

Rhizopus oryzae 가 생성하는 생전분 분해효소의 정제 및 특성

김찬조 · 오만진 · 이종수
충남대학교 식품가공학과

Purification and Characterization of Raw Starch-Digesting Enzyme from *Rhizopus oryzae*

Chan Jo Kim, Man Jin Oh and Jong Soo Lee

Dept. of Food Sci. and Technol., College of Agriculture, Chungnam Natl. University, Taejeon

Abstract

A raw starch-digesting enzyme from *Rhizopus oryzae* was purified by ammonium sulfate fractionation, DEAE-sephacel column chromatography and Sephadex G-150 gel filtration. The specific activity of purified enzyme was 45.2 U/mg protein and the yield was 16.2%. The purified enzyme was found to be homogeneous by polyacrylamide gel electrophoresis and its molecular weight was estimated to be 67,000 by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, and also the enzyme had Km value of 4.082 mg/ml for raw corn starch. The optimal temperature and pH for the enzyme activity were 50°C and 4.0-5.0, respectively. Reaction product of raw corn starch by purified enzyme was glucose mainly.

서 론

전보⁽¹⁾에서 생전분 분해력이 강한 균주로 선정된 *Rhizopus oryzae* 가 생성하는 생전분 분해효소의 최적 생산조건을 검토하고 또한 그 조효소액과 효모로 에탄올 발효실험을 하여 발효 4일 후 옥수전분으로부터 약 9.0%의 에탄올을 생산한 결과등을 보고하였다.

생전분 분해효소의 정제와 특성에 관한 연구는 UH⁽²⁾ 등⁽²⁾에 의하여 주로 옥곡균을 중심으로 많이 연구되었고 그 밖에 溝上⁽³⁾의 연구가 있으나 국내에서는 손 등⁽⁴⁾의 연구가 발표되어 있을 뿐이다. 따라서 본 연구에서는 *Rhizopus oryzae* 가 생성하는 생전분 분해효소의 효소학적 특성을 검토하고자 이들 조효소액을 유안염석과 column chromatography 및 gel 여과등으로 정제한 후 효소학적 특성을 조사하고 TLC에 의하여 분해 생성물을 검토한 결과를 보고하는 바이다.

실험 방법

효소정제

가. 염석 및 탈염

전보⁽¹⁾에서와 같이 조효소액을 만든 다음 0.3포화가 되도록 황산암모니아를 가하여 4°C에서 3시간 방치한 후 8000×g에서 20분간 원심분리하여 침전물을 제거하고 그 상징액에 황산암모니아를 0.7포화가 되도록 가

하여 4°C에서 3시간 방치한 후 원심분리로 효소단백질을 분리하였다. 분리한 단백질을 0.05M acetate 완충액 (pH5.6)에 녹여 투석막(Sigma 사 model 250-7u)에 넣고 수도수로 황산이온반응이 소실될 때 까지 투석하여 황산암모니아를 제거하였다.

나. DEAE-sephacel column chromatography

투석한 효소액을 0.05M acetate 완충액 (pH5.6)으로 평형시키고 세척한 DEAE-sephacel column(3.5×30 cm)에 주입시키고 KCl을 0.5M 까지 linear salt gradient로 하여 20ml/hr의 유속으로 5ml씩 분취하였다.

다. Sephadex G-150 겔 여과

DEAE-sephacel column chromatography에서 효소 활성이 강한 분획을 모아서 탈염, 농축시킨 후 0.05M acetate 완충액 (pH5.6)으로 평형시킨 sephadex G-150 column(3.5×60cm)에 주입하여 0.5ml/min의 유속으로 5ml씩 분취하였다.

효소활성 측정 및 단백질 정량

전보⁽¹⁾에서와 같이 생전분 분해활성을 측정하였고 단백질은 Lowry 법⁽⁵⁾으로 bovine serum albumin을 표준 단백질로 하여 정량하였다.

효소학적 특성

가. 전기영동

정제효소의 순도를 검정하기 위하여 Davis 법⁽⁶⁾에 따라 7.5% polyacrylamide gel (0.5×6cm, pH8.3)로서 column 당 2mA의 전류를 통하여 2시간 영동시킨 후 amido black 10B로 염색하고 1%의 methanol을 함유한 7% acetic acid로 탈색 검정하였다.

나. 분자량 측정

Weber와 Osborn⁽⁷⁾의 방법으로 SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 실시하여 표준단백질의 분자량과 상대이동거리를 반대수 그래프에 plot하여 구하였다. 즉 정제효소와 표준단백질을 각각 1% sodium dodecyl sulfate(SDS)와 1% 2-mercaptoethanol을 함유한 0.01M 인산완충액(pH7.0) 1ml에 넣어 37°C에서 2시간 처리한 후 이들 용액 50μl에 0.01% BPB 3μl glycerol 1방울, 2-mercaptoethanol 5μl 및 루석완충액 (0.1% SDS와 2-mercaptoethanol을 함유한 0.01M 인산완충액, pH7.0) 50μl을 가하여 혼합한 후 별도로 만든 0.1% polyacrylamide gel 상부에 주입하고 column 당 8mA로 3시간 영동시킨 후 전과 같은 방법으로 염색 및 탈색을 시켰다.

다. Michaelis 정수

옥수수전분의 농도를 ml 당 1~10mg까지 달리하여 초기반응속도를 측정하고 이것과 전분농도와의 관계를 Lineweaver-Burk⁽⁸⁾ 방식에 따라 도시하여 Km 값과 Vmax 값을 구하였다.

라. 온도 및 pH

0.05M acetate 완충액(pH4.0) 10ml에 옥수수전분 250 mg을 가하고 효소액 (6.5U/ml) 1ml를 첨가하여 20~80°C까지 5°C 간격으로 60분 반응시킨 후 상대활성을 측정하여 반응 최적온도를 검토하였고 최적 pH는 Clark-Lubs 및 McIlvaine 완충액으로 pH를 1.0~8.0까지 0.5간격으로 조정하여 최적온도 검토시와 같은 방법으로 상대활성을 측정하여 반응 최적 pH를 검토하였다.

마. 각종 전분의 분해력

0.05M acetate 완충액 10ml에 옥수수, 고구마, 감자 및 쌀등의 각 생전분과 옥수수의 amylose 및 amylopectin을 각각 2.5%씩 첨가하여 최적온도 검토시와 같은 방법으로 상대활성을 측정하여 각종 전분에 대한 정제효소의 분해력을 검토하였다.

바. 온도 및 pH 안정성

효소액에 동량의 0.05M acetate 완충액을 혼합하여 20~80°C까지 일정온도에서 1시간 처리한 후 잔존활성을 측정하여 온도의 안정성을 검토하였고 Clark-Lubs 완충액(pH1.0~2.2), McIlvaine 완충액(pH2.2~8.0) 및 Kolthoff 완충액 (pH8.0~12.0)으로 각각 일정한 pH로 조정된 후 동량의 효소액을 혼합하여 5°C에서

10시간 방치한 후 잔존활성을 측정하여 pH의 안정성을 검토하였다.

사. 금속이온의 영향

0.05M acetate 완충액(pH4.0) 10ml, KCl, NaCl, MgCl₂, CaCl₂, FeCl₂, BaCl₂, LiCl, HgCl₂, CuCl₂, MnCl₂, 및 EDTA 등을 1mM과 10mM씩 각각 첨가하여 60분 반응시킨 후 상대활성을 측정하여 금속이온의 영향을 검토하였다.

분해생성물의 TLC

0.5% 옥수수전분 100ml에 정제효소액(6.5u/ml) 1ml을 가하여 40°C에서 1시간 및 20시간 반응시킨 후 1ml을 취하여 0.1N NaOH 0.5ml를 가하여 반응을 중지시키고 그 여액을 표준당과 함께 TLC 판(silica gel 60 aluminium 판, Merk 사제품)에 점적하여 n-butano : acetic acid : H₂O = 12 : 3 : 5의 용매로 상향법으로 전개시키고 건조시킨 후 aniline diphenylamine phosphate 시약⁽⁹⁾으로 발색시켜 반응 생성물을 검정하였다.

결과 및 고찰

효소의 정제

그림1, 2와 표1과 같이 정제효소의 비활성은 45.2u/mg, 수율은 16.2%이었다. 이는 손등⁽⁴⁾이 *Aspergillus niger*와 변이주의 생전분 당화효소를 정제한 결과 비활성이 27.6U/mg, 수율이 13.8%보다 높은 결과이었고 溝上⁽³⁾등이 *Streptococcus bovis*가 생성하는 생전분 분해효소를 정제하였을 때 비활성이 245U/mg, 수율이 65.5%였다는 결과보다는 낮은 결과이었다.

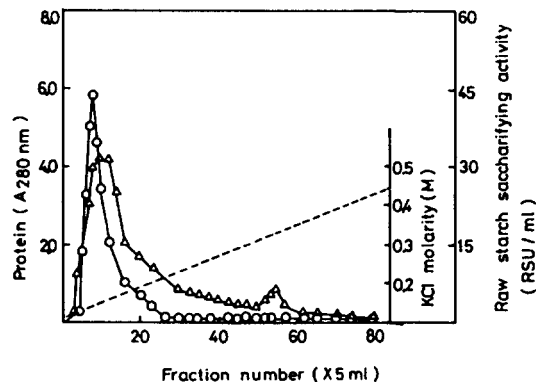


Fig. 1. Ion exchange chromatography on DEAE-sephacel

- △-△-△ : protein
- : KCl molarity
- : raw starch saccharifying activity

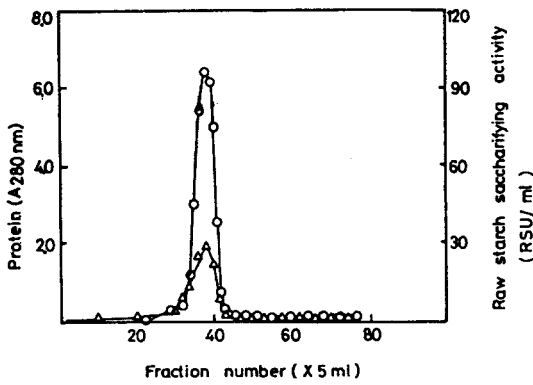


Fig. 2. Gel filtration on sephadex G-150

△-△ : protein
○-○ : raw starch saccharifying activity

순도 및 분자량

전기영동법으로 정제효소의 순도를 검정한 결과 그림 3과 같이 단일밴드로 나타나 전기영동상의 순도를 입증할 수 있었다. 또한 SDS-polyacrylamide gel 전기



Fig. 3. Polyacrylamide gel electrophoresis of the purified enzyme

영동에 의한 정제효소의 분자량은 그림 4와 같이 약 67,000으로 추정되었다.

Michaelis 점수

그림 5에서와 같이 옥수수전분에 대한 정제효소의 Km 값은 4.082mg/ml 였고 Vmax 는 1.389mg/ml/min. 였다.

최적온도 및 pH

정제효소의 작용 최적온도는 그림 6과 같이 50°C 부근으로 이는 손등(4)이 보고한 온도보다 다소 낮은 결과이며 작용 최적 pH는 그림 7과 같이 pH 4.0~5.0이었다.

각종전분의 분해력

그림 8과 같이 효소반응에 적합한 전분은 옥수수

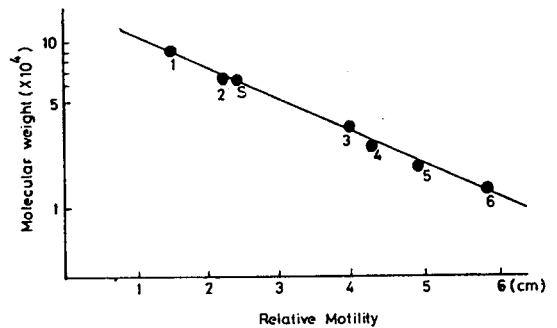


Fig. 4. Determination of molecular weight by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

1. Phosphorylase (94,000)
2. Bovin serum albumin (68,000)
3. Oval albumin (43,000)
4. Carbonic anhydrase (30,000)
5. Soybean trypsin inhibition (20,100)
6. α-Lactoalbumin (14,400)

Table 1. Summary of purification steps of raw starch-digesting enzyme from *Phizopus oryzae*

Purification step	Volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (RSU)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)
Crude enzyme	5,000	1,010	2,650	2.62	100
Ammonium sulfate fractionation	50	146	1,575	10.78	59.4
DEAE-sephacel chromatography	112	52.1	620	11.9	23.4
Sephadex G-150 gel filtration	30	9.5	430	45.2	16.2

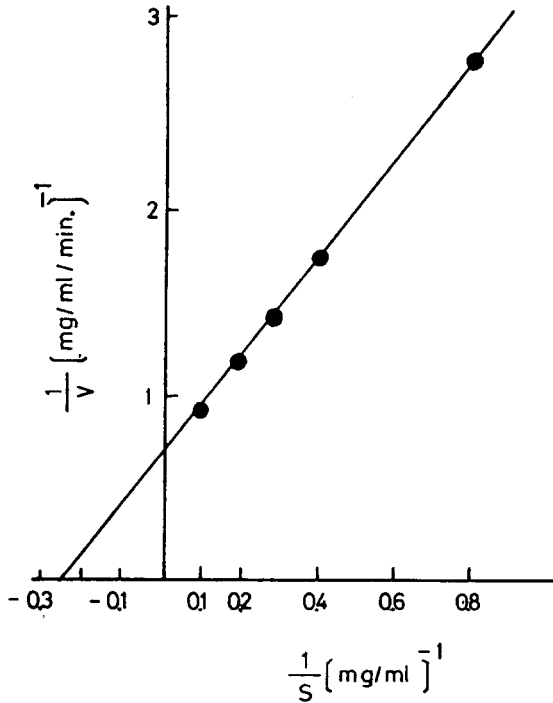


Fig. 5. Lineweaver-Burk plot for the determination of Michaelis constant on raw corn starch

amylose > 옥수수 amylopectin > 옥수수 생전분 > 고구마 생전분 > 옥수수 호화전분 > 감자 생전분의 순 있었다. 한편 上田등(2)은 옥곡균이 생성하는 생전분 분해효소가

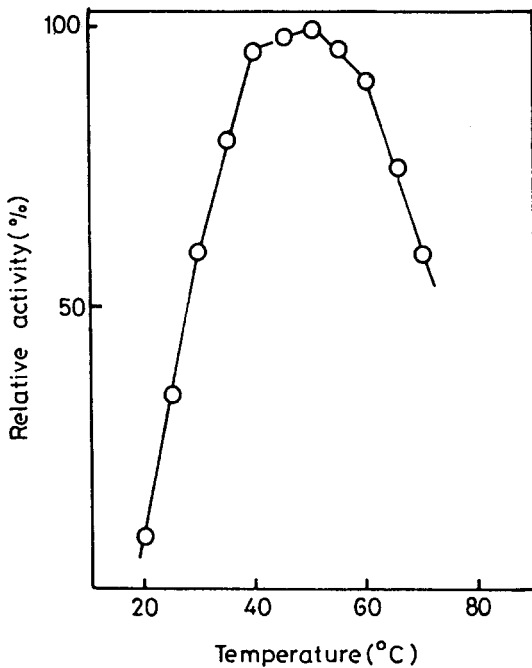


Fig. 6. Effect of temperature on the activity of the purified enzyme

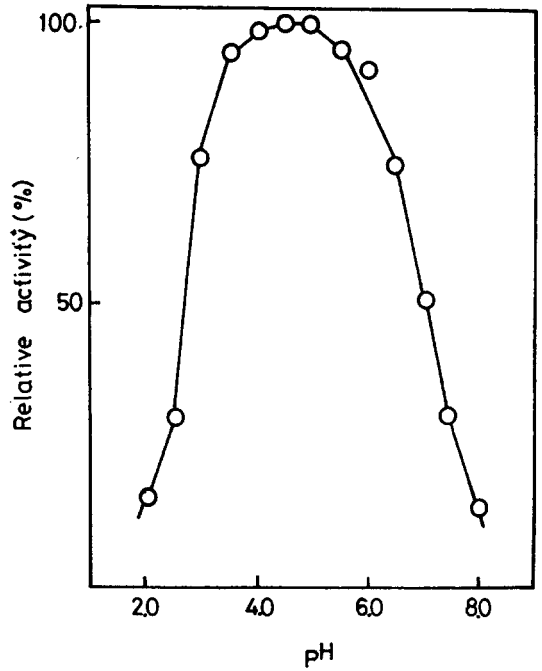


Fig. 7. Effect of pH on the activity of the purified enzyme

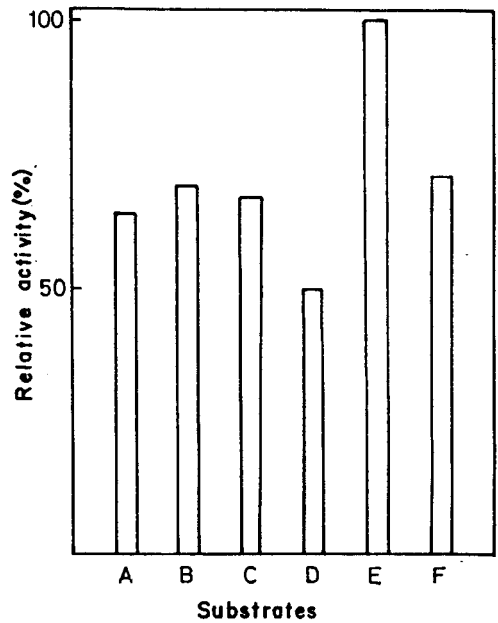


Fig. 8. Digesting activity of the purified enzyme on various kinds of 2.5% solution of raw starch

- A: cooked corn starch
- B: raw corn starch
- C: sweet potato starch
- D: potato starch
- E: corn-amylose
- F: corn-amylopectin

활발전분>가용성전분>glycogen의 순으로 잘 작용하였다고 보고한 바 있다.

온도 및 pH 안정성

그림 9와 같이 50°C에서 1시간 처리하였을 때 90% 이상의 활성이 있었고 70°C에서는 70%정도의 활성을 보였다. 이는 *Streptococcus bovis*가 생성하는 생전분 분해효소의 열 안정성이 50°C였다는 溝上등⁽³⁾의 결과와 비슷하였다. 한편 pH 안정성은 5°C에서 각 pH로 10시간 처리하였을 때 그림 10과 같이 pH3.5~5.0에서 가장 안정하였으며 그 이외의 pH에서는 현저히 실패되었다.

금속이온의 영향

표 2와 같이 Ca²⁺은 효소활성을 증진시켰으나 Hg²⁺와 Fe²⁺ 및 Cu²⁺등은 효소활성을 저해하였다. 이는 *Rhizopus* sp.가 생성하는 glucoamylase의 활성이 Hg²⁺에 의해 심하게 저해를 받았다는 Takahashi 등⁽¹⁰⁾의 결과와 유사하였다.

분해 생성물의 검토

옥수수전분에 대한 정제효소의 분해 생성물을 TLC로 검토한 결과, 그림 11에서와 같이 반응 20시간 후의 분해 생성물은 거의 glucose였다.

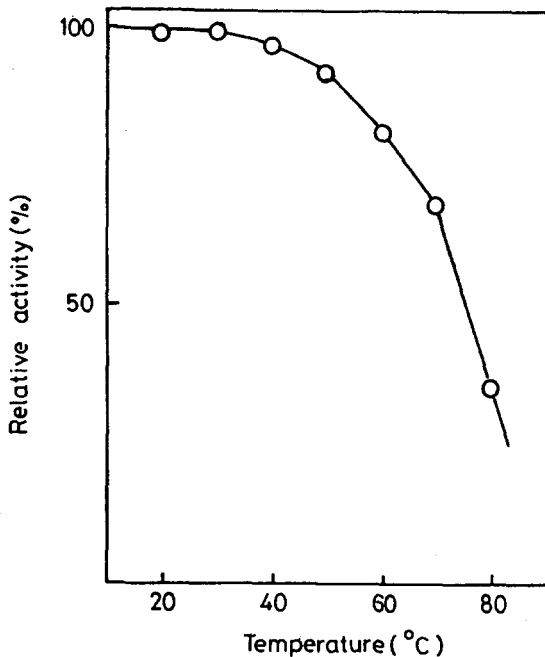


Fig. 9. Effect of temperature on the stability of the purified enzyme

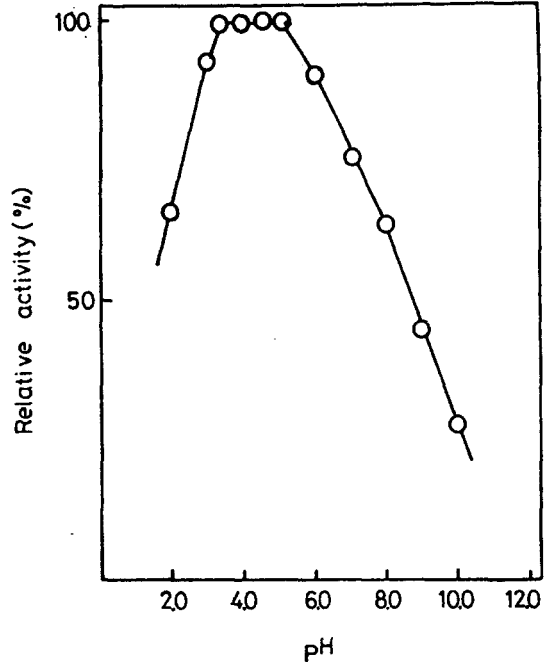


Fig. 10. Effect of pH on the stability of the purified enzyme

Table 2. Effect of metal ions on the activity of the purified enzyme

Metal ions	Relative activity (%)	
	1mM	10mM
None	100	100
Na ⁺	98	102
K ⁺	88	96
Mg ²⁺	98	103
Ca ²⁺	100	110
Fe ²⁺	73	44
Cu ²⁺	79	54
Ba ²⁺	98	101
Li ⁺	97	105
Hg ²⁺	68	41
Mn ²⁺	101	103
EDTA	92	95

요 약

유안염석과 column chromatography 및 gel 여과 등으로 비활성이 45.2U/mg가 되는 정제된 *Rhizopus oryzae*의 생전분 분해효소를 16.2%의 수율로 얻었다. 정제효소는 전기영동상에서 그 순도가 인정되었고 분자량은 67000, Km 값은 4.082mg/ml이었다. 정제효



Fig. 11. Thin layer chromatogram of the reaction products of raw corn starch by purified enzyme

St: standard sugars 1: sample after 1 hrs
 G: glucose reaction
 M: maltose 2: sample after 20 hrs
 S: soluble starch reaction

소는 50°C, pH 4.0~5.0에서 잘 작용하였으며 옥수수 amylose가 가장 적합한 전분이었고 옥수수 생전분에 작용한 분해산물은 거의 glucose였다.

감사의 말

본 연구는 1983-1984년도 한국과학재단의 연구비

지원으로 수행되었으며 재단당국과 관계하시는 여러분께 깊은 감사를 드립니다.

문 헌

1. 김찬조, 오만진, 이종수 : 한국 산업 미생물학회지, 13(4), 329-338(1985)
2. 上田 誠之助 : 澱粉科學, 25(2), 124-131(1978)
3. 溝上 恭平, 小崎 道雄, 北原 賞雄 : 日農化誌, 51(5), 299-307(1977)
4. 손천배, 박윤중 : 충남대 농기연보, 10(1), 166-185(1983)
5. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Faar, A.L., and Randall, R.J.: *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951)
6. Davis, B.J.: *Ann. New York Acad. Sci.*, 121, 404 (1964).
7. Weber, K., and Osborn, M.: *J. Biol. Chem.*; 244, 44-46 (1969)
8. Lineweaver, H. and Burk, D.: *J. Amer. Chem. Soc.*, 56, 658-666 (1934)
9. Zweig, C., and Sherma, J.: *Handbook of Chromatography*, CRC Press, Cleveland, p. 463 (1972)
10. Takahashi, T., Tsuchida, Y., and Irie, M.: *J. Biochem.*, 84, 1183-1194 (1978)

(1986년 5월 26일 접수)