

生澱粉 資化性 微生物의 分離와 性質에 關한 研究(II)
Aspergillus sp. SN-871이 생산하는 생전분 분해효소의 정제 및 특성

서명자·노경희

부산대학교 가정대학 식품영양학과

Studies on the screening and properties of Raw Starch
Saccharifying Microorganism.(II).
Purification and characterization of raw starch-digesting
enzyme from *Aspergillus* sp. SN-871.

Myoung-Ja Suh and Kyoung-Hee Nho

Dept. of Food & Nutrition, Home Economic College, Pusan National University, Pusan 607, Korea

ABSTRACT: A raw starch saccharifying enzyme from *Aspergillus* sp. SN-871 was purified by ammonium sulfate precipitation, DEAE-cellulose column chromatography, CM-Sephadex C-50 column chromatography and Sephadex G-75 gel filtration. The specific activity of purified enzyme was 18 fold and the yeild was 13.40%. The molecular weight of the purified enzyme was estimated as approximately 40,000 dalton by the method of Andrews gel filtration. The optimum pH and temperature for this enzyme were found to be 4 and 40°C, respectively and the stable range of pH was 2 to 5. The enzyme was themostable at below 60°C and inactivated at 70°C. It showed a tendency to increase the enzyme activity under the presence of 0.01 M BaCl₂, but under 0.01 MPb(NO₃)₂, AgSO₄ and K₃Fe(CN)₆ and citric acid etc. inhibited it completely. The substrate specificity of enzyme showed a tendency to increase the enzyme activity under addition of dextrin and glycogen, but under saccharose inhibited it. COD removal rate of *Aspergillus* sp. SN-871 was approximately 67 to 68%.

KEYWORDS: *Aspergillus* sp., SN-871, 0.01 M pb(NO₃)₂, AgSO₄, K₃Fe(CN)₆, Citric acid.

오늘날 쌀을 주식으로 하는 우리나라의 가정폐수에는 전분질을 주로 하는 유기물을 다량 함유하고 있으며, 식생활 변화로 많은 빵공장과 산업화에 따른 전분질을 원료로 하는 주정, 양조, 식품공장이 증가 또는 대형화됨으로써 이러한 폐수처리는 시급하며, 특히 전분질을 특이적으로 제거할 수 있는 경제적인 방법의 연구가 절실히 요구된다.

이런 점들을 고려하여 I보에서 생전분 당화력이 강한 초주로 선정된 *Aspergillus* sp. SN-871을 공시균으로하여 본 2보에서는 이 균이 생산하는 생전분 당화효소를 정제 및 정제효소의 성질을 살펴 보았으며, 또한 생전분 분해능이 있는 미생물을 이용한 폐

수처리능을 보기 위하여 COD 제거율 측정도 겸하여 실험한 것을 보고하는 바이다.

材料 및 方法

효소활성 측정

전보에서와 같은 방법(Somogyi, 1952)으로 측정하였다.

효소 정제

(NH₄)₂SO₄ 침전, DEAE-cellulose column chromatography, CM-Sephadex C-50 column chromatography 및 Sephadex G-75 gel filtration

본 논문은 1986년도 문교부 학술연구 조성비에 의하여 연구된 것임

등의 방법을 이용하였다.

단백질의 정량

bovine serum albumin을 표준물질로 하여 Lowry法(1951)에 준하여 측정하였다.

pH 안정성

원충액의 pH를 pH 1.0에서 11.0까지 각각 조절하여 (pH 1.0에서 5.0, 0.1 M 식초산 원충액; pH 6.0에서 8.0, 0.1 M 인산원충액; pH 9.0에서 11.0, 0.1 M carbonate 원충액) 원충액 1ml, 1% 생전분 용액 2ml와 효소액 1ml를 加하여 30°C에서 24시간 반응시켜 pH 안정성을 측정하였다.

분자량 측정

표준단백질로 Sigma社에서 구입한 bovine serum albumin(M. W, 66,000), α -chymotrypsin(M. W, 25,000), trypsin(M. W, 24,000), papain(M. W, 21,000)을 사용하여 Andrew's gel filtration (1965)法에 준하여 측정하였다.

각종 표준단백질을 1.2ml의 0.1 M 식초산 원충액(pH 4.0)에 용해한 다음 동일원충액으로 평형시킨 Sephadex G-75 column(1.8×48 cm, 12 ml/hr, 3 ml/tube)을 이용하였다.

분해 생성물의 paper chromatogram

0.25%의 가용성 생전분 50 ml에 효소액 0.5 ml를 가하여 40°C에서 각 시간별로 반응시킨 후 1 ml를 취하여 0.1 N NaOH 0.5 ml를 가하여 효소반응을 정지시키고 그 여액과 표준당을 paper(whatmann No.1)에 spotting하여 n-butanol:acetic acid:H₂O=12:3:5를 전개용매로 하여 2회 상향법으로 전개시킨 후 질산은-alkali法(Trevelyan 등, 1950)으로 발색시킨 후 20% Na₂S₂O₃액에 담가 여분의 질산은을 제거한 후 실온에서 건조시켰다.

COD 제거율 측정

JIS法(1971)에 준하여 측정하였다. 즉, 쌀을 수세한 물 30 ml를 삼각플라스크에 분주하여 멸균시킨 후 공시균을 접종한 후 30°C 항온진탕수조에서 2일간 진탕배양하여 원심분리를 한 후 그 상등액을 취하여 COD 제거율을 측정하였다.

結果 및 考察

효소 정제

① (NH₄)₂SO₄ 침전

(NH₄)₂SO₄를 80% 포화, 침전시킨 후 4°C에서 하룻밤 방치한 후 원심분리하여 (15,000×g, 30분)

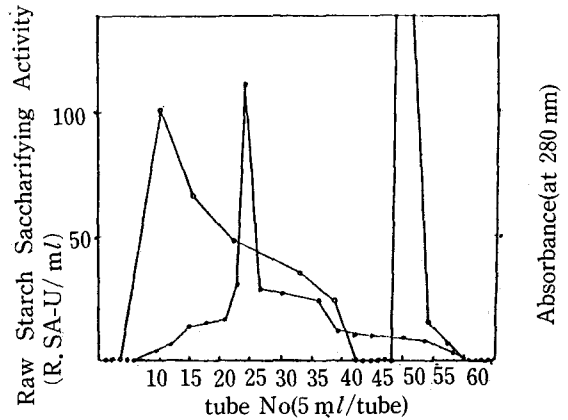


Fig.1. Chromatographic separation of enzyme on DEAE-cellulose.

column size; 1.8×24 cm, flow rate; 40 ml/hr, DEAE-cellulose column was equilibrated with 0.01 M acetate buffer(pH 4.0).

Elution was performed with the same buffer.

● - ●; raw starch saccharifying activity (R.SA-U) ○ - ○; protein

침전물을 극소량의 0.01 M 식초산원충액(pH 4.0)에 용해시켜 위와같은 방법으로 원심분리하여 상등액을 취하여 4°C에서 48시간 투석시켰다. Neissler's시약으로 확인하였다.

② 1차 DEAE-cellulose column chromatography

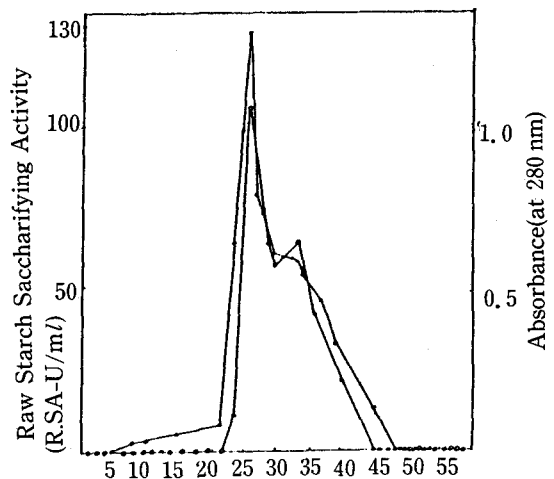
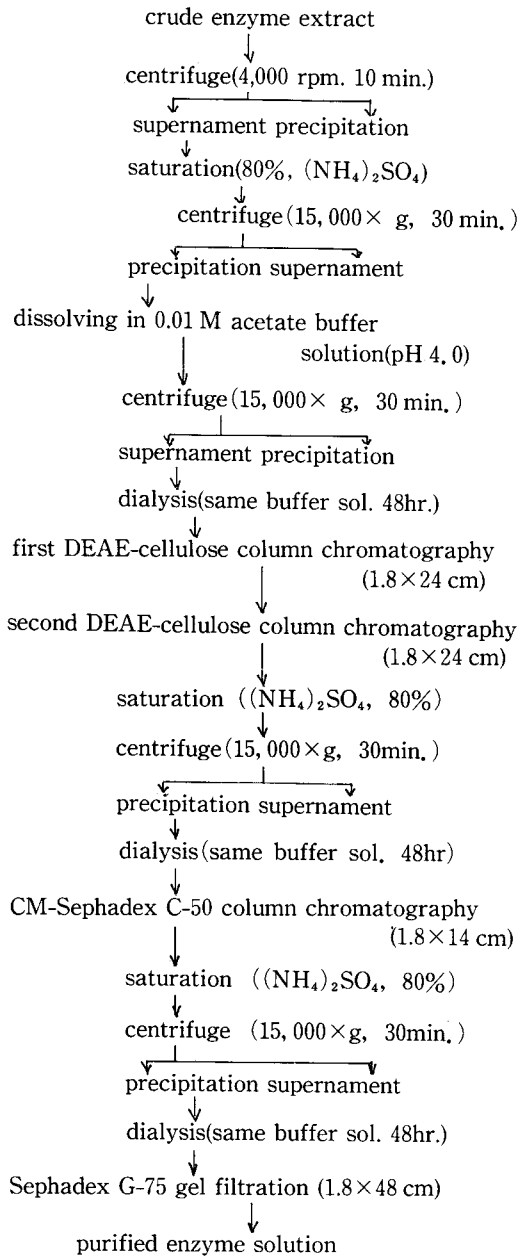


Fig.2. Second DEAE-cellulose column chromatography.

Column and method were same as first DEAE-cellulose column chromatography except using elution enzyme solution.

● - ●; raw starch saccharifying activity (R.SA-UO) ○ - ○; protein

Table I. Scheme of purification.



phy

0.01 M 식초산완충액(pH 4.0)으로 평형시킨 DEAE-cellulose column(1.8×24 cm, 40 ml/hr, 5 ml/tube)으로 chromatography하였다. 각 분획마다 효소활성과 단백질의 양을 측정하였다(Fig. 1).

③ 2차 DEAE-cellulose column chromogra-

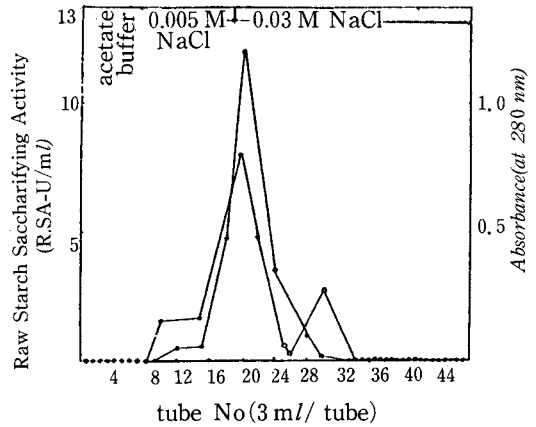


Fig.3. Stepwise elution pattern of the enzyme on CM-Sephadex C-50.

column size; 1.8×14 cm, flow rate; 3 ml/4min. CM-Sephadex C-50 column was equilibrated with 0.01 M acetate buffer(pH 4.0). The column was eluted by stepwise elution with NaCl from 0.005 M to 0.03 M.

● - ●; Raw Starch Saccharifying Activity (R. SA-U)
○ - ○; protein

phy

앞의 방법과 동일한 방법으로 행하였다(Fig. 2).

④ CM-Sephadex C-50 column chromatography

0.01 M 식초산완충액(pH 4.0)에 평형시킨 CM-Sephadex C-50 column(1.8×14 cm, 3 ml/4

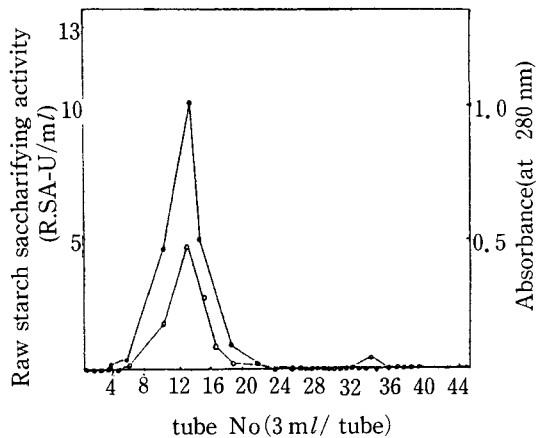


Fig.4. Gel filtration of enzyme on Sephadex G-75. colume size; 1.8×48cm, flow rate; 12 ml/hr. The Sephadex G-75 column was equilibrated with 0.1 M acetate buffer(pH 4.0).

● - ●; raw starch saccharifying activity(R.SA-U)
○ - ○; protein

Table II. Summary of purification steps of raw starch saccharifying enzyme from *Aspergillus* sp. SN-871.

purification steps	total v lume (ml)	total activity (R. SA-U)	specific activity (U / mg)	total protein (mg)	recovery (%)
crude enzyme	10782	297583.2	27.6	220.923	100
precipitation	3547.99	419373.58	118.2	14.76	140.9265
DEAE-cellulose 1	210	146459.37	206.4	14.67	49.216
DEAE-cellulose 2	219	54230.97	247.63	12.8	18.224
CM-SephadexC-50	135	51948	384.8	2.55	17.456
Sephadex G-75	81	39876.3	492.3	1.2	13.40

min, 3 ml/ tube)을 사용하여 5 mM NaCl이 함유된 동일 완충액으로 column을 세척한 후 0.03 M NaCl이 함유된 동일완충액으로 용출시켰다(Fig. 3).

⑤ Sephadex G-75 gel filtration

앞에서와 같은 방법으로 행한 후 효소액 1.2 ml를 0.1 M 식초산완충액(pH 4.0)으로 평형시킨 Sephadex G-75 column(1.8×48 cm, 12 ml/ hr, 3 ml/ tube)에 넣고 동일완충액으로 용출시켰다(Fig. 4).

Table II에서 보는 바와 같이 정제된 효소의 비활성은 조효소에 비하여 18배가 증가되었으며, 회수율은 13, 40%였다. 이것은 김등의(1986)의 *Rhizopus oryzae*가 생산하는 생전분 당화효소의 정제결과를

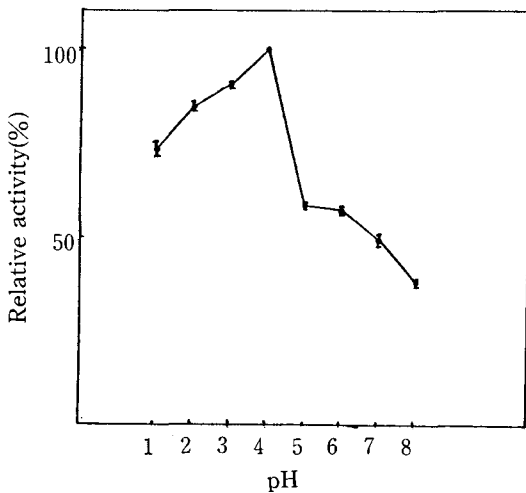


Fig. 5. Effect of pH on the purified enzyme. The reaction was carried out at 37°C for 60 min. Buffer used were 0.1 M acetate buffer(pH 1.0 to 5.0), phosphate buffer(pH 6.0 to 8.0).

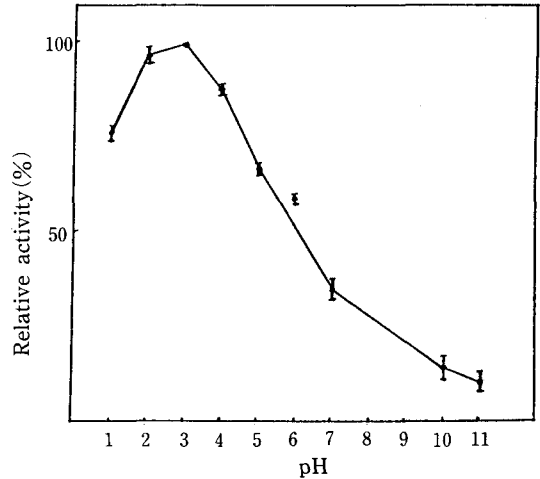


Fig. 6. Effect of pH on the stability of purified enzyme.

The enzyme was incubated in various buffer(pH 1.0 to 5.0, 0.1 M acetate buffer; pH 6.0 to 8.0, 0.1 M phosphate buffer; pH 9.0 to 11.0, 0.1 M carbonate buffer) at 30°C for 24 hour.

비활성이 45.2배, 회수율은 16.2%였다는 보고가 있으나, 손등은(1983)이 보고한 *Aspergillus niger*와 그 변이주의 생전분 당화효소를 정제한 결과, 비활성이 27.6배였으며 회수율이 13.8%였다는 보고와 비교하면 유사한 결과를 나타내었다.

최적 pH

정제효소의 효소활성은 pH 4.0에서 가장 활성화되며 최적 pH는 4.0이었다(Fig. 5).

김 등의(1986)의 연구에 따르면 pH 4.0에서 5.0까지가 최적이나 본 연구는 pH 5.0에서는 급격히 효소활성이 억제되었다.

pH 안정성

정제효소의 pH 안정성은 pH 2에서 5까지는 비교

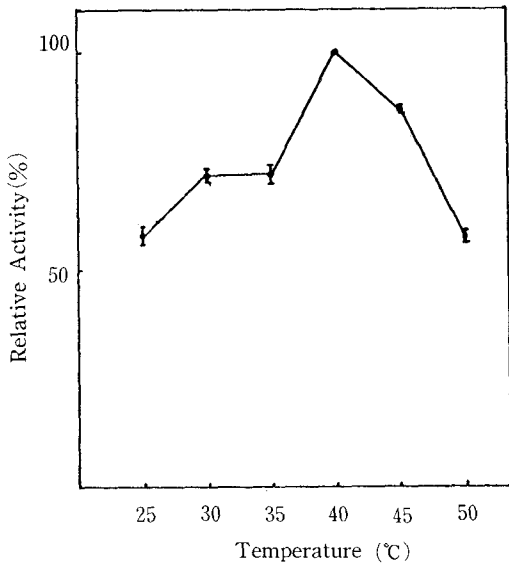


Fig.7. Effect of temperature on the activity purified enzyme.

The reaction was carried out at various temperature in 0.1 M acetate buffer(pH 4.0) for 60 min.

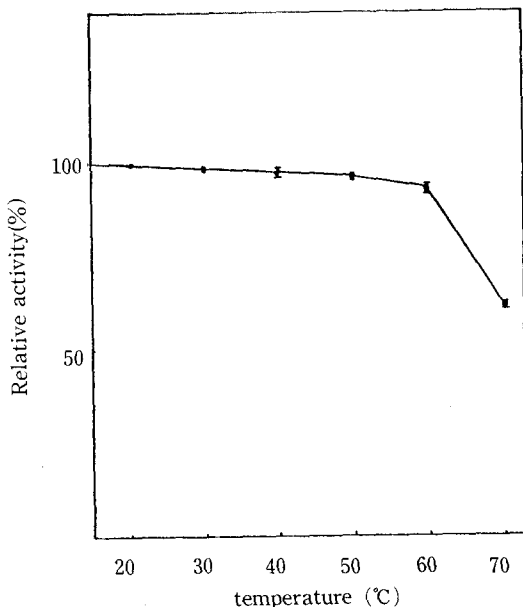


Fig.8. Thermal stability of purified enzyme.

The enzyme solution was incubated at various temperature in 0.1 M acetate buffer(pH 4.0) for 6 hour. After incubated, the reaction mixture was quickly chilled in ice and residual activity was determination.

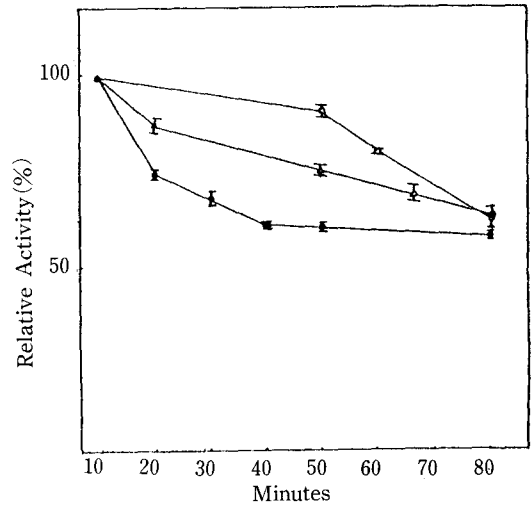


Fig.9. Effect of Ca²⁺, and Ba²⁺ on the heat stability of purified enzyme.

The enzyme solution in 0.1 M acetate buffer(pH 4.0) containing 0.01 M Ca²⁺, Ba²⁺ or without metal ion were treated for various periods at 70°C.

●-●; without metal ion
○-○; with Ca²⁺
△-△; with Ba²⁺

적 안정하지만 pH 7에서는 65% 정도가 활성이 억제 되었으며, pH 11에서는 90%까지 억제되었다(Fig. 6).

최적 온도

정제효소의 최적온도는 40°C로서 조효소보다 10°C 정도가 높게 나타났다(Fig. 7).

효소의 열안정성

Fig. 8에 나타난 바와 같이 효소의 열안정성을 보면 60°C까지는 비교적 안정하나 70°C에서는 40% 정도 활성이 억제되었다. 이 효소는 비교적 고온에서도 안정하다고 볼 수 있다.

溝上 등(1977)이 연구한 *Streptococcus bovis*의 생전분 분해효소의 열안정성이 50°C였다는 연구보고 보다는 본 연구의 효소가 더 열에 안정성을 가진다고 할 수 있다.

그리고 0.01 M의 Ca⁺⁺과 Ba⁺⁺을 첨가한 효소액을 70°C에서 각 시간별로 잔존활성을 측정할 결과 Fig. 9와 같이 Ca⁺⁺과 Ba⁺⁺이 효소에 열안정성을 주는 보조인자로서 작용함을 보여주었다.

금속이온의 영향

효소반응에 미치는 여러가지 금속이온의 영향을 보면 Table III와 같이 Ba⁺⁺을 10⁻² M 첨가시 효소 활성을 증가시켜 주었으나 10⁻¹ M 첨가시는 효소활

Table III. Effect of metal ions on the activity of the purified enzyme.

metal salts	relative activity(%)	
	10 ⁻¹ M	10 ⁻² M
none	100	100
CaCl ₂	2.93±0.243	73.36±5.31
FeCl ₃	0	0.47±0.235
NaCl	92.746±2.229	57.6 ±3.77
BaCl ₂	59.51 ±4.39	135.775±7.03
KCl	70.85 ±1.436	65.05±1.03
ZnCl ₂	25.78	62.63
Pb(NO ₃) ₂	0	0
MgCl ₂	9.9±1.83	37.26±0.94
CdCl ₂	7.215±2.182	50.08±5.935
HgCl ₂	1.71 ±0.855	44.43±3.175
CuCl ₂	3.49 ±1.747	34.5±0.816
AlCl ₃	10.28 ±5.14	1.88
KCN	0	33.81±16.9
K ₃ Fe(CN) ₆	12.21 ±6.105	0
Ag ₂ MoO ₄	0	0
ZnSO ₄	44.325±1.143	66.88±6.24
FeSO ₄	0	0
	55.88	6.67

Table IV. Effect of organic compounds on the purified enzyme activity by *Aspergillus* sp. SN-871.

organic compound	relative activity(10 ⁻² M)
none	100
citric acid	0.195±0.0975
oxalic acid	12.725±0.3825
a-a'-Dipyridyl	61.865±7.6975
trichloroacetic acid	1.6±0.8
O-phenanthroline	40.31±14.075
EDTA	73.70±2.665

성을 저하시켰다. Hg⁺⁺첨가시 효소활성이 심하게 저하되는 것은 Shimazaki등(1984)의 연구와 일치하며, Fe⁺⁺와 Cu⁺⁺이 효소활성을 저하시키는 정도가 본 연구에서 더 강하게 나타났다. 또한 Ag⁺이 효소

Table V. Substrate specific of purified enzyme produced by *Aspergillus* sp. SN-871.

substrate	ratio of the activity
soluble starch	100
dextrin	101.76±1.28
glycogen	111.35±7.51
saccharose	34.47±6.27
maltose	89.14±2.53

활성을 저해시킨다는 Okada(1985)의 보고와도 일치하였다.

유기화합물의 영향

10⁻²M의 각종 유기화합물을 첨가하여 반응시킨 후 효소활성을 측정된 결과를 보면 (Table IV) citric acid, Tri chloroacetic acid와 oxalic acid가 효소활성을 현저히 저해시키는 것을 알 수 있다.

기질 특이성의 측정

Table V에서 보는 바와 같이 정제효소의 기질특이성을 보면 dextrin이나 glycogen이 이 효소에 대하여 특이적으로 작용하는 것으로 나타났다.

가수분해를

Fig. 10에서 나타난 바와 같이 시간이 지남에 따라 이 효소에 의한 가용성 전분의 가수분해율은 점차 상승되어서 30시간에서는 약 70%로서 일정치를 유

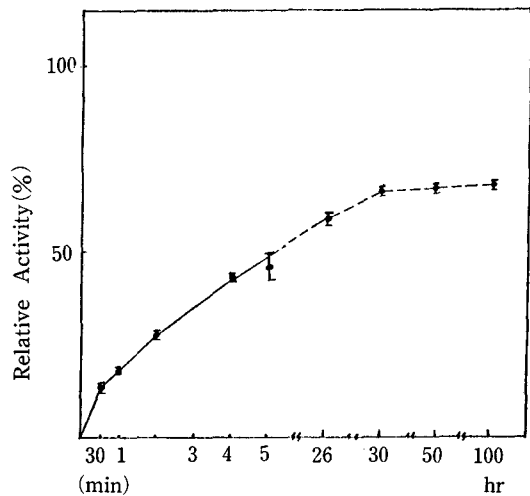


Fig. 10. Hydrolysis of soluble starch by purified enzyme. Hydrolysis of soluble starch(1%) was carried out at 37°C and pH 5.0

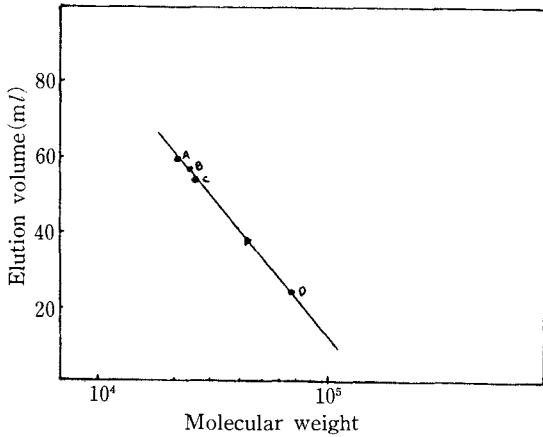


Fig. 11. Estimation of molecular weight of purified enzyme by Andrew's gel filtration on Sephadex G-75.

- A; papain(M.W. 21,000)
- B; trypsin(M.W. 24,000)
- C; m-chymotrypsin(M.W. 25,000)
- D; bovine serum albumin(M.W. 66,000)
- ▲; purified enzyme.

지하였다.

분자량 측정

Andrew's gel filtration 방법(1965)으로 측정된 결과 Fig. 11에 나타난 바와 같이 정제효소의 분자량은 약 40,000dalton 정도로 추정되었다.

분해 생성물의 검토

가용성 생전분에 대한 정제효소의 분해생성물을 paper chromatogram에 의하여 실험한 결과 Fig. 12에서 나타난 바와 같이 가용성 생전분을 1시간, 15시간, 40시간 반응시켜 생성된 분해생성물의 대부분은 glucose 이었다.

COD 제거율 측정

본 균의 COD 제거율을 측정된 결과 67에서 68%의 제거율을 나타내었다(Fig.13). 이것은 吉澤(1981)의 연구보고에서 여러 종류의 효모에 의한 COD 제거율을 보면 본 실험의 결과와 유사하나, Akaki 등(1984)의 연구보고인 *Rhodospiridium* sp. J-5B의 COD 제거율이 80% 정도인 것과 비교하면 본 균의 COD 제거율은 낮은 편이었다.

생전분 당화력이 강한 균주로 선정된 *Aspergillus* sp. SN-871이 생산하는 효소의 정제과정과 그 정제 효소의 성질에 관해 살펴 본 결과는 다음과 같다.

摘 要

1. (NH₄)₂SO₄ 침전, DEAE-cellulose column

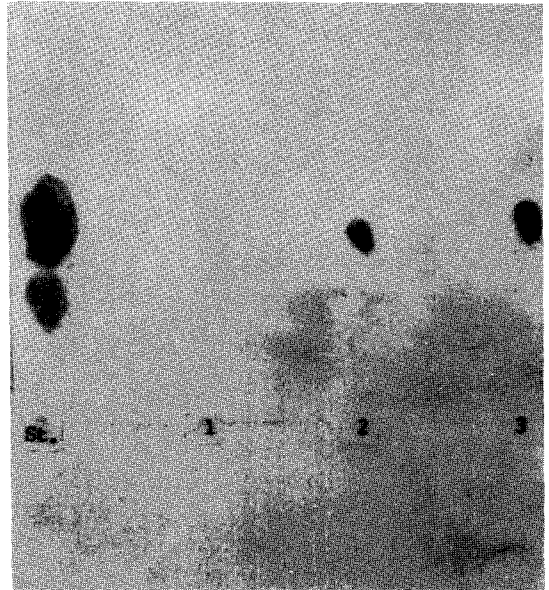


Fig. 12 Paper chromatogram of the reaction products of raw soluble starch by purified enzyme.

- St; standard sugars, G; glucose, M; maltose
- 1; sample after 1 hr reaction.
- 2; sample after 15 hr reaction.
- 3; sample after 40 hrs reaction.

chromatography, CM-Sephadex C-50 및 Sephadex G-75 gel filtration에 의하여 정제된 효소는 조효소보다 18배가 높았으며 회수율은 13.40%였다.

2. 겔보기 분자량은 약 40,000dalton이었다.
3. 최적 pH와 온도는 4.0, 40°C일 때이며, 안정 범위는 pH 2.0에서 pH 5.0, 온도는 60°C 이하이었다.
4. 금속이온 첨가에 의한 영향은 10⁻²M BaCl₂ 첨가시 효소활성이 증가되었으며, 10⁻²M Pb(NO₃)₂, K₃Fe(CN)₆, AgSO₄와 ZnSO₄첨가시는 효소활성이 완전히 저해되었다.
5. 각종 유기화합물 첨가에 의한 효소의 영향은 citric acid 첨가시 효소활성이 현저히 저해되었다.

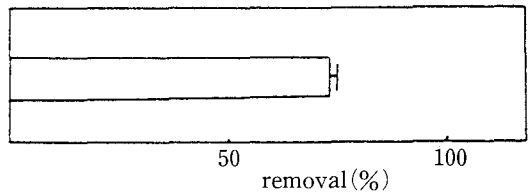


Fig. 13. COD Removal of Rice Washing Water by *Aspergillus* sp. SN-871.

6. 기질 특이성을 보면 dextrin과 glycogen을 기질로 하였을 때는 효소활성이 증가하였으나 saccharose 첨가시에는 현저히 저하되었다.

7. COD 제거율을 측정한 결과는 67에서 68% 정도이었다.

參考文獻

- Andrews, P.(1965): The gel-filtration behavior of proteins related to their molecular weight over a wide range. *Biochem. J.* **96**: 595.
- Lowry, Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R. J.(1953): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265.
- Okada, G.(1985): Purification and Properties of a Cellulase from *Aspergillus niger*. *Agr. Biol. Chem.* **49** (5):1257-1265.
- Shimazaki, T., Hara, S. and Sato, M.(1984): Production, Purification and Some Properties of Extracellular Amylase of *Schizopyllum commune*. *J. Fermt. Technol.* **62**(2): 165-170.
- Trerelyan, W.E., Procter, D.E. and Harrison, J.S. (1950): Detection of sugars on paper chromatograms. *Nature.* **166**: 444~445.
- 김찬조, 오만진, 이종수(1986) : *Rhizopus oryzae*가 생성하는 생전분 분해효소의 정제 및 특성, 한국식품 과학회지, **18**(4): 288-293.
- 손천배, 박윤중(1983) : *Aspergillus niger*와 그 변이주의 생전분 당화효소에 관한 연구, 충남대 농기연보, **10**(1): 166-185.
- 정만재, 谷田肇, 丸山芳治(1982) : *Bacillus circulans* F-2가 생산하는 m-amylase에 관한 연구(II), 한국 산업 미생물 학회지. **10**: 123-132.
- 日本規格協會(1971) : 工場排水試驗方法. JISKO **102**: 26.
- 吉澤淑(1981) : 효모를 사용한 식품 공업 폐수 신처리법의 개발 Nipp. Nog. Kaishi. **55**(8): 705-711.
- 溝上忞平, 小崎道雄, 北原覺雄(1977) : *Streptococcus bovis* 日農化誌 **51**(5): 299-307.

Accepted for Publication 9 November