

Rhizopus oryzae가 生産하는 Glucoamylase의 精製

許元寧 · 鄭萬在*

蓮庵畜産園藝專門大學 · *忠北大學校 食品加工學科

Purification of Glucoamylase Produced by *Rhizopus oryzae*

Won Nyong Hou and Man Jae Chung*

Yonam Junior College of Livestock and Horticulture, Sunghwan, Chungnam

*Department of Food Science and Technology, Chungbuk National University, Chungju

Abstract

These experiments were conducted to purify the glucoamylase produced by *Rhizopus oryzae*. Two forms of glucoamylase (GI and GII) from *Phizopus oryzae* were purified by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fractionation, acetone fractionation and successive column chromatography on DEAE-cellulose and CM-cellulose. The specific activities of GI and GII toward soluble starch were 157.6 U/mg. protein (37.5 fold of crude extract), and 164.7 U/mg. protein (39.2 fold of crude extract), respectively, and the yields of them were 4.3% and 3.8%, respectively. The two purified enzymes have shown a single band by polyacrylamide disc gel electrophoresis and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The protein bands of their electrophoresis gel were revealed to have glucoamylase activity by iodine staining and were proved to be glycoprotein by periodic acid Schiff's staining.

序 論

Glucoamylase는 주로 絲狀菌에 依하여 生産되며 많은 絲狀菌의 glucoamylase가 精製되어 그 酵素의 特性이 報告되었다. 福本⁽¹⁻³⁾등은 *Rhizopus delemar*의 amylase를 結晶化하고 酵素의 性質 및 澱粉分解機構에 關하여 報告하였고, Tsuboi^(7,8)등은 *Mucor rouxianus*로 부터 두가지 型의 glucoamylase (isoenzyme)를 分離 精製하고, Yamasaki⁽⁹⁾등도 *Penicillium oxalicum*에서 두가지 型의 glucoamylase를 分離 精製하였다. 그 밖에 *Rhiz-sp*⁽¹⁰⁾, *Lentinus edodes* (Berko) Sing.⁽¹¹⁾ *Asp. niger*⁽¹²⁾, *Asp. awamori*⁽¹³⁻¹⁵⁾ *Asp. oryzae*⁽¹⁶⁾, *Cephalosporium-charticola* Lindau,⁽¹⁷⁾ *Rhiz. javanicus*⁽¹⁸⁾ *Endomyces sp*⁽¹⁹⁾ 등의 精製에 關한 報告가 있다. 그러나 *Rhizopus oryzae*가 生産하는 glucoamylase의 精製에 關한 報告는 없는 실정이다.

本報에서는 上記酵素를 硫酸 및 acetone 分割과 D-EAE-cellulose 및 CM-cellulose column chromatography에 의해 精製하고 이를 polyacrylamide disc gel electrophoresis에 依하여 精製한 結果를 報告하는

바이다.

재료 및 방법

使用菌株

Rhizopus oryzae (忠地大學校 食品加工學科 保管菌株)를 사용하였다.

培養 및 粗酵素液의 調製

固体培地로 밀기울 6g, 탈지미강 4g, Carboxy methyl cellulose (CMC) 0.05g, Casein 0.1g에 수도물 12ml를 200ml 三角 후라스크에 넣고 잘 混合하여 1.5kg/cm²로 30분간 加圧殺菌하였다. 供試菌을 上記 200ml 후라스크의 培養器에 1白金耳씩 接種하여 30℃에서 6일간 培養한 各 培養후라스크에 150ml의 蒸溜水를 加하여 4℃에서 24시간 抽出하고 10분간 遠心分離(1,000 rpm)한 後 上澄液을 粗酵素液으로 使用하였다.

Activity測定

기질: Soluble starch를 50mM acetate buffer (pH

5.0)에 녹여 1%용액이 되도록 하였다.

測定方法: 1% soluble starch 0.1ml에 酵素液 0.1 ml (pH5.0의 50mM acetate buffer로 희석)를 넣고 37°C에서 10分間 反應시킨 後 Somogyi-Nelson^(17,18) 법에 의하여還元糖을 定量하고 酵素單位는 1分間에 1 μ mole의 glucose를 遊離하는 酵素量을 1Unit (IU)로 하였다. Specific activity는 蛋白質 mg當의 unit로 表示하였다.

蛋白質의 定量

Lowry 등의 方法⁽¹⁹⁾에 의하여 定量하였으며 標準蛋白質으로는 bovine serum albumine을 使用하였다.

Carboxymethylcellulose (CM-cellulose)와 Diethylaminoethylcellulose (DEAE-cellulose)의 處理

CM-Cellulose (Serva社 製品)와 DEAE-Cellulose (Merk社 製品) 各各 20g에 500ml의 증류수를 넣고 교반하여 40分間 放置한 다음 上澄液을 버리는 操作을 3~4回 반복하여 微粒子를 除去한 다음 Buchner 濾斗에 옮겨 0.3N HCl, 0.3N NaOH 및 물로 洗滌하였다.

Polyacrylamide disc gel electrophoresis

Davis의 方法⁽²⁰⁾에 의하여 실시하였으며 酵素蛋白質은 gel당 25~30 μ g程度로 조절하고 gel當 3mA의 전류로 約 90分間 電氣泳動을 實施하고 1% amido black 10B로 1時間 染色한 後 7% acetic acid로 脫色하였다. 但 沃度染色用 gel은 polyacrylamide gel에 soluble starch의 含量이 0.015%되도록 添加하고 전기 泳動을 한 후 전기영동 gel을 column으로 부터 꺼내서 pH5.0

의 acetate buffer 중에서 37°C, 1時間 反應시킨 후 0.02%I₂-0.2%KI溶液으로 染色하였다. Periodic acid-Schiff染色은 Segrest등⁽²¹⁾의 方法에 따라 電氣泳動한 gel을 5% acetic acid-40% ethanol溶液에 6時間 浸漬하여 蛋白質을 固定하고 0.7% HIO₄와 0.2% Na₂S₂O₄로 各各 2~3時間씩 處理한 후 Schiff's reagent로 18時間 染色하여 H₂SO₄로 脫色하였다.

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

Shapiro등⁽²²⁾, Weber등⁽²³⁾의 方法에 따라 0.1% SDS (sodium dodecyl sulfate)를 함유한 10% gel을 使用하여 電氣泳動하였으며, 이 때 酵素蛋白質은 10mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)로 透析하고 1% SDS와 8M의 urea를 함유하는 10mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)에 넣어 37°C에서 3時間 處理하여 變性시켰다.⁽²⁴⁾ 酵素蛋白質은 gel當 10 μ g로 조절하였으며, gel當 8mA의 電流로 4時間 電氣泳動을 實施하였다.

Paper Chromatography

Whatman No.1 여지에 반응액을 10 μ l씩 spot하고 60°C에서 上昇法에 의하여 2回 展開시켰다. 展開劑로는 65% n-propyl alcohol을 사용하였으며 展開 後 glucoamylase를 處理하여 40°C에서 1時間 반응시켜 alkaline silver nitrate dip method⁽²⁵⁾에 의하여 발색시켰다.

結果 및 考察

粗酵素的 反應生成物

實驗菌株가 生産하는 amylase가 glucoamylase인가를 確認하기 위하여 soluble starch와 amylopectin에 대한 10분 및 30분간의 粗酵素的 反應生成物을 paper chromatography한 結果는 Fig. 1과 같다. 主 生成物은 glucose이었으므로 본 酵素가 glucoamylase임을 확인하였다.

硫酸 및 acetone分劃

粗酵素液 5,600ml에 ammonium sulfate를 0.9飽和度가 되도록⁽²⁶⁾ 徐徐히 添加하여 하룻밤 4°C에 放置한 다음 遠心分離(10,000 rpm, 30分)하였다. 分離한 沈澱을 少量의 10mM (CH₃COO)₂Ca를 함유하는 50mM acetate buffer (pH5.0)에 溶解시켜 遠心分離하고 上溶液 400ml를 얻었다. 上澄液에 -20°C의 acetone을 교반하면서 50%⁽²⁷⁾가 되도록 添加하여 얻은 沈澱을 遠心分離하였다. 이 沈澱을 少量의 50mM Tris buffer (pH 8.0)에 녹여 遠心分離하고 同一緩衝液으로 12時間 透析시켜 300ml의 透析液을 얻었다. 以上の 過程을 要約하면 Fig. 2

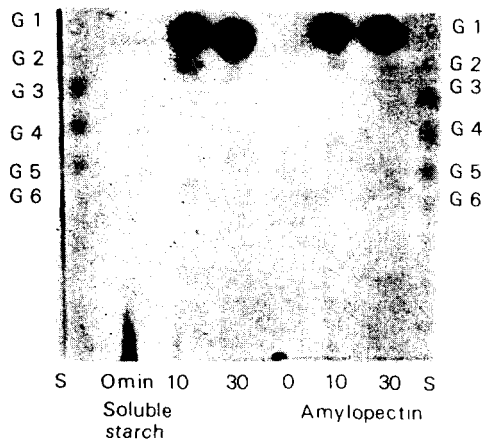


Fig. 1. Paper chromatogram of the hydrolysis products of the crude enzyme on the two polysaccharides

G1: Glucose G2: Maltose
G3: Maltotriose G4: Maltotetraose
G5: Maltopentaose G6: Maltohexaose
S: Standard oligosaccharide

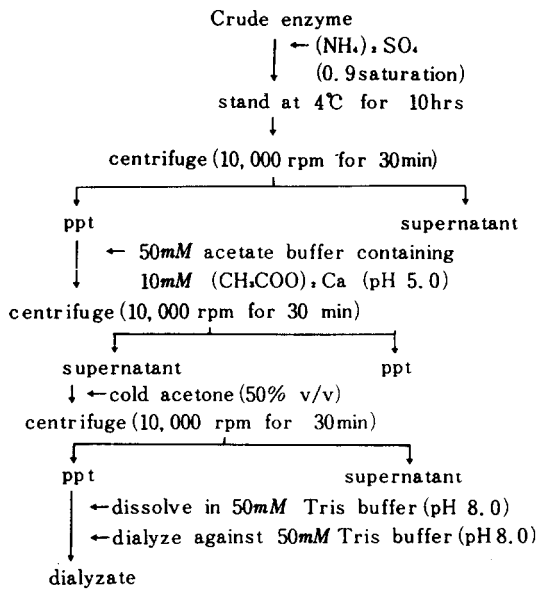


Fig. 2. Flow diagram of ammonium sulfate and acetone fractionation of glucoamylase

와 같다.

DEAE-Cellulose Column Chromatography

透析液 300ml를 50mM Tris buffer (pH 8.0)로 平衡化시킨 DEAE-cellulose column (2.0×25cm)에 注入하였다. 同一 緩衝液 250ml로 column을 洗滌한 後 reservoir에는 0.5M NaCl을 함유하는 50mM Tris buffer (pH 8.0) 200ml와 mixing chamber에는 50mM Tris buffer (pH 8.0) 200ml를 넣고 溶出시켰으며, 이 때 溶出速度는 19ml/hr이고 5ml씩 分劃하였다.

各 fraction의 蛋白質量은 mg/ml로, glucoamylase activity는 U/ml로 表示하였다. Fig. 3에서 보는바와 같

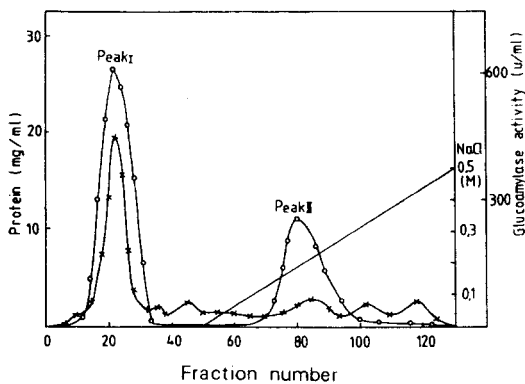


Fig. 3. DEAE-cellulose colose column chromatography (pH 8.0) of glucoamylase preparation obtained from acetone fractionation
 ○—○ : Glucoamylase activity
 ×—× : Protein — : NaCl

이 fraction No. 12~34와 fraction No. 74~102에서 peak가 나타났다. Peak I은 色素를 거의 함유하고 있지 않았으나 peak II는 多量의 色素를 함유하고 있었다.

1次 CM-Cellulose Column Chromatography

DEAE-cellulose column chromatography에서 glucoamylase activity가 큰 peak I을 모아 硫酸으로 監析하고 遠心分離하여 얻은 沈澱을 少量의 2mM (CH3COO)2Ca를 함유하는 50mM citrate buffer (pH 3.0)에 녹인 다음 같은 緩衝液으로 12時間 透析시켰다. 透析酵素液을 pH 3.0의 같은 緩衝液으로 平衡化시킨 CM-cellulose column에 注入하고 400ml의 같은 緩衝液으로 洗滌한 다음 reservoir에는 0.5M NaCl을 함유하는 같은 緩衝液 300ml와 mixing chamber에는 같은 緩衝液 300ml를 넣고 溶出시켰다. 이 때 溶出速度는 15 ml/hr이고 4ml씩 分劃한 結果는 Fig. 4와 같다. linear gradient elution을 하기 전에 色素를 함유하고 活性이 微弱한 peak가 나타났으며 fraction No. 120~180에서 活性이 큰 peak가 나타났다.

2次 CM-Cellulose Column Chromatography

前 段階에서 活性이 큰 peak부분 (fraction No. 120~180)을 모아 硫酸으로 監析하고 10mM (CH3COO)2Ca를 함유하는 50mM acetate buffer (pH 4.2)로 12時間 透析시킨 酵素液을 같은 緩衝液으로 平衡化시킨 CM-cellulose column에 注入하고, 160ml의 같은 緩衝液으로 洗滌하였다. Reservoir에는 같은 緩衝液 250ml (0.5 M-NaCl含有)와 mixing chamber에는 같은 緩衝液 250 ml를 넣고 溶出시켰다. 이 때 溶出速度는 15ml/hr이고 3.5ml씩 分劃하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 fra-

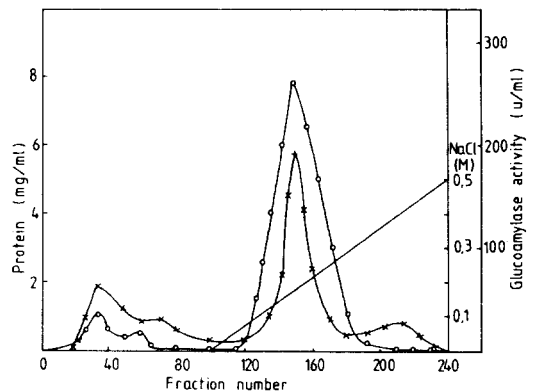


Fig. 4. First CM-cellulose column chromatography (pH 3.0) of glucoamylase preparation obtained from DEAE-cellulose column chromatography
 ○—○ : Glucoamylase activity
 ×—× : Protein — : NaCl

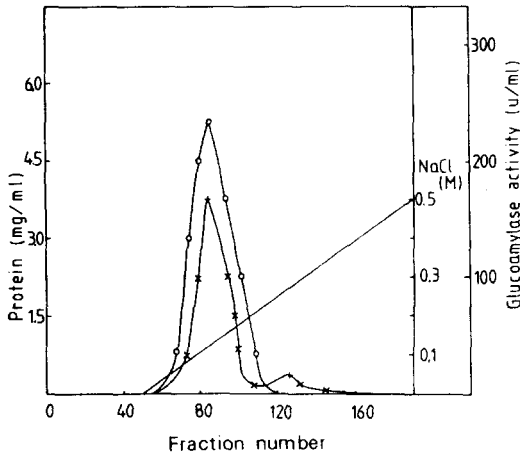


Fig. 5. Second CM-cellulose column chromatography (pH 4.2) of glucoamylase preparation obtained from first CM-cellulose column chromatography
 ○—○ : Glucoamylase activity
 ×—× : Protein — : NaCl

ction No. 63~113에서 1개의 活性 peak가 나타났다.

3次 CM-Cellulose Chromatography

前 段階의 活性 peak 部分을 모아 硫酸으로 監析하고 1次와 같은 CM-cellulose chromatography를 실시하였다. 이 때 column은 200ml의 같은 緩衝液으로 洗滌하고 reservoir (0.5M NaCl를 含有한 완충액)와 mixing chamber는 各各 200ml의 같은 緩衝液을 넣고 溶出시켰으며 이 때의 溶出速度는 24ml/hr이고 4ml씩 分割하였다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 protein peak와 活性 peak는 一致하였으며 peak 部分의 fraction을 各各 polyacrylamide disc gel electrophoresis를 한 結果는 Fig. 7과 같이 fraction No. 92~96에는 두가지 酵

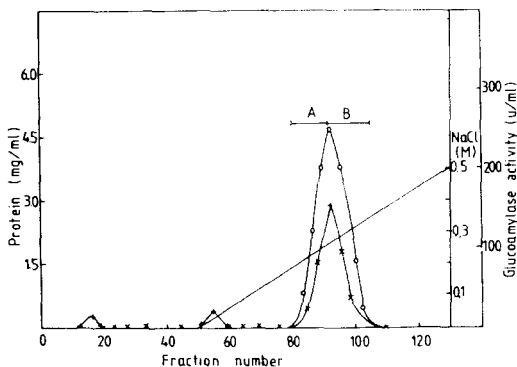


Fig. 6. Third CM-cellulose column chromatography (pH 3.0) of glucoamylase preparation obtained from second CM-cellulose column chromatography
 ○—○ : Glucoamylase activity
 ×—× : Protein — : NaCl

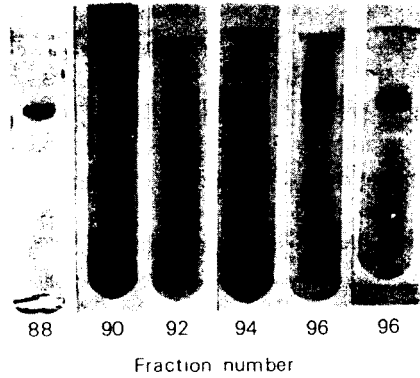


Fig. 7. Polyacrylamide disc gel electrophoresis pattern of glucoamylase preparation obtained from third CM-cellulose column chromatography (fraction No. 88~98)

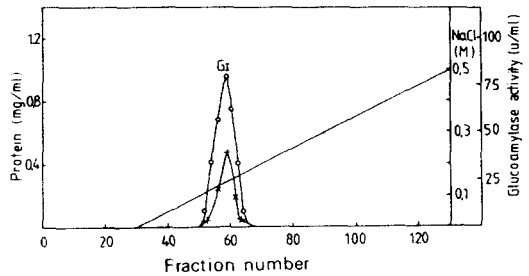


Fig. 8A. Fourth CM-cellulose column chromatography (pH 4.2) of glucoamylase preparation obtained from third CM-cellulose column chromatography (fraction No. 80~91)
 ○—○ : Glucoamylase activity
 ×—× : Protein — : NaCl

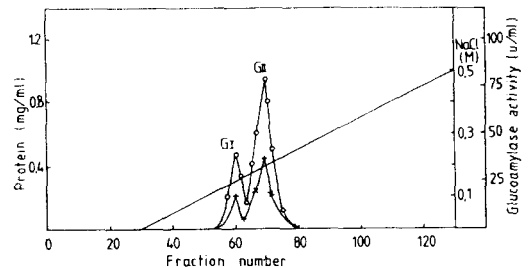


Fig. 8B. Fourth CM-cellulose column chromatography (pH 4.2) of glucoamylase preparation obtained from third CM-cellulose column chromatography (fraction No. 92~104)
 ○—○ : Glucoamylase activity
 ×—× : Protein — : NaCl

素蛋白質이 混在하고 있으나 fraction No. 88과 96에는 다른 酵素蛋白質이 極微量 混在되어 있었다. 以上の 結果에 依하여 part A (fraction No. 80~91)와 part B (fraction No. 92~104)로 나누어 다음 段階의 column chromatography를 실시하였다.

4次 CM-Cellulose Column Chromatography

前 段階에서 나눈 A부분과 B부분을 各各 pH 4.2의

10mM (CH₃COO)₂Ca를 함유하는 50mM acetate buffer 로 透析하고 이를 2次 CM-cellulose column chromatography와 同一하게 實施하였다. 이 때 같은 緩衝液 120ml로 洗滌하고 0.5M NaCl을 含有한 같은 緩衝液 200ml를 reservoir에, 그리고 같은 緩衝液 200ml 를 mixing chamber에 넣고 溶出시킨 結果는 Fig. 8 A, Fig. 8 B와 같다. Fig. 8 A의 fraction No. 52~64, Fig.8 B의 fraction No. 65~77를 따로 모아 polyacrylamide disc gel electrophoresis를 實施한 結果, 單一 酵素蛋白質임을 確認하였으며, 前者를 glucoamylase I 後者

를 glucoamylase II 로 表示하였다. 또한 Fig. 8B의 f-fraction No. 55~64는 Fig. 8A와 同一한 酵素임을 確認하였다.

以上の 精製過程을 통하여 本 菌株의 glucoamylase 는 두가지형의 glucoamylase로 分離되었다. 精製酵素 glucoamylase I (以下 GI)의 Specific activity는 157.6 U/mg·protein (原比活性的 37.5倍) 이고, 收率은 4.3% 이었다. 精製酵素 glucoamylase II (以下 GII)의 Specific activity는 164.7U/mg·protein (原比活性的 39.2倍) 이고 收率은 3.8%이었다. 以上の 精製過程을 要約 하면 Table 1 과 같다.

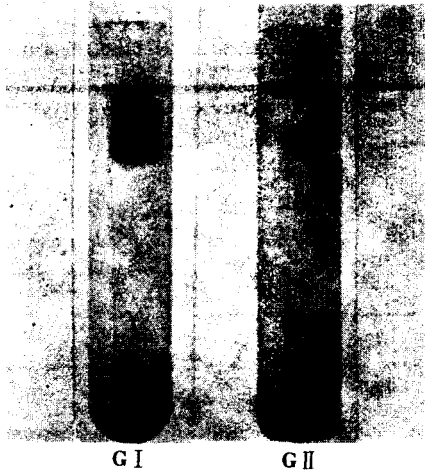


Fig. 9. Pattern of polyacrylamide disc gel electrophoresis of the two purified glucoamylases
G I ; glucoamylase I
G II ; glucoamylase II

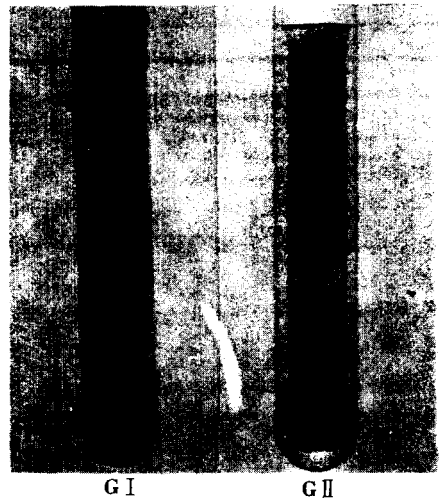


Fig. 10. Pattern of SDS-polyacrylamide disc gel electrophoresis of the two purified glucoamylases

Table 1. Purification procedure of glucoamylamyase I and II

Step	Total volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (Unit)	Specific activity (Unit/mg protein)	Yield (%)
Crude enzyme	5,600	10,640	45,080	4.2	100.0
(NH ₄) ₂ SO ₄ fractionation	400	3,360	41,067	12.2	91.1
Acetone fractionation	300	1,680	32,166	19.1	71.4
DEAE-cellulose column chromatography (pH 8.0)	110	875	30,140	34.4	66.9
First CM-cellulose column chromatography (pH 3.0)	220	440	24,992	56.8	55.4
Second CM-cellulose column chromatography (pH 4.2)	150	234	16,016	68.4	35.5
Third CM-cellulose column chromatography (pH 3.0)					
Part A	45	54.8	5,186	94.6	11.5
Part B	35	50.0	4,831	96.6	10.7
Fourth CM-cellulose column chromatography (pH 4.2)					
Glucoamylase I	60	12.3	1938.4	157.6	4.3
Glucoamylase II	50	10.4	1713.0	164.7	3.8

電氣泳動

精製한 glucoamylase I (GI) 및 glucoamylase II (GII)를 polyacrylamide disc gel electrophoresis 와 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 實施한 結果는 Fig. 9, Fig. 10과 같이 各各 단일 band를 나타내었으며 GII가 GI에 比하여 移動도가 약간 작았다.

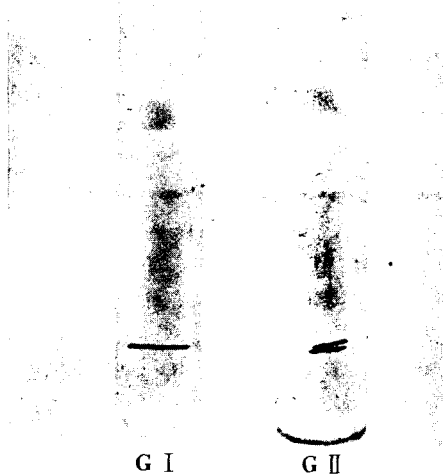


Fig. 11. Iodine staining pattern of polyacrylamide disc gel electrophoresis of the two purified glucoamylases



Fig. 12. Periodic acid Schiff's (PAS) staining pattern of polyacrylamide disc gel electrophoresis of the two purified glucoamylases

또한 蛋白質 band의 glucoamylase의 活性與否를 確認하기 위하여 沃度染色을 한 結果는 Fig. 11과 같이 GI와 GII의 蛋白質 band는 다같이 glucoamylase의 活性을 나타내었다. 그리고 本 精製酵素가 glycoprotein인지 아닌지를 確認하고자 PAS (periodic acid-Schiff) 染色을 實施한 結果는 Fig. 12에서 보는 바와 같이 두가지 酵素의 蛋白質 band는 Schiff's reagent에 依해 靑紫色으로 染色되었다. 따라서 本 酵素蛋白質은 glycoprotein의 一種임을 알 수 있었다.

要約

*Phizopus oryzae*가 生産하는 glucoamylase를 確安 및 acetone 分割과 이온교환수지의 column chromatography에 의하여 精製하였다. 即 粗酵素液을 硫安分割 acetone 分割, DEAE-cellulose column chromatography, CM-cellulose column chromatography에 依하여 두가지型의 glucoamylase를 分離精製하였으며 이들을 各各 glucoamylase I과 II라고 하였다. Glucoamylase I과 II의 Specific activity는 各各 157.6 U/mg·protein (粗酵素液의 37.5倍) 164.7 U/mg·protein (粗酵素液의 39.2倍) 이었고 收率은 各各 4.3%, 3.8% 이었다. Glucoamylase I과 II는 polyacrylamide disc gel electrophoresis와 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis에 依하여 各各 單一한 band를 나타내었고 이 蛋白質 band는 沃度染色에 依해 glucoamylase 活性을, PAS染色에 依해 glycoprotein임을 確認하였다.

文獻

1. 福本壽一即, 辻阪好夫, 南井邦美: 科学と工業, 28, 92 (1954)
2. 福本壽一即, 辻阪好夫: 科学と工業, 28, 287 (1954)
3. 福本壽一即, 辻阪好夫: 科学と工業, 29, 268 (1954)
4. 福本壽一即, 辻阪好夫: 科学と工業, 29, 272 (1954)
5. 辻阪好夫, 福本壽一即: 科学と工業, 30, 130 (1956)
6. 辻阪好夫, 福本壽一即: 科学と工業, 30, 398 (1956)
7. Yamasaki, Y., Tsuboi, A. and Suzuki, Y.: *Agri. Biol. Chem.*, 38, 543 (1974)
8. Yamasaki, Y., Tsuboi, A. and Suzuki, Y.: *Agri. Biol. Chem.*, 41, 2139 (1977)
9. Yamasaki, Y., Suzuki, Y. and Ozawa, J.: *Agri. Biol. Chem.*, 41, 755 (1977)
10. Takahashi, T., Tsuchida, Y. and Irie, M.: *J. Biochem.*, 84, 1183 (1978)

11. Yamasaki, Y. and Suzuki, Y. : *Agri. Biol. Chem.*, **42**, 971 (1978)
12. Lineback, D. R., Russell, I. J. and Rasmussen, C. : *Arch. Biochem. Biophys.*, **134**, 539 (1969)
13. Yamasaki, Y., Suzuki, Y. and Ozawa, J. : *Agri. Biol. Chem.*, **41**, 2149 (1977)
14. Hayashida, S. : *Agri. Biol. Chem.*, **39**, 2093 (1975)
15. Watanabe, K. and Fukimbara, T. : *J. Ferment. Technol.*, **43**, 690 (1965)
16. Watanabe, K. and Fukimbara, T. : *J. Ferment. Technol.*, **43**, 864 (1965)
17. Watanabe, K. and Fukimbara, T. : *J. Ferment. Technol.*, **44**, 25 (1966)
18. Watanabe, K. and Fukimbara, T. : *J. Ferment. Technol.*, **44**, 392 (1966)
19. Ryzhakova, W. G. and Feniksova, R. W. : *Biokhimiya*, **37**, 1019 (1972)
20. Morita, Y., Shimizu, K., Ohga, M. and Korenaga, T. : *Agri. Biol. Chem.*, **30**, 114 (1966)
21. Krzechowska, M. and Urbank, H. : *Applied Microbiology*, **30**, 163 (1975)
22. Watanabe, K. and Fukimbara, T. : *J. Ferment. Technol.*, **46**, 992 (1968)
23. Fukui, T. and Nikumi, Z. : *Agri. Biol. Chem.*, **33**, 884 (1969)
24. Nelson, N. : *J. Biol. Chem.*, **153**, 375 (1954)
25. Somogyi, M. : *J. Biol. Chem.*, **195**, 19 (1952)
26. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Faar, A. L. and Randall, R. J. : *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
27. Davis, B. J. : *Ann. New York Acad. Sci.*, **121**, 404 (1964)
28. Segrest, J. P. and Jackson, R. L. : *Method in Enzymology*, **28**, 54 (1972)
29. Shapro, A. L., Vinula, E. and Maizel, J. V. : *Biol. Biophys. Res. Comm.*, **28**, 815 (1967)
30. Waber, K. and Dsborn, M. : *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406 (1969)
31. Trevelyan, W. E., Procter, D. P. and Harrison, J. S. : *Nature*, **166**, 441 (1950)

(1984년 6월 5일 접수)