

Byssochlamys fulva 가 생성하는 펙틴질분해효소에 관한 연구

— 1. Polygalacturonase 의 適正 生産條件 —

南榮重 · 金南洙 · 洪淳佑*

(農漁村開發公社 食品研究所, *서울大學校 自然大 微生物學科)

Studies on the Pectolytic Enzymes from *Byssochlamys fulva*

— 1. Optimum Conditions for the Production of Polygalacturonase —

NAM, Young Jung, Nam Soo KIM and Soon Woo HONG*

(Food Research Institute, Agriculture and Fishery Development Corporation,

*Dept. of Microbiology, Seoul National Univ.)

ABSTRACT

Effects of carbon sources, incubation time, incubation temperature, initial incubation pH, and vitamin B complex on the polygalacturonase activity of *Byssochlamys fulva* were studied to confirm the optimum conditions for the production of that enzyme.

When pectin was used as carbon source, polygalacturonase activity reached to the maximum value of 0.50 units/ml. After 5 days of incubation, polygalacturonase activity reached to its maximum of 0.48 units/ml. Polygalacturonase activities were similar between 25°C and 45°C, however, decreased dramatically in the outside of this range. Polygalacturonase activity was not significantly influenced by the variation of initial incubation pH. However, at pH5.0, polygalacturonase activity was slightly higher than any other incubation pH. Polygalacturonase activity was increased greatly through the addition of thiamine and riboflavin, and the optimum concentrations were $10^{-2}M$ in case of thiamine and $10^{-3}M$ in riboflavin.

緒 論

펙틴질은 高等 植物의 細胞壁의 構成成分으로서, 乾物量의 10~35%를 차지하고 있으며, 果汁 속에서는 蛋白質과 重合體를 形成하여 혼탁 현상, 가열취의 원인이 되기도 한다. galacturonic acid의 α -1,4 結合體이며 分子量은 20,000

에서 400,000 정도이다.

펙틴질을 分解하는 펙틴 분해 효소들은 果實이나 야채에 源泉的으로 存在하기도하나(Heinrichov'a 1976), (Pressey 等, 1972). 微生物 그중에서도 특히 곰팡이 由來의 효소가 工業的으로 利用되고 있다(Archer, 1979), (Basham 等, 1975), (Dennis 等, 1979), (Harper 等, 1972), (Ulrich, 1975), (Hancck, 1966).

미생물 분비 효소들은 果實이나 통조림 등의 腐敗 현상을 일으키기도 하나, 이러한 性質을 利用하여 주스의 抽出 및 淸澄, wine의 淸澄에 使用할 수 있다(Richardson), (Cole 등, 1961), (Rombouts 등, 1978), (Neubeck 등, 1975). 또한 果汁 淸澄에는 펙틴 분해 효소뿐 아니라 hemicellulase, cellulase 등이 關여하는 것으로 알려져 있다.

Olliver 등(1934)은 *B. fulva*의 펙틴 分解酵素를 처음 발견하였고, Beaven 등(1949)은 *B. fulva*에 의한 果實의 分解는 protopectinase와 dis-aggregation enzyme의 作用이라고 報告하였고, Reid(1951)는 *B. fulva*가 polygalacturonase와 pectinesterase를 生成한다고 보고하였다.

Chu 등(1973)은 *B. fulva*의 8개의 strain에 대하여 펙틴 分解酵素의 存在 여부를 검토하고, polygalacturonase가 어떠한 경우에도 存在한다는 사실을 밝혀냈다. Hatcher 등(1979)은 *Byssoschlamys*屬에 포함되는 곰팡이들에 대하여 成長條件과 熱 抵抗性 등을 研究하여, 胞子が 열 저항성을 지니고 있고, 30 Brix의 apple drink base에서는 菌의 生育이 抑制된다고 報告하고 있다.

本 研究에서는 *B. fulva*가 生産하는 펙틴 分解酵素中 polygalacturonase의 適正 生産條件을 調査하고자 一聯의 實驗을 行하였기에 그 結果를 報告한다.

材料 및 方法

1. 實驗 材料

使用 菌株. *B. fulva*(ATCC 10099)를 使用하였다.

使用 培地. Czapek-Dox 培地를 使用하였다.

酵素 反應 基質. Sigma社 polygalacturonic acid를 購入하여, 酵素 反應의 基質로 하였다.

2. 實驗 方法

準 培養(Subculture). Agar slant에서 接種棒으로 *B. fulva*의 菌體를 取한 後 500 ml 三角 플라스크에 있는 100 ml의 液體 培地에 接種하고, 25°C에서 5日間 振盪 培養하여서 準 培養液으로 하였다.

本 培養. 準 培養液 1 ml를 正確하게 取하여, 500 ml 三角 플라스크에 있는 100 ml의 液體 培地에 添加한 후, 培養條件에 따라 振盪 培養하였다.

粗酵素液 調製. 培養후, 培養液을 Sorvall RC-5 B 冷凍 高速 遠心分離機(Dupont社)를 使用하여, 12,000g에서 원심분리하고, 上澄液을 粗酵素液으로 하였다.

基質溶液 調제. 0.05M 醋酸 buffer(pH 5.2, 0.1M NaCl 포함)에 polygalacturonic acid를 0.5% 濃度로 添加한 후, 酵素反應의 기질 용액으로 하였다. 이때, 효소 반응의 온도는 30°C로 하였다.

酵素 活性 測定 方法. Dinitrosalicylic acid(DNS)法에 依하여, 還元기(reducing group)를 定量하였다(Miller, 1959). 즉, 기질 10 ml에 粗酵素液 1 ml를 가한 후, 各 시간별(2, 5, 10, 20, 30, 60分)로 환원기의 生成을 보았다. 정해진 時間이 지난 후, 酵素 反應液에 2N HCl 1 ml를 가하여 反應을 中止시키고, 13,000 g에서 10分間 냉동 원심 분리한 후, 上澄液 1 ml를 試驗管에 넣고 3ml의 DNS 시약을 더하여 水槽上에서 5分間 끓여준 후, 室溫으로 冷却하고 부피를 20 ml로 해 준다. 550nm에서 물을 100%로 맞춘 후 試料의 %T를 읽는다. 標準品으로 α -D-galacturonic acid를 0~2.0mg/ml의 濃度로 만들어 준 후, 표준 용액 1 ml에 DNS 시약 3 ml를 가한 후 위와 같이 반응시킨 후 %T를 읽는다. 이때, 分當 1 μ mole의 환원기(α -D-galacturonic acid equivalent)가 生成되는 것을 1 unit로 定義하였고, 酵素 活性은 酵素液 1 ml가 나타내는 unit 수로 하였다.

DNS 試藥의 조성은 다음과 같다. 즉, 증류수 1,416ml에 3,5-dinitrosalicylic acid 10.6 g과 NaOH 19.8g을 넣어서 溶解시킨 후, 여기에 sodium potassium tartrate(Rochelle salt) 306 g과 phenol 7.6ml, sodium meta bisulfite 8.3g을 가하여 녹여준다.

菌體 乾燥 重量(Dry cell weight) 測定. 菌體 培養液을 12,000g에서 遠心分離하여, 乾조소액을 만든 후 원심분리 cell에 남아있는 菌體를 여과지 위로 옮겨준 후, 蒸溜水로 3回 洗滌하고, 凍結乾燥하여 무게를 秤量하였다.

結 果

炭素源이 *B. fulva*의 polygalacturonase의 酵素活性에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 pectin, sucrose, mannitol 등 12개의 炭素源을 液體培地에 2%의 濃度로 添加하고 酵素活性을 調查하였는데 그 結果는 Table 1에 表示되어 있다. 이때 培養條件은 25°C, 5日間이었다.

Table 1. Effects of the carbon sources on the polygalacturonase activity in *Byssoschlamys fulva*.

Carbon source	Dry cell weight(g/l)	Relative activity*
Pectin	3.65	100
Sucrose	5.33	53.5
Mannitol	5.68	38.4
Citrate	1.60	31.7
Galactose	3.22	— ^b
Starch	3.86	—
Maltose	2.52	—
Sorbitol	1.61	—
Glycerol	2.66	—
Glucose	1.56	—
Urea	0.58	—
Oxalate	0.43	—

a Enzyme activity in the culture broth using pectin as carbon source was taken as 100%

b Not detectable

이때, pectin, sucrose, mannitol, citrate 등을 炭素源으로 썼을 때, polygalacturonase 活性이 나타났고, 기타의 炭素源을 添加하였을 때에는 酵素 活性이 나타나고 있지 않다. pectin을 炭素源으로 使用했을 때의 효소 活性은 0.50 units/ml 이고, sucrose, mannitol, citrate 첨가하는 펙틴을 使用하였을 때의 酵素活性에 대하여 各 各 53.5, 38.4, 31.7%로서 pectin을 炭素源으로 使用시보다 酵素의 活性이 절반 이하임을 알 수 있었다.

Fig. 1은 pectin을 炭素源으로 썼을 때, 培養時間이 *B. fulva*의 polygalacturonase 活性에 미치는 영향을 살펴 본 것이다. 培養 시작 후 5일경에 酵素活性이 가장 높아 0.48 units/ml를 나타내고, 그 이후에는 酵素 活性이 많이 減少하고 있다. 菌體 乾燥 重量도 5일경이 가장 높아

5.65 g/l에 이르고 있었다. 培養 시작 후 5일경에 酵素活性이 가장 높은 것은 Nagel等(1962)이 *B. polymyxa*, 柳等(1976)이 *Aspergillus*屬에 대해서 實驗한 것과 같은 結果를 보이고 있다.

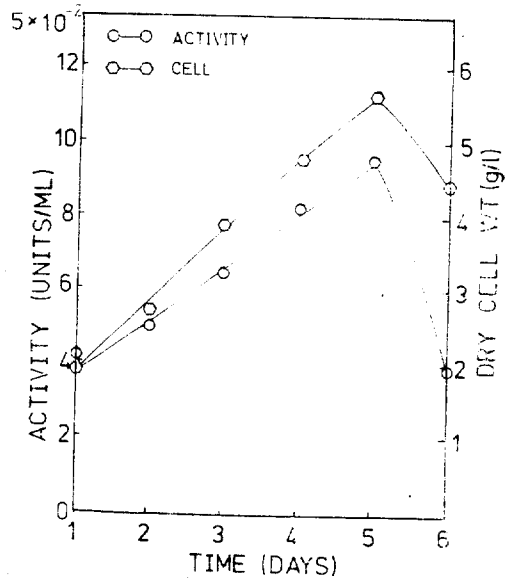


Fig. 1. Effect of incubation time on the polygalacturonase activity in *Byssoschlamys fulva*. Pectin was used as carbon source and incubation temperature was 25°C.

炭素源으로 pectin을 쓰고 5일간 培養시에 適正 培養 溫度를 알기 위하여 培養溫度를 5°C에서 55°C까지 變化시키며 酵素活性을 검토하였다(Fig. 2). Fig. 2에 나타난 것처럼 25, 35, 45°C의 培養溫度에서는 polygalacturonase 活性에 커다란 變化가 없으나, 5, 15°C에서는 菌絲의 生育 저해와 함께 酵素活性이 나타나지 않았으며, 55°C의 培養온도에서도 菌絲의 成長이 抑制되며, 효소 活性도 급격히 감소하였다. 25°C의 培養온도에서의 효소 活性은 0.50 units/ml 이었고, 培養溫度가 45°C인 경우에는 0.48 units/ml이었다.

初期 培養 pH가 酵素活性에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 초기배양 pH를 바꾸면서 polygalacturonase 活性의 變化를 본 결과(Fig. 3), pH 5.0 주위에서 比較的 높은 活性을 보이고 있다. 그러나 초기배양 pH가 3.0 이하로 떨어지면, 酵素 活性은 격감하는데, 이는 高壓 滅菌 中에 炭素源인 pectin의 分解가 일어나, 炭素원

으로서의 역할을 제대로 遂行하지 못하는 데 기인하는 것 같다.

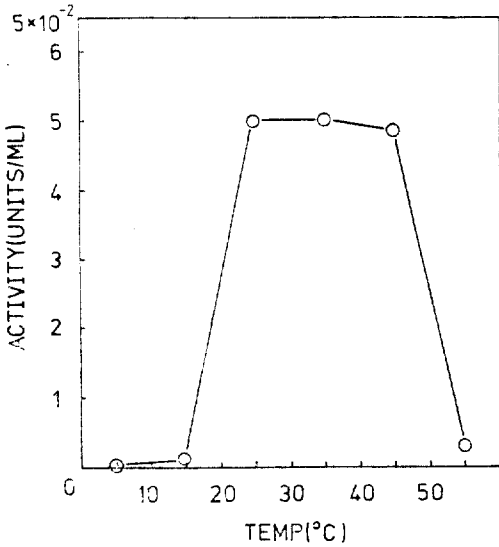


Fig. 2. Effect of incubation temperature on the polygalacturonase activity in *Byssoschlamys fulva*. Pectin was used as carbon source and incubation time was 5 days.

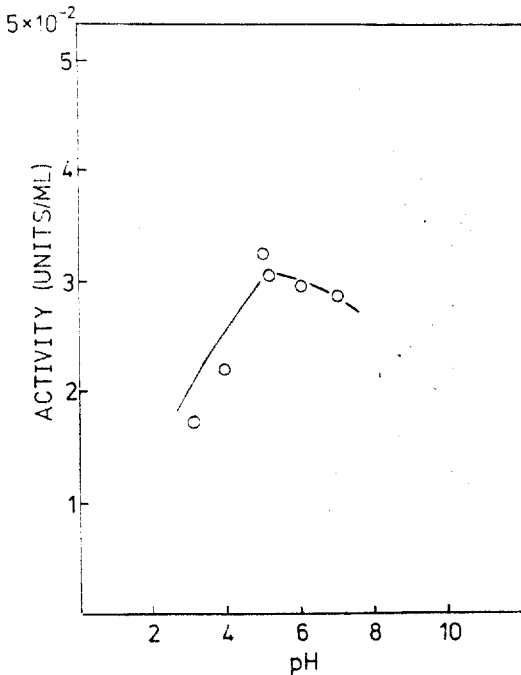


Fig. 3. Effect of initial incubation pH on the polygalacturonase activity in *Byssoschlamys fulva*. Pectin was used as carbon source, with incubation time and temperature of 5 days and 25°C.

*B. fulva*의 polygalacturonase 活性에 미치는 비타민 B群의 效果를 살펴보기 위하여 thiamine, riboflavin, pyridoxine을 배지에 대하여 $10^{-6}M$ 부터 $2 \times 10^{-2}M$ 까지 添加하여 실험한 結果 Table 3과 같은 結果를 얻었다. 이때 탄소원으로는 pectin을 2% 첨가하였으며, 25°C에서 5일간 振盪 培養하였다.

Table 2. Effects of the addition of thiamine, riboflavin, and pyridoxine on the polygalacturonase activity in *Byssoschlamys fulva*

Treatment	Enzyme activity (units/ml)		
	Thiamine	Riboflavin	Pyridoxine
$2 \times 10^{-2}M$	0.73	0.61	0.43
$10^{-2}M$	1.01	0.53	0.35
$10^{-3}M$	0.63	0.75	0.52
$10^{-4}M$	0.55	0.58	0.20
$10^{-5}M$	0.61	0.63	0.31
$10^{-6}M$	0.46	0.49	0.32

No addition of vitamin: 0.27units/ml

Table 2에서 알 수 있듯이 비타민 B群을 添加하지 않은 경우보다 비타민 B群을 첨가했을 때 酵素 活性이 顯著하였다. thiamine과 riboflavin의 첨가효과가 높아서 thiamine을 $10^{-2}M$ 濃度로서 培地에 첨가하면 효소 活性이 1.01 units/ml로서 대조구의 0.27 units/ml보다 4배 가까이 높았고, riboflavin의 경우에는 $10^{-3}M$ 농도로 첨가시 효소 活性이 0.75 units/ml로서 대조구보다 3배 程度 높았다.

考 察

炭素源으로 pectin, sucrose, mannitol, citrate 이외의 것을 使用했을 때에 菌體 增殖은 일어나나, polygalacturonase 活性은 나타나지 않는 데, 이는 이들 탄소원이 酵素 生成과 連結되어 있지 않음을 보여준다. Zetelaki-Horvath(1975)는 sucrose를 polygalacturonase 生成의 constitutive medium이라 하고, pectin을 inductive medium이라 報告하였다. 이들의 報告와 實驗結果를 比較해 볼 때, *B. fulva*의 polygalacturonase는 炭素源에 따라 inductive enzyme과 constitutive enzyme의 兩面性을 띤 것으로 보여진다.

適正培養時間實驗에서, 배양후 5일이 지나면

酵素活性이 減少하는 것은, 休止期에서의 酵素生成 中斷(Nagel, 1962)과 함께 菌體의 細胞內消化와 有害物質의 축적등으로 인하여 酵素가 파괴되거나, 酵素活性이 抑制되는데 原因이 있는 것으로 보인다.

一般的으로 *B. fulva*屬에 대한 培養溫度는 25~30°C가 권장되고 있으나(Hatt等, 1978), (Chu等, 1973), 本實驗에서 培養溫度를 5°C에서 55°C까지 變化시켜 가며 실험한 결과 25°C에서 45°C사이에서는 酵素活性에 그다지 차이 없이

일정하며, 이는 *B. fulva*가 熱抵抗성을 지니는데 기인하는 것 같다. *B. fulva*의 胞子는 98°C에서도 몇 분간 生存한다고 報告되고 있으며(Hatcher等 1979), 本實驗에서는 그 營養細胞도 다른 곰팡이에 비해 熱에 對한 耐性이 있는 것으로 나타났다. 즉, *Aspergillus*屬등 펙틴 분해효소를 生成하는 다른 곰팡이들은 45°C에서 菌體生育이 없는 반면, *B. fulva*만이 成長을 하고, 25°C에서와 비슷한 酵素活性을 보였다.

摘 要

炭素源, 培養時間, 培養溫度, 初期培養 pH, growth factor(비타민 B群)가 *B. fulva*의 polygalacturonase 活性에 미치는 影響을 分析하여, 酵素 生産의 適正條件을 調査하였다.

1. 炭素源으로 pectin을 썼을 때 0.50 units/ml로서 酵素活性이 가장 높았으며, sucrose, mannitol, citrate를 첨가했을 때는 pectin첨가시의 酵素活性의 53.5, 38.4, 31.7%가 나타났다. 培養時間이 增加함에 따라, 酵素活性도 增加하여 5일경에 최대치인 0.48 units/ml에 이르렀으나 그 이후로는 減少하였다.

2. 培養溫度가 酵素活性에 미치는 影響을 調査한 결과, 25~45°C에서는 培養溫度가 酵素活性에 별로 영향을 주지 않고 같은 수준인 반면 온도가 그보다 높거나 낮으면 酵素活性이 급격히 減少하였다.

3. pH4.0에서 pH7.0 사이에서는 초기 배양 pH가 酵素活性에 큰 영향을 주지 않았으나, pH5.0 주위에서 酵素活性이 比較的 높았고, 비타민 B群을 添加시 酵素活性이 顯著하게 증가하였다. 그중 비타민 B₁과 비타민 B₂의 添加 효과가 높았으며, 適正添加濃도는 비타민 B₁의 경우 10⁻²M, 비타민 B₂의 경우는 10⁻³M이었다.

引用 文 獻

1. Archer, S.A., 1979. Pectolytic enzymes and degradation of pectin associated with breakdown of sulphited strawberries. *J. Sci. Food Agric.* **30**, 692~703.
2. Basham, H.G., and D.F. Bateman, 1975. Killing of plant cells by pectic enzymes: the lack of direct injurious interaction between pectic enzymes or their soluble reaction products and plant cells. *Phytopathol.* **65**, 141~153.
3. Beaven, G.H., and F. Brown, 1949. The pectic enzyme of the fungus *Byssoschlamys fulva*. *Biochem. J.* **45**, 221~224.
4. Brown, A.H.S., and G. Smith, 1957. The genus *Paecilomyces* Bainier and its perfect stage *Byssoschlamys* Westling. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* **40**, 17.
5. Chu, F.S., and C.C. Chang, 1973. Pectolytic enzymes of eight *Byssoschlamys fulva* isolates. *Mycologia* **65**, 920~924.
6. Cole, M., and R.K.S. Wood, 1961. Pectic enzymes and phenolic substances in apples rotted by fungi. *Annals Bot.* **25**(100), 435~451.
7. Dennis, C., and J.H. Harries, 1979. The involvement of fungi in the breakdown of sulphited strawberries. *J. Sci. Food Agric.* **30**, 687~691.
8. Hancock, J.G., 1966. Degradation of pectic substances associated with pathogenesis by *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflower and tomato stems. *Phytopathol.* **56**, 975~979.
9. Harper, K.A., Beattie, B.B., Pitt, J.I., and D.J. Bert, 1972. Texture changes in canned apricots following infection of the fresh fruit with *Rhizopus stolonifer*. *J. Sci. Food Agric.* **23**, 311~320.
10. Hatcher, W.S., Weihi, J.L., Murdock, D.I., Folinazzo, J.F., Hill, E.C., and L.G. Albrigo, 1979.

- Growth requirements and thermal resistance of fungi belonging to the genus *Byssoschlamys*. *J. Food Sci.* **44**(1), 118~122.
11. Hatt, H.R., and M.J. Gantt(Editors), 1978. Catalogue of strains/(13th edition). The American Type Culture Collection, p. 229.
 12. Heinrichova, K., 1976. Isolation, characterization and mode of action of exo-D-galacturonanase from carrot. *Collection Czechoslov. Chem. Commun.* **42**, 3214~3221.
 13. Miller, G.L., 1959. *Analytical Chem.* **31**, 426~428.
 14. Nagel, C.W., and R.H. Vaughn, 1962. Comparison of growth and pectolytic enzyme production by *Bacillus polymyxa*. *J. Bacteriol.* **83**, 1~5.
 15. Neubeck, C.E., and G. Reed(Editors), 1975. Enzymes in food processing(2nd edition), Academic Press, New York, p. 397.
 16. Olliver, M., and T. Rendle, 1934. A new problem in fruit preservation. *J. Soc. Chem. Industr.* **53**, 166~172.
 17. Pressey, R., and J.K. Avants, 1972. Multiple forms of pectinesterase in tomatoes. *Phytochem.* **11**, 3139~3142.
 18. Reid, W.W., 1951. The pectic enzymes of the fungus *Byssoschlamys fulva*. *Biochem. J.* **50**, 289~292.
 19. Richardson, K.C. Incidence of *Byssoschlamys fulva* in Queensland-grown canned strawberries. Queensland Department of Primary Industries. Department of Primary Industries, Division of Primary Industries, Division of Plant Industry Bulletin #316, United Kingdom.
 20. Rombouts, F.M., and W. Pilnik, 1978. Enzymes in fruit and vegetable juice technology. *Process Biochem.* 9~13.
 21. Ulrich, J.M., 1975. Pectic enzymes of *Pseudomonas cepacia* and penetration of polygalacturonase into cells. *Physiol. Plant Pathol.* **5**, 37~44.
 22. Yu, J., Lee, B., Yang, R., Cho, S., and J. Lew, 1976. Studies on the pectic enzymes produced by *Aspergillus* sp. Part II. Purification and characterization of endo-polygalacturonase from *Aspergillus* sp(A-2). *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **4**(2), 57~62.
 23. Zetelaki-Horvath, K., 1975. Factors affecting polygalacturonase yield and kinetics types of enzyme produced by *Aspergillus awamori*. *Acta Aliment Acad. Sci. Hung.* **4**(2), 167~179.