No. 7의 tannase는 pH 5.5, *Aspergillus flavus*는 pH 5.0~5.5 그리고, *Candida sp.*, K-1의 tannase는 pH 6.0이 각각 최적 pH로 알려져 있다.^(7,9,13) 따라서 이상의 보고와 비교하여 볼때 본 실험에 사용된 *Aspergillus sp.*, AN-11의 tannase도 거의 비슷한 최적 pH를 가지고 있음을 알 수 있다.

마. 온도의 영향

pH 5.5의 0.05M citrate buffer용액에 녹인 효소를 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 및 80°C의 온도로 각각 20분간 유지시킨 후 잔류하는 효소 활성(%)을 측정하여 온도안정성을 조사한 결과는 Fig. 13과 같다. 즉

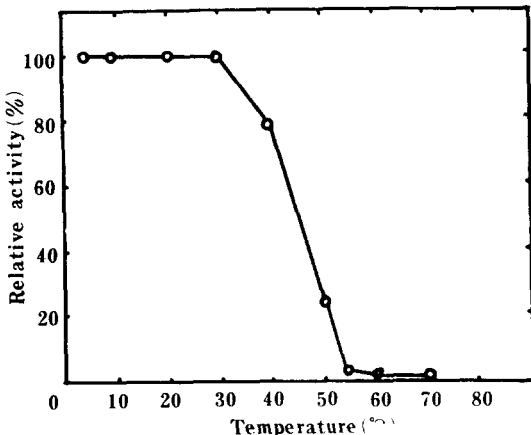


Fig. 13. Effect of temperature on the stability of tannase

本 tannase는 30°C에서 안정하였고 60°C에서 20분간 유지하므로서 효소 활성은 거의 소실되었다. *Aspergillus cryzae* No. 7의 tannase는 30°C이하에서 안정하였으며, 55°C에서 20분 또는 85°C에서 10분 처리로 효소 활성이 완전히 소실되었다.⁽⁷⁾ *Aspergillus flavus*의 경우는 60°C까지 안정하였으며 70°C 이상에서 효소는 급속히 파괴되었다.⁽⁹⁾ 효모 *Candida sp.*, K-1의 tannase는 40°C까지 안정하였고 70°C에서 이 효소는 급속히 변성되어 失活되었다고 각각 보고되어 있다.⁽¹³⁾ 이상의 보고와 비교하여 볼때 本 tannase는 *Aspergillus oryzae* No. 7의 tannase와 거의 유사하였으며, *Aspergillus flavus*나 효모 *Candida sp.*, K-1의 tannase보다 耐熱성이 약함을 알 수 있다.

한편 反應液의 온도를 10~60°C의 범위로 조절하여 酵素活性을 측정하여 最適溫度를 조사한 결과는 Fig. 14와 같다. 즉 本 tannase의 반응 최적온도는 30~40°C로 볼 수 있다. *Aspergillus oryzae* No. 7의 tannase의 반응 최적온도는 30~40°C, *Aspergillus flavus*의 경우는 50~60°C, *Candida sp.*, K-1은 50°C로 각각 보고되어 있다.^(7,9,13) 따라서 반응 최적온도 역시 온도 안정성의 경우와 마찬가지로 *Aspergillus oryzae* No. 7의 경우와 거의 유사하였다.

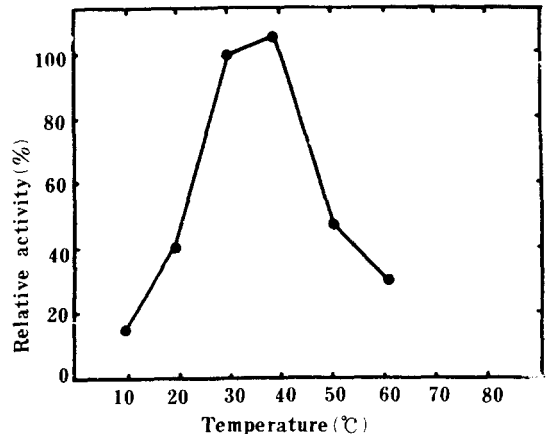


Fig. 14. Effect of temperature on the activity of tannase

바. 금속이온의 영향

酵素液에 KCl, MgCl₂·6H₂O, CaCl₂, BaCl₂·2H₂O, MnCl₂·4H₂O, NiSO₄·7H₂O, CuCl₂·2H₂O, ZnCl₂, (NH₄)₂M₂O₇·4H₂O, AlCl₃·6H₂O 및 FeCl₃·6H₂O를 10⁻³M이 되도록 첨가하여 30분간 유지시킨 후에 각각 酵素活性을 측정한 결과는 Table 4와 같다. Table 4에서 보는 바와같이 실험에 사용된 거의 모든 금속염이 다소의 차이가 있기는 하나 효소 활성을 阻

Table 4. Effect of various metal ions on tannase activity

Metal ions (10 ⁻³ M)	Relative activity (%)
None	100
KCl	88
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	96
CaCl ₂	95
BaCl ₂ · 2 H ₂ O	80
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	55
NiSO ₄ · 7 H ₂ O	63
CuCl ₂ · 2 H ₂ O	35
ZnCl ₂	37
(NH ₄) ₂ Mo ₇ O ₂₄ · 4 H ₂ O	78
AlCl ₃ · 6 H ₂ O	84
FeCl ₃ · 6 H ₂ O	92

害하는 것으로 나타났으며 특히 CuCl₂와 ZnCl₂의 첨가로 약 65%의 효소 활성이 소실되었다.

사. 基質濃도의 영향

基質인 정제된 도토리 tannin 용액의 농도를 0.05 ~ 5%로 변화시켜 基質의 초기 분해속도를 측정하고, 이 분해 속도와 기질 농도와의 관계를 Lineweaver - Burk의 방법⁽²⁶⁻³⁷⁾에 따라 圖示한 결과는 Fig. 15와 같으며, 이 그래프로부터 구한 酵素의 基質 도토리 tannin에 대한 Michaelis Menten constant(Km)는 7.58 × 10⁻⁴M이었다. 이때 基質인 도토리 tannin의 平均分子량은 940으로 하였다. Yamada등⁽⁹⁾의 연구보고에 의하면 *Aspergillus flavus*가 분비하는 tannase의 Km 값은 基質로서 tannic acid, glucose-1-gallate 및 methyl gallate를 사용하였을 때 각각 0.5 × 10⁻⁴M, 1.4 × 10⁻⁴M 및 8.6 × 10⁻⁴M이었다. 本 酵素의 경우도 Yamada등이 조사한 Km값과 비슷한 수준이었으며, 특히 methyl gallate를 基質로서 사용한 경우와 거의 유사한 수준으로 나타났다.

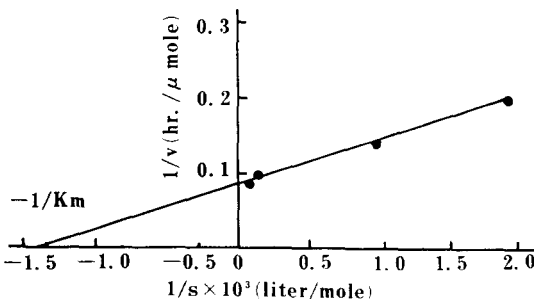


Fig. 15. Effect of acorn tannin concentration on the activity of purified tannase

要約

도토리 부패물로부터 분리한 *Aspergillus sp.*, AN-11 균주가 분비하는 tannase를 일련의 ammonium Sulfate에 의한 침전, DEAE-Cellulose Column Chromatography 및 Sephadex G-200 gel filtration 방법에 의하여 정제하여 물리화학적 성질을 규명하였다.

정제된 tannase는 比活性이 精tannase에 비하여 37배정도 증가되었으며, 효소활성이 1배는 약 49%이었다.

정제된 tannase는 polyacrylamide gel 전기영동에 의한 균일성을 나타내었고, SDS-polyacrylamide gel 전기영동에서는 단일 밴드를 형성하는 두개의 동일한 subunits로 분리되었으며, 본 도토리 tannin분해 효소의 분자량은 200,000 정도로 계산되었다.

정제된 tannase는 전형적인 단백질 UV흡수 스펙트럼을 나타내었으며, 한편 최적 pH 및 온도는 5.5 와 30~40°C 이었고 pH 5.0~6.5와 온도 30°C 이하의 범위 내에서 비교적 안정성을 보였으며, CuCl₂ 및 ZnCl₂금속염에 의해서는 효소활성이 크게 저해되었다. 또한 정제된 tannase의 Km 값은 7.58 × 10⁻⁴M이었다.

References

- Mugibayashi, Y., Nishira, H., Nishitai, Y. and Nike, R.: *J. Ferment. Assn. (Japan)*, 23, 50 (1965)
- Madhavakrishina, W., Bose, S. M. and Nayudama, Y.: *Bull. Cent. Leath. Res. Inst., Madras (India)*, 8, 153 (1961)
- Ikeda, Y., Takahashi, E., Yokogawa, K. and Yoshimura, Y.: *J. Ferment. Technol. (Japan)*, 50 (6), 361 (1972)
- Haslam, E., Haworth, R. D., Jones, K. and Rogers, H. J.: *J. Chem. Soc.*, 1829 (1961)
- Yamada, K., Iibuchi, S. and Minoda, Y.: *J. Ferment. Technol. (Japan)*, 45, 233 (1967)
- Iibuchi, S., Minoda, Y. and Yamada, K.: *Agr. Biol. Chem.* 31, 513 (1967)
- Iibuchi, S., Minoda, Y. and Yamada, K.: *Agr. Biol. Chem.*, 32, 803 (1968)
- Iibuchi, S., Minoda, Y. and Yamada, K.: *Agr. Biol. Chem.*, 36, 1553 (1972)
- Yamada, H., Adachi, O. and Watanabe, M.: *Agr. Biol. Chem.*, 31, 1070 (1968)
- Adachi, O., Watanabe, M., and Yamada, H.

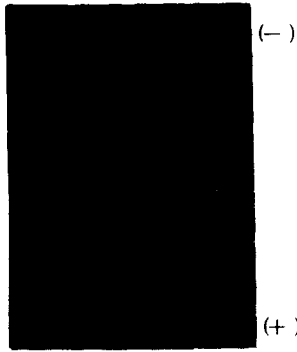


Fig. 6. Polyacrylamide gel disc electrophoretic pattern of purified tannase

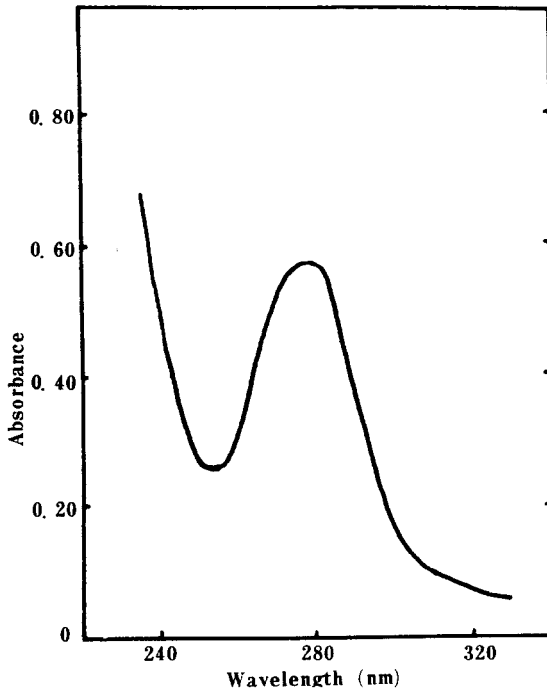


Fig. 7. UV absorption spectra of purified tannase

260nm의 흡수 비율은 1.89이었다. 이는 Adachi등⁽¹⁰⁾이 보고한 *Aspergillus flavus*의 tannase 경우의 흡수비율 1.96보다 약간 적은 값을 보여주고 있다.

다. 分子量 測定

Sephadex G-200 column을 사용하여 본 tannase 및 각 標準蛋白質에 대한 V_e/V_o 와 분자량의 對數 사이의 관계를 조사한 결과는 Fig. 8과 같다. 즉, Fig. 8에서 보는 바와같이 본 tannase의 분자량은 200,000 정도임을 알 수 있다. 이는 Iibuchi등⁽⁷⁾이 측정한 *Aspergillus oryzae* No. 7의 tannase의 분자량 약 200,000과 Aoki등⁽¹¹⁾이 측정한 酵母 *Candida sp.* K

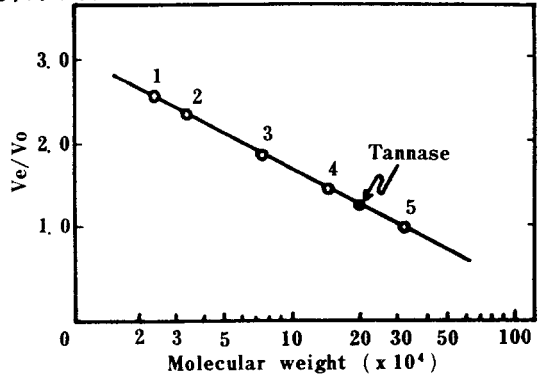


Fig. 8. Estimation of molecular weight of tannase by Sephadex G-200 gel filtration

V_e in the margin is the elution volume of each protein and V_o , the void volume of the column, was determined by using Blue Dextran 2000.

Standard proteins were : 1, trypsin ; 2, pepsin ; 3, serum albumin ; 4, γ -globulin, and 5, fibrinogen.

- 1의 tannase의 분자량 250,000정도와 거의 유사한 값을 나타내고 있다.

한편 본 tannase를 25% glycerol, 1% SDS와 5% 2-mercaptoethanol을 함유하는 pH 7.2의 0.01M sodium phosphate buffer용액으로 실온에서 2일간 처리한 후 SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 실시한 결과는 Fig. 9와 같다. Fig. 9의 전기영동 패턴에서 보는 바와같이 변성된 tannase는 gel상에 단일 밴드를 형성하였다. 한편 이 효소 단백질의 분자량을 SDS-polyacrylamide gel 상에서 標準蛋白質의 移動度와 비교하여 측정한 결과는 Fig. 10에서 보는 바



Fig. 9. SDS-polyacrylamide gel electrophoretic pattern of purified tannase

Table 3. Summary of purification procdures of tannase from *Aspergillus sp.* AN-11

Step	Total volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (unit × 10 ³)	Specific activity (units/mg protein)	Recovery (%)	Purification fold
Culture broth	2500	14375	365.0	25.39	100.0	1.0
(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitate (Fraction 1)	312	2474	326.0	131.78	89.3	5.2
DEAE-cellulose (Fraction 2)	80	507	254.5	501.97	69.7	19.8
Gel-filtration (Fraction 3)	60	213	191.6	899.53	52.5	35.4
Regel-filtration (Fraction 4)	60	191	178.5	934.55	48.9	36.8

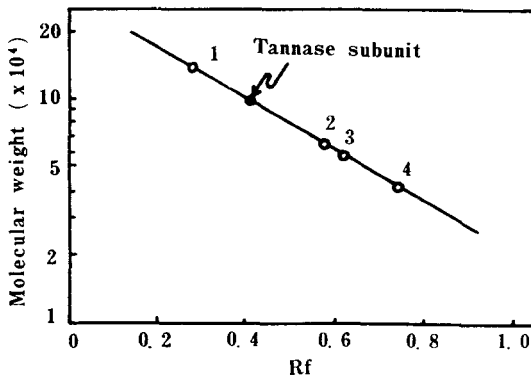


Fig. 10. Estimation of molecular weight of tannase by SDS polyacrylamide gel electrophoresis
 Standard proteins were : 1, serum albumin (dimer); 2, serum albumin (monomer)
 : 3, catalase (beef liver) : 4, ovalbumin

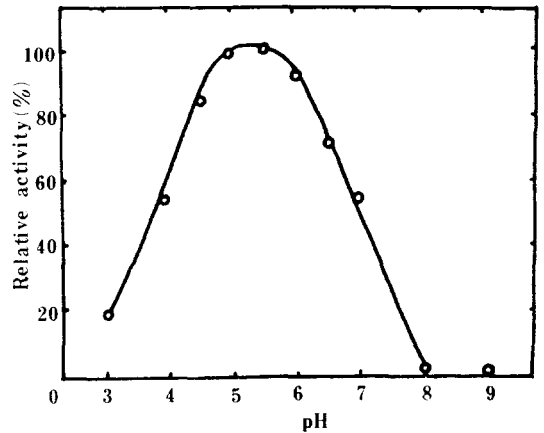


Fig. 11. Effect of pH on the stability of tannase
 The enzyme was incubated in various buffer (pH 3~4, 0.01M acetate buffer; pH 5~7, 0.01M phosphate buffer; pH 8~9, 0.01M carbonate buffer) at 5°C for 24 hrs.

와같이 100,000 정도로 추정되었다. 그러나 Sephadex G-200 column을 이용하여 본 tannase의 분자량을 측정 한 결과는 200,000 정도이었다.

따라서 이와같은 결과로 보아 본 효소는 SDS와 2-mercaptoethanol 처리에 의해 변성되었으며, SDS-polyacrylamide gel 전기영동 패턴에서 보는 바와같이 100,000의 분자량을 가진 두개의 동일한 subunit로 분리된 것으로 추정할 수 있다.

라. pH의 영향

所定의 pH가 되도록 각각 조절한 0.01M buffer 용액에 24시간 동안 유지시킨 후에 잔류하는 효소 활성 (%)을 측정하여 pH안정성을 비교한 결과는 Fig. 11과 같다. 즉 본 tannase는 pH 4.5~6.5의 범위에서 안정하였으며 pH 4.0이하 또는 pH 6.5이상에서는 안정성이 급격히 저하되었다.

Aspergillus oryzae No. 7의 tannase는 12시간 유지하였을 경우는 pH 3.0~7.5, 25시간 유지하였을 경우에는 pH 4.5~6.0의 범위에서 안정하였으며,⁽⁷⁾ *Aspergillus flavus*의 tannase는 12시간 유지하였을 때 pH 5.0~5.5의 범위에서 효소의 失活이 거의 없었다.⁽⁸⁾ 한편 효모 *Candida sp.*, K-1의 tannase는 pH 3.5~7.5의 범위에서 비교적 안정한 것으로 보고되어 있다.⁽¹³⁾ 이상의 연구보고와 본 실험군의 tannase와 비교하여 볼 때 pH 7.5 이상의 알카리성 pH에서는 불안정한 반면 pH 5.0, pH 6.0의 약산성 pH에서는 매우 안정한 특성을 가지고 있었다.

한편 基質 용액의 pH를 3.0~9.0의 범위로 조절하여 효소의 活性도를 측정하여 最適 pH를 조사한 결과는 Fig. 12와 같다. 즉 본 tannase는 pH 5.0~6.5에

- Vol. 15, No. 4 (1983) *Aspergillus sp.* AN-11이 분비하는 도토리 Tannin分解酵素의
精製와 物理化学的 性質 (341)
- : *Agr. Biol. Chem.*, 32, 1079(1968)
11. Adachi, O., Watanabe, M. and Yamada, H. :
J. Ferment. Technol., 49, 230(1971)
 12. Nishira, H., Shimokawa, S., Aoki, K. and
Shinke, R. : *Sci. Rept. Fac. Agric. Kobe Univ.*,
13. (2), 325(1979)
 13. Aoki, K., Shinke, R., and Nishira, H. : *Agr.
Biol. Chem.*, 40, 79(1976)
 14. Aoki, K., Shinke, R., and Nishira, H. : *Agr.
Biol. Chem.*, 40, 297(1976)
 15. Nishira, H. and Joslyn, M. A. : *Phytochem.* 7,
2147(1968)
 16. Joslyn, M. A., Nishira, H. and Ito, S. : *J.
Sci. Food. Agric.*, 19, 543(1968)
 17. Aoki, K., Tanaka, T., Shinke, R. and
Nishira, H. : *J. Chromatogr.* 170(2), 446
(1979)
 18. Aoki, K., Kajiwara, S., Shinke, R. and
Nishira, H. : *Anal. Biochem.* 95, 575(1979)
 19. Chae, S. K. and Yu, T. J. : *Korean J. Food
Sci. Technol.* 5, 258(1973)
 20. Ballentine, R. : *Methods in Enzymology* ed. by
Colowick, S. P. and Kaplan, N. O., Academic
Press, 3, 984(1957)
 21. Layne, E. : *Methods in Enzymology* ed. by
Colowick, S. P. and Kaplan, N. O., Academic
Press, 3, 447(1957)
 22. Green, A. A. and Hughes, W. L. : *Methods
in Enzymology* Ed. by Colowick, S. P. and
Kaplan, N. O., Academic Press, 1, 67(1955)
 23. Mcphie, P. : *Methods in Enzymology*, ed. by
Colowick, S. P. and Kaplan, N. O., Academic
Press, 22, 23(1971)
 24. Ornstein, L. : *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121(2),
321(1964)
 25. Davis, B. J. : *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121(2), 404
(1964)
 26. Shuster, L. : *Methods in Enzymology*, ed. by
Colowick, S. P. and Kaplan, N. O., Academic
Press, 22, 412(1971)
 27. Gabriel, O. : *Methods in Enzymology*, ed. by
Colowick, S. P. and Kaplan, N. O., Academic
Press, 22, 565(1971)
 28. Whitaker, J. R. : *Anal. Chem.*, 35, 1950(1963)
 29. Andrews, P. : *Biochem. J.*, 91, 222(1964)
 30. Locascio, G. A., Tigier, H. A. and Batlle, A.
M. delc : *J. Chromatogr.*, 40, 453(1969)
 31. Reiland, J. : *Methods in Enzymology*, ed. by
Colowick, S. P. and Kaplan, N. O., Academic
Press, 22, 287(1971)
 32. Cooper, T. G. : *The Tools of Biochemistry*,
John Wiley & Sons, N. Y. p.169(1977)
 33. 日本化学会編 : 新実験化学 講産, 生物化学 I, 丸
善株式会社, p.109(1978)
 34. Gaal, O., Medgyesi, G. A. and Vereczkey, L.
: *Electrophoresis in the Separation of
Biological Macromolecules*, John Wiley & Sons,
N. Y. p.203(1980)
 35. Weber, K. and Osborn, M. : *J. Biol. Chem.*,
244, 4406(1969)
 36. Lineweaver, H. and Burk, D. : *J. Am. Chem.
Soc.*, 56, 658(1934)
 37. Trevorpalmer, B. A. : *Understanding Enzymes.*
John Wiley & Sons, N. Y., p.119(1981)