

Penicillium sp. CB-20이 생성하는 Polygalacturonase의 생산 및 정제

조영제 · 임성일 · 이우제 · 최 청*

영남대학교 농축산대학 식품가공학과

Production and Purification of Polygalacturonase from Penicillium sp. CB-20

Cho, Young-Je, Seong-II Lim, Woo-Je Lee and Cheong Choi*

*Department of Food Science & Technology, College of Agriculture and Animal Science,
Youngham University, Gyeongsan, Kyungpook 713-800, Korea.*

Penicillium sp. CB-20 was selected for its strong polygalacturonase activity among various strains of molds found in soil. It was found that the production of polygalacturonase reached to maximum when on the wheat bran medium containing pectin as carbon source, the strain was cultured for 60 hours at 30°C. The enzyme was purified to 29.21 fold by ammonium sulfate treatment, Sephadex G-25, G-75, G-150 gel filtration, DEAE-cellulose and DEAE-Sephadex A-50 ion-exchange chromatography.

Yield of the enzyme purification was 2.31%. When the purified enzyme was applied to sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, the molecular weight was estimated 21,000. The amino acid composition indicated relatively high contents of glutamic acid, glycine and histidine.

Pectic enzyme는 펙틴질과 더불어 과채류의 성숙 또는 수확 후 처리과정에 있어서 과실조직에 영향을 주는 중요한 인자일 뿐 아니라 과실주스와 과실주 가공에 있어서는 품질의 조성과 유지에 불가결한 존재임이 알려져 있다(1-5). 한편 pectic enzyme은 과채류의 처리가공에 있어 식물조직의 인위적 분해에 사용되므로 더욱 주목받았으며, pectic enzyme의 작용으로 과실주스의 점도를 저하시키며 과즙에 혼탁성을 주는 펄프입자를 응집하여 이를 여과, 제거함으로써 과즙의 청정화를 가능하게 하였다(2, 6-8). 이와 같이 pectic enzyme이 가지는 산업적 중요성 때문에 효소의 대량생산이 요구되게 되었고 여러가지 효소원 중에서 곰팡이가 생성하는 효소에 대해 Luh와 Phaff(9), Demain 등(10), Endo 등(11-13)이 연구를 진행하여 왔으며, 새로운 기기와 지식이 발달하면서 효소단백질이 보다 순수하게 정제되어 이로부터 이들 효소의 작용이 점차 규명되기 시작하

였으나, 효소의 효율적 정제법 등 아직 연구할 소지가 많이 남아있는 실정이다.

본 연구에서는 토양으로부터 *Penicillium sp.* CB-20을 분리하고 이 균주가 생성하는 polygalacturonase의 생산 및 정제에 관하여 살펴보기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

균의 분리 및 선별

균은 대구와 경북지역의 토양과 부식토를 균원시료로 하여 평판배양법으로 분리하였으며, 분리된 균주의 효소활성을 측정하여 활성이 강한 5균주를 1차 선별하고 2차 효소 생성능 실험에서 가장 우수한 *Penicillium sp.* CB-20 1균주를 선별하였다. 선별된 균주는 Czapek-dox agar에 1개월에 1회씩 계대배양하여 보관하였다.

Key words: Alkaline protease, *Penicillium*

*Corresponding author

Table 1. The composition of potato dextrose agar (%).

Medium for stock culture	
Potato	20 (w/v)
Agar	2.0
Dextrose	2.0
pH	7.0

200g of sliced potato in 1l of tap water was boiled for 30 min. After cooling the extract was filtered through cotton.

Table 2. The composition of Czapek-Dox agar.

Sodium nitrate	2.9g
Potassium chloride	0.5g
Magnesium sulfate, 7 hydrate	0.5g
Dipotassium hydrogen phosphate	1.0g
Ferrous sulfate, 7 hydrate	0.01g
Pectin	20.0g
Agar	20.0g
Distilled water	to 1 liter

배지 및 배양방법

균의 순수분리를 위한 배지는 potato dextrose agar를, 효소생산을 위하여 밀기울배지를 균주보관용 배지로는 Czapek-dox agar를 사용하였으며, 효소생산을 위하여 2% pectin을 가한 밀기울배지에 공시균의 균사체 및 포자를 5백금이 접종하여 30°C에서 약 3일간 배양시켰고, 이 때 potato dextrose agar 및 Czapek-dox agar 배지는 Table 1, 2와 같다.

조효소액의 조제

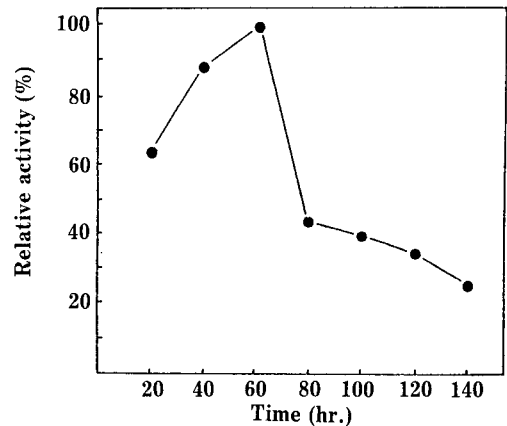
배양된 밀기울배지에 8배의 0.05 M acetate buffer (pH 5.2, 0.1 M NaCl)를 가하여 균질화한 후 4°C에서 24시간 동안 교반하여 효소를 추출하고 4,000g로 30분간 원심분리한 후 상등액을 모아 조효소액으로 사용하였다.

단백질의 정량

효소의 단백질 정량은 Lowry 등(14)의 방법에 의하여 측정하였으며 단백질값은 bovine serum albumin을 사용한 표준곡선에 의하여 환산하였다.

효소활성의 측정

Polygalacturonase는 polygalacturonic acid를 분해하여 환원기를 가진 oligomer를 생성하므로 이 환원기의 증가량을 측정하여 polygalacturonase의 역가를

**Fig. 1. Effect of culture time on production of polygalacturonase by *Penicillium* sp. CB-20.**

측정하였다. 환원기의 정량은 Somogyi-Nelson법(15)에 의하여 실시하였으며, 이 때 효소활성은 효소액 1ml가 1분간에 1 μ mol의 환원기(α -D-galacturonate)를 생성하는 것을 1 unit로 정하였고, pectinesterase의 활성은 Wood 등(16)의 방법으로, pectinlyase 활성측정은 Hancock 등(17)의 방법을 변형하여 측정하였다.

효소의 정제

조효소액을 황산암모늄 염석, Sephadex G-25, G-75, G-150 gel filtration 및 DEAE-cellose, DEAE-Sephadex A-50 ion-exchange chromatography 등을 거쳐 분리, 정제하였다.

전기영동

Davis법(18)에 의해 7.5% polyacrylamide gel로써 tube당 3mA로 실온에서 약 4시간 동안 수행하였다. 전기영동 후 gel은 1% amido black 10-B로써 염색하였고 7% acetic acid로 탈색하였다.

아미노산 분석

효소의 아미노산 조성은 시료에 6 N HCl을 가하고 질소가스로 충전, 밀봉시켜 105°C에서 20시간 가수분해한 다음 탈산시켜서 아미노산 자동분석기로 분석하였다.

결과 및 고찰

효소의 생산

배양시간의 영향 : *Penicillium* sp. CB-20의 균주에 의한 polygalacturonase의 생성은 수분이 60% 함유

Table 3. Effect of carbon sources on production of polygalacturonase by *Penicillium* sp. CB-20.

Carbon source	Unit/ml	Relative activity (%)
Pectin	124.1	100.00
Galactose	105.1	84.69
Citrate	103.7	83.56
Arabinose	80.1	64.58
Mannitol	77.8	62.69
Sorbitol	74.5	60.03
Lactose	70.1	56.49
Maltose	68.8	55.47
Fructose	66.1	53.26
Sucrose	63.2	50.93
Glucose	62.2	50.12
Glycerol	61.3	49.40
Starch	52.0	41.90

된 밀기울배지를 사용하여 40°C에서 배양시간별로 측정된 결과 Fig.1과 같이 배양 시작 후 60시간이 지났을 때 효소활성이 가장 높았으며 그 이후 급격한 활성 감소가 관찰되었다. 이는 휴지기에서 효소생성 중단과 함께 유해물질의 축적 등으로 효소활성이 억제되는데 원인이 있는 것으로 생각되며, 이같은 결과는 Wild 등(19)이 *P. digitatum*의 polygalacturonase 생산이 90시간 배양시 최대라고 보고한 바와는 다르지만 Spalding(20)이 *P. expansum*이 약 50시간 배양시 최대활성에 도달한다고 보고한 바와는 비교적 비슷하였다.

탄소원의 영향: 탄소원이 본 효소활성에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 펙틴 등 12가지의 탄소원을 밀기울배지 제조시 2% 수용액 상태로 첨가시킨 뒤

Table 4. Effect of precipitators of polygalacturonase from *Penicillium* sp. CB-20.

Treatment	Unit/ml	Relative activity (%)
Ammonium sulfate	147.8	100.00
Ethanol	96.8	65.48
Acetone	82.7	56.01
Trichloroacetic acid	0.0	0.00
Heat	0.0	0.00

배양시켜 효소활성을 측정한 결과는 Table 3과 같다. 펙틴을 탄소원으로 사용했을 때가 124.1 unit/ml로 가장 높았으며 galactose, citrate 첨가시는 pectin 첨가 때보다 84.09%, 83.56%로 활성이 감소하였으며 sucrose glucose 등에 의해서는 활성이 절반가량으로 감소하였다.

침전제의 영향

조효소액에서 효소단백질을 침전, 회수하는 과정에서 여러가지 침전제에 의한 효소활성 감소를 측정된 결과는 Table 4와 같다. 황산암모늄으로 침전시 147.8 unit/ml였으며 에탄올, 아세톤을 사용하였을 때는 황산암모늄 침전 때보다 65.48%, 56.01%로 활성이 감소하였고 trichloroacetic acid에 의한 침전과 열에 의한 침전은 활성이 관찰되지 않았다.

효소의 정제

조효소액을 70% 포화되게 황산암모늄 염석시켜 효소단백질을 침전, 회수하였으며 침전물들은 4°C에서 0.05 M acetate buffer (pH 5.2)에 대하여 투석을 행하였고 투석한 후 효소액 중의 불용성 물질은 원심분리하여 제거하였다. 투석한 효소액을 amicon

Table 5. Summary of purification of polygalacturonase from *Penicillium* sp. CB-20.

Step	Total volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/mg)	Yield (%)	Purification fold
Crude enzyme solution	1110	2886	98373.75	34.087	100	1
Ammonium sulfate	251	318.77	17580.04	55.15	17.87	1.62
Sephadex G-25	120	63.60	7720.80	121.40	7.85	3.56
Sephadex G-75	135	30.65	7099.65	231.64	7.22	6.80
DEAE-Cellulose	65	7.735	3156.40	408.07	3.21	11.97
Sephadex G-150	48	4.224	2645.76	626.36	2.69	18.38
DEAE-Sephadex A-50	40	2.280	2270.40	995.79	2.31	29.21

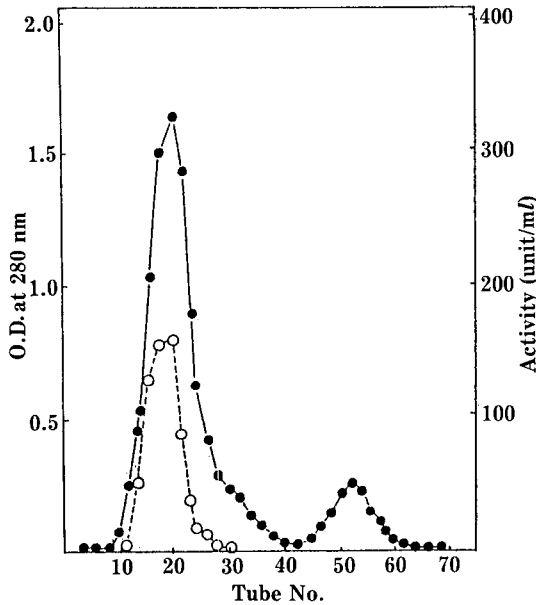


Fig. 2. Sephadex G-25 gel filtration pattern of polygalacturonase of *Penicillium* sp. CB-20. Protein ●—● activity ○-----○

membrane PM10으로 80 ml로 농축한 후 20 ml씩 4 회 Sephadex G-25 칼럼(3×50 cm)에 충전시킨 후 1.5 ml/min.의 유속으로 3 ml씩 분획하였으며(Fig. 2), 용출시킨 결과 약 80% 정도의 불순단백질을 제거하였다. Gel filtration 후의 효소액에는 pectinesterase와 pectinlyase의 활성이 검출되었다. Gel filtration에서 분획된 효소액을 농축하고 농축물의 1/2을 Sephadex G-75 칼럼(2×70 cm)에 충전시킨 후 1.2 ml/5 min.의 유속으로 3.2 ml씩 분획하였으며(Fig.3), 활성분획은 모아서 농축하였다. Gel filtration한 결과 효소의 비활성 역가가 231.64 unit/mg으로 약 7배 정제되었으며 활성분획에서는 pectinesterase는 제거되었으나 pectinlyase는 검출되었다. 농축된 효소액을 DEAE-cellulose 칼럼(3×50 cm)에 충전시킨 후 약 1.5배의 상기 buffer로 비활성단백질을 씻어낸 다음 흡착된 단백질을 0~0.7 M NaCl의 linear salt gradient로 용출하였다(Fig.4). 이 때의 유속은 0.85 ml/min이었고 10 ml씩 분획하였으며 활성분획은 모아서 농축하였다. DEAE-cellulose column chromatography한 결과 약 0.15 M NaCl 정도에서 활성단백이 용출되었으며 활성부위의 효소액 중에는 pectinesterase와 pectinlyase의 활성이 검출되지 않았다.

농축한 효소액은 Sephadex G-150 칼럼(2×90 cm)에 충전시킨 후 1.6 ml/10 min의 유속으로 3 ml

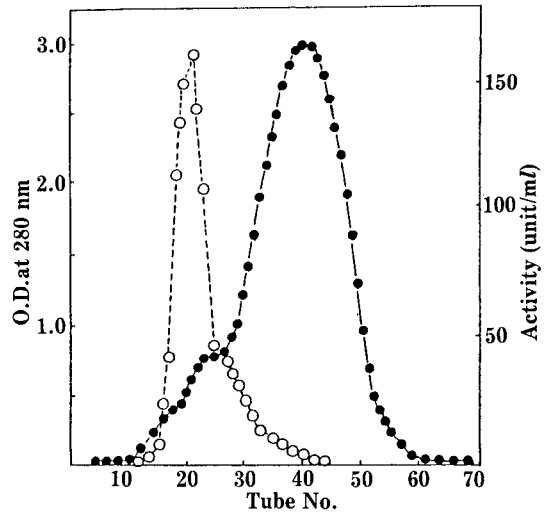


Fig. 3. Sephadex G-75 gel filtration pattern of polygalacturonase of *Penicillium* sp. CB-20. Protein ●—● activity ○-----○

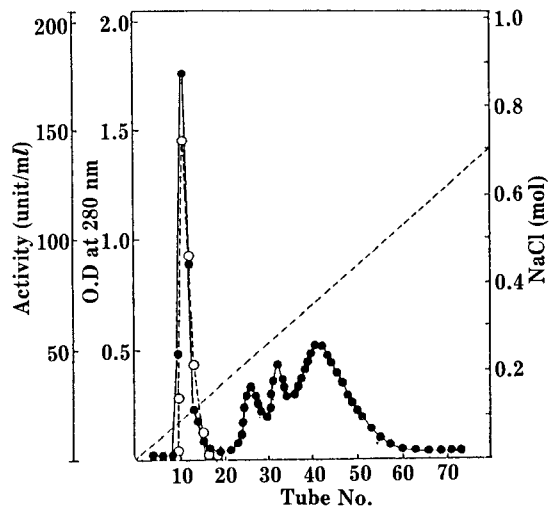


Fig. 4. DEAE-cellulose ion exchange chromatogram of polygalacturonase of *Penicillium* sp. CB-20. Protein ●—● activity ○-----○

씩 분획하였으며, 활성분획은 농축하였다(Fig.5). Sephadex G-150를 통과시킨 결과 효소의 비활성 역가가 626.36 unit/mg으로 약 18배 정제되었다. 효소액을 DEAE-Sephadex A-50 칼럼(1.8×120 cm)에 충전시킨 후 약 1.5배의 0.05 M acetate buffer(pH 5.2)로 비활성 단백질을 씻어낸 다음 흡착된 단백질을 0~0.8 M NaCl의 linear salt gradient로 1.1 ml/10 min의 유속으로 5 ml씩 분획하였으며(Fig.6), DEAE-Sephadex A-50에 의해서도 DEAE-cellulose

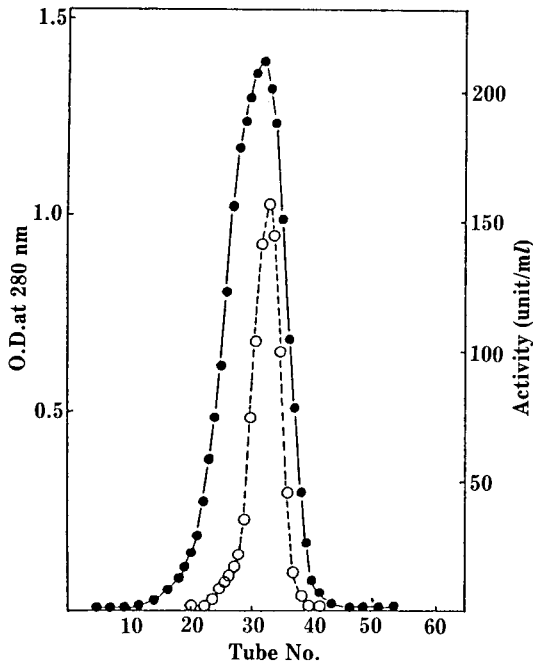


Fig. 5. Sephadex G-150 gel filtration pattern of polygalacturonase of *Penicillium* sp. CB-20. Protein ●—● activity ○—○

Table 6. Amino acid composition of polygalacturonase from *Penicillium* sp. CB-20.

Amino acid	Content (mg/g)
Lysine	50.1
Histidine	78.9
Arginine	17.2
Aspartic acid	37.8
Threonine	38.7
Serine	61.3
Glutamic acid	281.4
Proline	42.1
Glycine	138.5
Alanine	55.2
Cysteine	trace
Valine	52.7
Methonine	5.6
Isoleucine	36.6
Leucine	65.8
Tyrosine	9.5
Phenylalanine	25.4

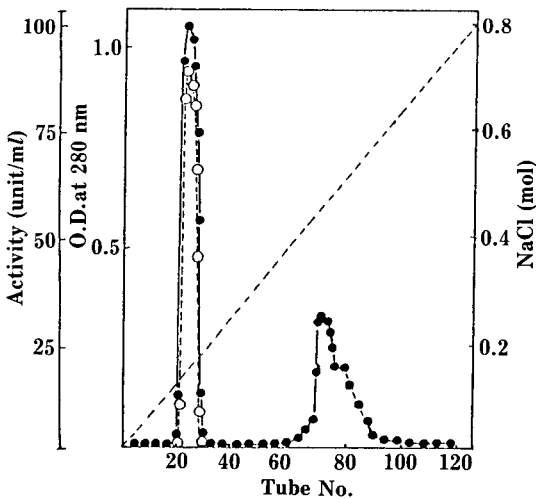


Fig. 6. DEAE-Sephadex A-50 ion exchange chromatogram of polygalacturonase of *Penicillium* sp. CB-20. Protein ●—● activity ○—○

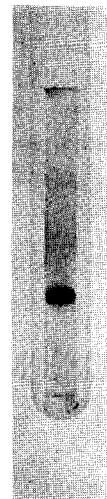


Fig. 7. Polyacrylamide gel electrophoresis of purified polygalacturonase from *Penicillium* sp. CB-20.

전기영동

정제된 효소단백질을 Davis법(18)에 따라 polyacrylamide gel로써 Disc gel electrophoresis 행하여 본 결과 Fig.7에서와 같이 단일밴드로 나타났다.

분자량 측정

와 마찬가지로 약 0.15 M NaCl 정도에서 활성단백이 용출되었다. 이상의 정제결과 본 효소는 specific activity가 995.79 unit/mg으로 약 30배 가량 정제되었으며 그 수율은 2.31%였다(Table 5).

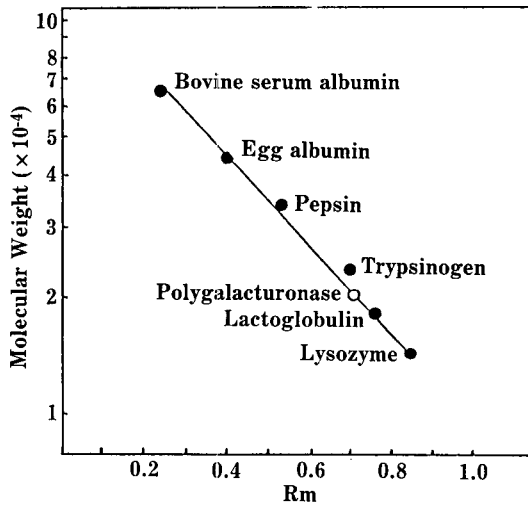


Fig. 8. The calibration curve for the determination of molecular weight of polygalacturonase by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

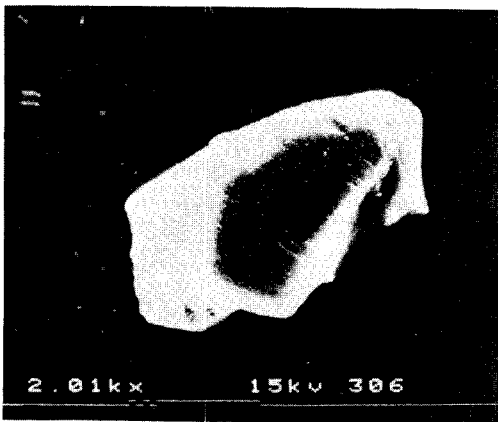


Fig. 9. Scanning electron microphotograph of crystal of polygalacturonase from *Penicillium* sp. CB-20.

Weber와 Osborn의 방법(21)에 따라 sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDSPAGE)에 의하여 분자량을 측정된 결과 Fig.8에 나타난 바와 같이 21,000 정도로 측정되었으며 Obi 등(22)과 이 등(23)은 *A. niger*와 *Aspergillus* 속의 polygalacturonase 분자량이 각각 30,900과 35,000이라고 보고하였으나 본 효소는 그보다 분자량이 작았다.

효소의 결정화

정제된 효소를 냉동기 속에서 냉각하는 동안 -20°C의 아세톤을 유백색의 혼탁이 생성될 때까지 가

한 후 4°C에서 방치하고 결정화시켜 scanning electron microscopy에 의해 그 구조를 확인한 결과 Fig.9와 같이 본 효소는 마름모꼴의 결정을 형성하고 있었다. 이는 Sakai 등(24)이 보고한 protopectinase의 정육각 결정구조와는 조금 다르게 나타났다.

아미노산 분석

정제효소의 아미노산 조성은 Table 6에서 보는 바와 같이 17종류로써 glutamic acid와 glycine이 각각 그람당 281.4 mg, 138.5mg으로 가장 많이 함유되었고 methionine과 cystine의 함량이 가장 적게 나타났다. 이는 Sakai 등(25)이 보고한 *Aureobasidium pullulans*의 endo-polygalacturonase 아미노산 조성과의 유사하였다.

요 약

Penicillium sp. CB-20의 polygalacturonase 생성을 위한 최적조건은 탄소원으로 펙틴을 사용하여 16시간 배양시 최대 활성을 나타내었으며, Sephadex G-25, G-75 및 G-150을 사용한 gel filtration과 DEAE-cellulose, DEAE-Sephadex A-50에 의한 ion exchange chromatography를 통하여 이 효소를 약 30배 가량 정제할 수 있었고, 수율은 2.31%였다. 정제효소는 polyacrylamide gel electrophoresis에 의하여 단일밴드로 확인되었으며, 분자량은 SDS PAGE에 의하여 21,000 정도로 측정되었다. 효소의 결정구조는 마름모꼴을 형성하고 있었으며 아미노산 조성은 17종류로써 glutamic acid, glycine, histidine의 함량이 비교적 많았다.

참고문헌

1. Brady, C.J., G. MacAlpine, W.B. Mcglasson and Y. Veda: *Austr. J. Plant physiol.*, **9**, 171 (1982).
2. Brown, M.R. and C.S. Ough: *Amer. J. Enol. Viticult.*, **32**, 272 (1981)
3. Buescher, R.W. and G.E. Hobson: *J. Food Biochem.*, **6**(3), 147 (1982).
4. Minquez Mosquera, M.Z.: *Grasasy Aceites*, **33**, 327 (1982).
5. Pressey, R. and J.K. Avants: *Holt Science*, **17**(3), 398 (1982).
6. Rokhlenko, S.G., L.D. Vanyushkina, S.L. Panikhina and N.S. Tokhmakhchi: *Appl. Biochem. Microbiol.*, **16**, 220 (1980).

7. Kawabe, S. and S. Usami: *J. Jap. Soc. Food Sci. Tech.*, **30**, 140 (1983).
8. Wordsack, C., F. Baum, A. Leuchtenberger and H. Ruffloff: German Democratic Republic patent DD201, 149 (1983).
9. Phaff, H.J. and B.S. Luh: *Arch. Biochem. Biophys.*, **36**, 231 (1952).
10. Phaff, H.J. and A.L. Demain: *J. Biol. Chem.*, **218**, 857 (1956).
11. Endo, A.: *Agric. Biol. Chem.*, **28**, 535 (1964).
12. Endo, A.: *Agric. Biol. Chem.*, **28**, 543 (1964).
13. Endo, A.: *Agric. Biol. Chem.*, **28**, 551 (1964).
14. Lowry, O.H., N.J. Rosebrugh, A.L. Farr and R.J. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
15. Nelson, N.: *J. Biol. Chem.*, **153**, (1944).
16. Wood, P.J. and I.R. Siddiqui: *Anal. Biochem.*, **39**, 418 (1971).
17. Hancock, J.G. and R.L. Miller: *Phytopathology*, **55**, 346 (1965).
18. Davis, B.J.: *Ann. New York Acad. Sci.*, **121**, 404 (1964).
19. Wild, B.L. and J.W. Eckert: *Phytopathology*, **72**(10), 1329 (1982).
20. Spalding, D.H., J.M. Wells and D.W. Allison: *Phytopathology*, **63**, 840 (1973).
21. Weber, K. and M. Osborn: *J. Biol. Chem.*, **244**(16), 4406 (1969).
22. Obi, S.K.C. and N.A. Moneke: *International J. Food Microbiol.*, **1**, 277 (1985).
23. Lee, B.K., J.Y. Yu, R. Yang, S.H. Cho and J. Lew: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **4**(2), 63 (1976).
24. Sakai, T. and M. Okushima: *Agric. Biol. Chem.*, **46**(3), 667 (1982).
25. Sakai, T. and A. Takaoka: *Agric. Biol. Chem.*, **49**(2), 449 (1985).

(Received August 3, 1989)