

## *Aspergillus awamori* 가 생산하는 konjak mannan 분해 효소에 관한 연구

張慶貞 · 李瑞來

放射線農學研究所 食品工學研究室

(1972. 11. 3. 수리)

### A Study on the Konjak Mannan-hydrolyzing Enzymes from *Aspergillus awamori*

Kyung Jung Chang and Su Rae Lee

Food Technology Division, Radiation Research Institute in Agriculture, Seoul

(Received Nov. 3, 1972)

#### Summary

As a study on the konjak mannan-hydrolyzing enzymes from *Aspergillus awamori*, the culture conditions for enzyme formation, purification and properties of the enzymes and the effect of gamma-irradiation on the enzymatic hydrolysis were investigated. The results are summarized as follows:

- 1) A strain of *A. awamori* was selected as having the highest productivity of mannan-ase among 81 species of molds.
- 2) The optimum conditions for solid culture on wheat bran were 3 days of culture period, pH 4 of spraying water and 100% addition of tap water.
- 3) The optimum conditions for shaking culture were 6 days of culture period, addition of 0.1% xylose plus 0.5% konjak mannan and of 0.04% peptone.
- 4) Konjak mannan-hydrolyzing enzymes were separated into fraction I and fraction II by ammonium sulfate fractionation and DEAE-Sephadex column chromatography.
- 5) Fractions I and II showed pH optima of 4, pH stability of 3.5~5 and 3~6 and the extent of hydrolyzing konjak mannan 9% and 50%, respectively.
- 6) Hydrolysis of konjak mannan by a crude enzyme preparation was partially accelerated by gamma-irradiation of substrate above 0.5 Mrad and the effect was more remarkable by irradiating in wet state than in dry state.
- 7) Gamma-irradiation of konjak mannan brought about the increase in reducing power and decrease in viscosity and the effect was more remarkable in wet state than in dry state.

## 머릿말

konjak mannan 은 *Amorphophallus konjak* 의 球根다당류로서 극동지역에서 日本食品인 오명의 원료로 이용되는 konjak flour 의 主成分이다.

konjak mannan 의 화학구조는 glucose 와 mannose 가 1 : 2의 비율로 구성된 glucomannan 이라 알려져 있으나 두 다당류의 構成비율이나 結合 방식에 대하여 결과가 일치되지 않고 있다. 즉 Nishida 및 Hashima<sup>(1)</sup>는 methylation 의 결과 glucose 와 mannose 가 1,6 결합된 것이 repeating unit 로서 1,4 결합에 의하여 分枝되었다고 하였다. 한편 Smith 및 Srivastava<sup>(2)</sup>의 追試에 의하면 glucose : mannose 가 2 : 3의 비율로  $\beta$ -1,4결합에 의하여 直鎖를 이루고 있고 부분적으로 分枝상태의 구조를 가진 것으로 되어 있다.

$\beta$  결합을 한 mannan 系 다당류에 작용하는 가수분해 酵素에 대해서는 일찌기 1899년 Bourquelot 및 Herissey<sup>(3)</sup>에 의하여 발견된 이래 생물계에 널리 존재하는 것으로 알려졌다.<sup>(4-6)</sup> 특히 konjak mannan 을 포함한 glucomannan 의 효소적 가수분해에 대해서는 Innami 등<sup>(7,8)</sup> Perila 및 Bishop<sup>(9)</sup>, Bouveng 등<sup>(10)</sup>, Reese 및 Shibata<sup>(5)</sup>, Kato 등<sup>(11)</sup>, Tsujisaka 등<sup>(12)</sup>에 의한 많은 보고가 있다. 그럼에도 불구하고 konjak mannan 분해효소의 作用機作이나 基質特異性에 대해서는 다른 다당류에 작용하는 가수분해효소에 비하여 충분히 연구되지 못한 실정에 있다.

따라서 本 研究은 konjak mannan 을 가수분해하는 酵素群을 분리 경제하고 그들의 特異성을 규명하는 동시에 이를 이용하여 konjak mannan 의 화학구조를 追試하려는 의도하에 着手되었다. 그리하여 우선 konjak mannan 에 잘 작용하는 미생물을 선정하고 酵素생산조건, 부분적으로 경제한 酵素劑의 특성을 조사하였으며 한편 放射線照射에 의한 食品成分의 변화를 적극적으로 이용하려는 試圖의 일환으로 감마선照射가 konjak mannan 의 효소분해에 미치는 영향을 실험하였으므로 이에 그 결과를 보고한다.

## 재료 및 방법

### (1) konjak mannan 의 정제

Smith 및 Srivastava 의 방법<sup>(2)</sup>에 준하였다. 즉 konjak flour 일정량을 10% NaOH 에 용해하고 Fehling 용액으로 얻은 copper complex 를 2N HCl

로 분해, 95% ethanol 로 copper ion 을 제거한 후 무수 ethanol, ether, 석유 ether 로 脫水, 건조시켜 백색 분말을 얻었다. 경제품은 가수분해 후 paper chromatography 로 조사한 결과 glucose 와 mannose 만이 검출되었다.

### (2) 분석방법

還元糖의 정량은 시료의 糖농도에 따라 Fehling-Lehman-Schoorl 법<sup>(13)</sup> (정량범위 0.3~10 mg), Somogyi 적정법<sup>(14)</sup> (정량범위 0.1~2 mg) 또는 Somogyi-Nelson 법<sup>(14,15)</sup> (정량범위 10~600  $\mu$ g)에 의하여 하였다.

蛋白質의 정량은 Folin-Lowry-Miller 법<sup>(16,17)</sup>에 의하여 Beckman DU-2 spectrophotometer 로 500  $\mu$ m 또는 700  $\mu$ m 에서의 흡광도를 측정하고 egg albumin 을 표준물질로 사용하였다.

konjak mannan 의 粘度측정은 1 N NaOH 용액에 0.5% 농도가 되도록 녹인 용액 10 ml 를 Ostwald 粘度計에 의하여 40°C 에서의 落下시간을 측정하고 다음과 같이 還元粘度로 표시하였다.

$$\text{還元粘度} \left( \frac{Y_{rel}}{C} \right) = \frac{(\text{시료의 낙하초수})}{(1N NaOH의 낙하초수)} - \frac{(1N NaOH의 낙하초수)}{\times (\text{시료농도 } g/100ml)}$$

### (3) 酵素活性的 측정법

0.05 M 초산완충액 (pH 4.5)에 녹인 0.625% konjak mannan 용액 4 ml 에 효소액 1 ml 를 가하여 40°C 에서 30분간 반응시킨 후 환원당의 증가량을 정량하였다. 이러한 조건하에서 1분간에 1 micromole 의 mannose 當量을 생성하는 효소의 力價를 mannanase 1 unit 로 정의하였다.

### (4) konjak mannan 분해효소 生産菌株의 선발

서울대학교 농과대학에 보존중인 곰팡이중 80여 菌株를 대상으로 1차선발을 실시하였다. 즉 100 ml 용 삼각후라스크에 밀기울 5g, 수도수 5 ml 를 넣고 가압살균한 후 接種, 28°C 에서 3일간 배양하였다. 이 배양물에 증류수 50 ml 를 넣고 Waring blender 로 마쇄한 후 실온에 1시간 방치추출한 여액에 대하여 효소활성을 측정하였다.

1차적으로 선발된 4菌株를 다시 위와 같은 방법으로 6일까지 배양하여 효소활성이 가장 강한 균주를 선택하였다.

### (5) 選拔菌株의 액체배양법

基本培地 50 ml 를 300 ml 용 삼각후라스크에 넣고 往復振盪恒溫器에서 90 rpm, 30°C 에서 일정기간 배양한 후 Waring blender 로 2분간 마쇄, 추출한 여액을 효소액으로 사용하였다. 기본배지의 組

成은  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.4 g, urea 0.3 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.3 g,  $\text{CaCl}_2$  0.3 g, konjak mannan 5 g, 水道水 1 l 이었다.

(6) 放射線 照射

시료를 소형 시험관에 넣고 放射線農學研究所에 설치된 20,000큐리 Co-60 BNL's shipboard irradiator에 의하여 250 rad/sec의 線量率로서 照射시간을 조절하여 0.05 Mrad에서 5 Mrad까지 照射하였다.

결과 및 고찰

(1) konjak mannan 분해효소 생산菌株의 檢索

konjak mannan 분해효소는 Table 1에서와 같이 여러가지 곰팡이에 의하여 생산되는 것을 볼 수 있었고 菌種에 따라 발육속도와 아울러 효소생산속도가 다를 수 있었다. 따라서 保存菌株 80여개중 같은 배양조건하에서 효소 生産能이 비교적 높은 4군주를 1차적으로 선택하였고 이들을 다시 배양일수 별로 효소生産能을 시험한 결과는 Figure 1과 같다. 이들중 *Aspergillus awamori*가 3일째, *Aspergillus sp.*가 4일째 최고力價를 보였으나 본 연구에서는 배양일수가 빠른 *A. awamori*를 선택하였다.

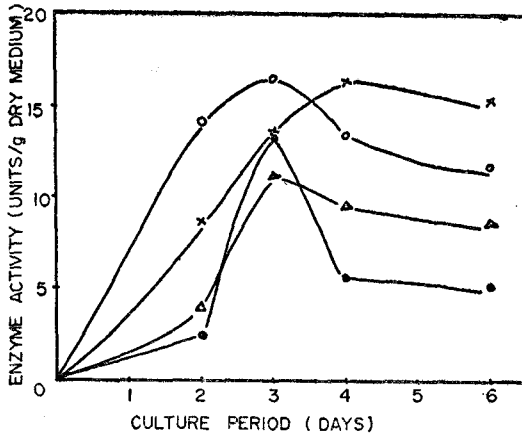


Figure 1. Time course formation of mannanase by several molds

○—○ *A. awamori*; ●—● *A. niger*;  
△—△ *A. fonsecaeus*; ×—× *A. sp.*

(2) 고체배양 最適條件

가) 撒水量

밀기울 5g에 대하여 수도수를 여러가지 비율로 첨가하여 배양한 경우의 酵素活性은 Figure 2와

Table 1. Mannanase activity of some molds in wheat bran culture

Microorganism	Units/g dry medium
<i>Aspergillus awamori</i>	16.4
<i>Aspergillus clavatus</i>	6.8
<i>Aspergillus fonsecaeus</i>	11.2
<i>Aspergillus niger</i>	13.4
<i>Coniothyrium sp.</i>	14.8
<i>Mucor racemosus</i>	6.0
<i>Neurospora sitophila</i>	5.6
<i>Penicillium camemberti</i>	2.4
<i>Penicillium frequentans</i>	4.8
<i>Rhizopus delemar</i>	5.2

같다. 밀기울에 대하여 撒水量 100%의 경우 효소 생산은 최고이었다.

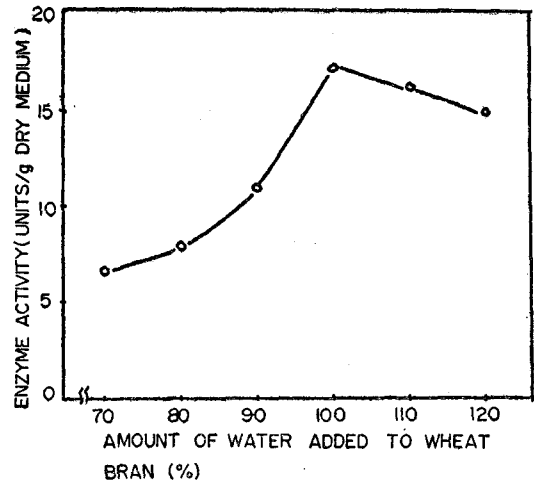


Figure 2. Effect of the amount of water added to wheat bran on the production of mannanase by *A. awamori*

나) 撒水の pH

밀기울에 첨가할 수도수를 HCl과 NaOH로 각각 pH를 조절한 후 배양한 경우의 효소활성은 Figure 3과 같다. 밀기울에 대하여 撒水 pH 4.0의 경우 효소생산은 최고이었다.

(3) 액체배양 最適條件

가) 배양日數

선발된 균주 *A. awamori*를 액체배양용 基本培地에서 振盪배양한 결과는 Table 2와 같이 6일이 효소생산력이 가장 높았다.

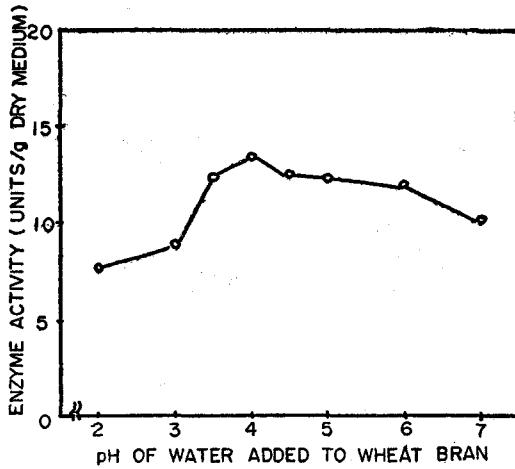


Figure 3. Effect of pH of water added to wheat bran on the production of mannanase by *A. awamori*

Table 2. Production of mannanase by *A. awamori* in shaking culture

Culture period (days)	Enzyme activity (munits/ml culture filtrate)
3	82
4	94
6	176
7	157
10	144

나) 炭素源의 영향

액체배양용 기본배지에 탄소원으로 Table 3 과 같은 물질을 첨가하고 6일간 배양한 결과 xylose 가 가장 좋았고 특히 0.1% 농도에서 가장 우수하였다.

Table 3. Effect of additional carbon source on the formation of mannanase by *A. awamori* in konjak mannan-containing media

Carbon source	Concentration (%)	Enzyme activity (munits/ml culture filtrate)
Konjak mannan only	0.5	176
Sucrose	0.5	233

Galactose	0.5	274
Glucose	0.5	285
Guar gum	0.1	293
Guar gum	0.5	358
Guar gum	1.0	456
Xylose	0.01	81
Xylose	0.05	163
Xylose	0.1	472
Xylose	0.5	358
Xylose	1.0	293

다) 窒素源의 영향

액체배양용 기본배지에 탄소원으로 선정된 0.1% xylose 를 더 넣고 질소원으로 Table 4 와 같은 물질을 첨가하여 6일간 배양한 결과 peptone 이 가장 좋았고 특히 0.04%가 적당하였다.

이상과 같이 배양일수 6일, xylose 0.1%, peptone 0.04%첨가시 기본배지 보다 약 3.8배의 높은 효소활성을 나타내었다.

Table 4. Effect of nitrogen source on the formation of mannanase by *A. awamori*

Nitrogen source	Concentration as N (%)	Enzyme activity (munits/ml culture filtrate)
NH <sub>4</sub> Cl	0.04	163
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.04	98
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.04	65
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.04	65
NaNO <sub>2</sub>	0.04	98
NaNO <sub>3</sub>	0.04	456
Urea	0.04	98
Yeast extract	0.04	65
Peptone	0.02	163
Peptone	0.04	684
Peptone	0.10	358

(4) 효소의 精製

가) 효소原液의 제조

水洗밀기울에 *A. awamori* 를 접종하여 3일간 배양한 후 5배의 수도수를 가하여 가볍게 마쇄하고 한시간 추출한 후 얻은 여액을 효소原液으로 사용하였다.

나) 황산암모늄에 의한 鹽析

효소原液 50 ml 에 황산암모늄을 80%飽和度까지

10%간격으로 용해할 때 생기는 침전을 원심분리 후 다시 물로 50 ml로 용해하여 酵素活性과 단백

질농도를 측정한 결과는 Table 5와 같다. 이에 의하면 0.4~0.8飽和度에서 77%의 효소를 회수할수

Table 5. Fractionation of mannanase activity by ammonium sulfate (Total volume: 50 ml)

% saturation with ammonium sulfate	Activity (units/ml)	Total units	Protein (mg/ml)	Specific activity (units/mg protein)	Yield (%)
Original	1.22	61.0	7.02	0.17	100
0-30	0.09	4.5	0.75	0.12	7
30-40	0.09	4.5	0.27	0.33	7
40-50	0.30	15.0	0.75	0.40	25
50-60	0.21	10.5	1.02	0.21	17
60-70	0.24	12.0	0.18	1.33	20
70-80	0.19	9.5	0.87	0.22	16
0-40	0.18	9.0	1.02	0.18	15
40-80	0.94	47.0	2.82	0.33	77

있었고 약 2배의 精製를 할 수 있었다.

다) DEAE-Sephadex column chromatography 에 의한 分別

常法에 의하여 준비한 DEAE-Sephadex DE 50 column 에 硫酸鹽析후 透析한 효소액을 가하고 stepwise 하게 溶出하였다. 溶出액의 농도는 초산 완충액 (pH 4.5) 0.01 M에서 0.05 M, 0.1 M, 0.1 M+0.4 M NaCl 까지 높였으며 UV absorptiometer 가 附置된 LKB model의 automatic fraction collector 에 의하여 5 ml씩 分取하고 효소활성을 측정하였다. 그 결과 Figure 4에서와 같이 효소활성이 두 peak 로 나타났으며 溶出순서에 따라 fraction I, fraction II로 명명하였다. 두 fraction 은 황산암모늄 0.8 포화도에서 침전시키고 透析한 후 효소액

으로 사용하였다. 위의 정제결과 fraction I은 20%收率로 약 2배 정제되었고 fraction II는 75%收率로 약 5배 정제되었다.

(5) 효소의 特性

가) 作用最適 pH

각종 pH의 0.05 M 완충액에 녹인 0.6% konjak mannan 용액 0.5 ml 에 효소액 0.5 ml 를 가하고 40 °C에서 10분간 반응시킨 후 Somogyi-Nelson 법으로 환원력증가를 측정하여 효소활성을 비교한 결과는 Figure 5와 같다. 이때 pH 2.5~3.5는 glycine-HCl buffer, pH 4~6은 acetate buffer, pH 7~8은 phosphate buffer 를 사용하였다. Figure 5에서와 같이 作用최적 pH는 fraction I, II 모두 4이었다.

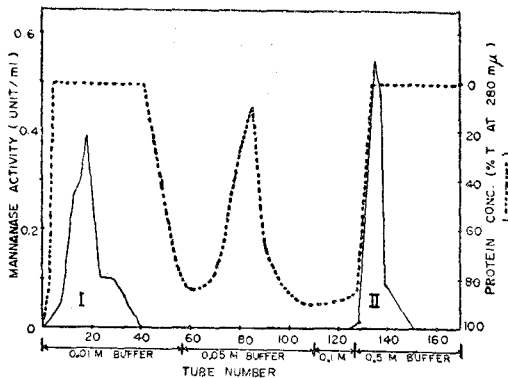


Figure 4. Elution pattern of mannanase from DEAE-Sephadex DE 50 column

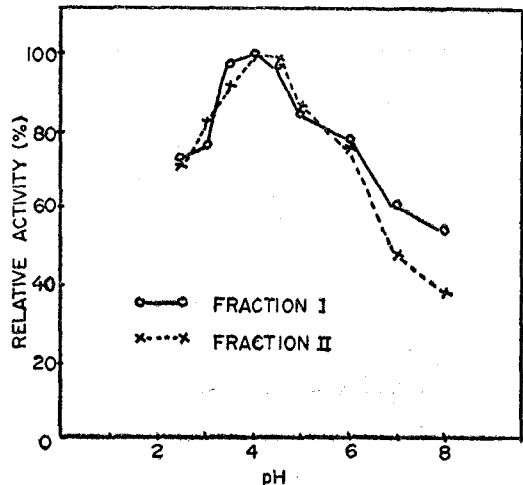


Figure 5. Effect of pH on mannanase activity

나) pH 안정성

상술한 바와 같은 각종 pH의 0.05 M 완충액 0.5 ml에 효소액 0.5 ml를 가하여 30°C에 15시간 放置 후 0.2 M 초산완충액(pH 4.5) 5 ml를 가하여 희석시킨 후 잔존하는 효소활성을 측정 한 결과는 Figure 6과 같다. 이에서 보는 바와 같이 fraction I은 pH 3.5~5에서, fraction II는 pH 3~6에서 비교적 안정하였다.

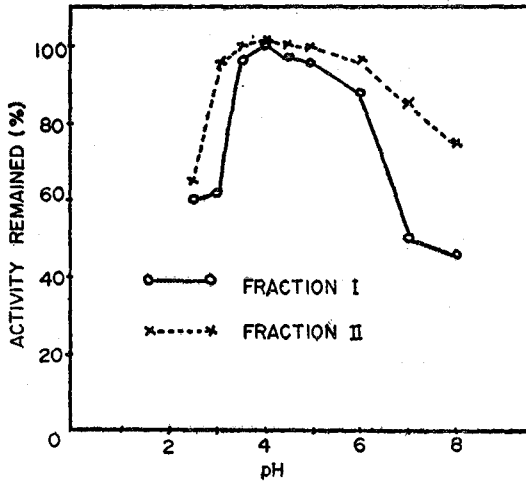


Figure 6. Effect of pH on the stability of mannannase

다) Mannan의 가수분해를

0.05 M 초산완충액(pH 4.5)에 녹인 0.2% 基質 용액 16 ml에 효소액 4 ml를 가한 후 40°C에서 작용시켜 經時的으로 생성된 환원당량을 Somogyi적 정법으로 측정하고 加水分解率을 계산한 결과는 Figure 7과 같다.

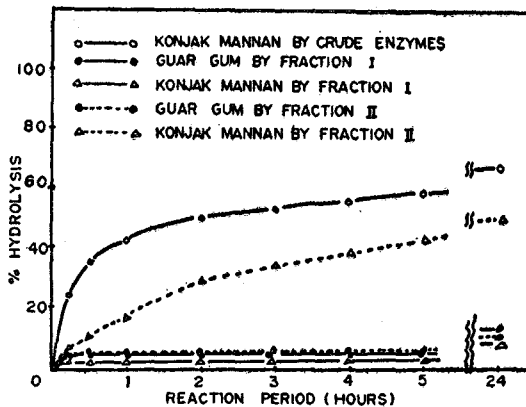


Figure 7. Hydrolyses of konjak mannan and guar gum by mannannase fractions

硫酸鹽析만에 의한 효소액은 konjak mannan을 78%까지 가수분해시킬 수 있었다. 그러나 이를 DEAE-Sephadex column에 의하여 分別시킨 fraction I, II는 각각 9%와 50%까지 분해시킬 수 있었다. 따라서 fraction I, II는 각각 다른 성질을 가진 효소로서 前者는 endo-type이고 後者は exo-type이 아닌가 推理된다. 이들 효소에 의한 가수분해 산물을 확인하므로써 追試되어야 할 것으로 생각된다. 한편 galactomannan인 guar gum은 fraction I, II에 의하여 거의 비슷하게 14%와 11%식 가수분해되었는데 이는 galactose에 의한 分枝에 의하여 효소작용이 억제되고 있는 것이 아닌가 생각된다.

(6) konjak mannan의 분해에 미치는 放射線의 영향

가) 伽瑪線照射한 konjak mannan의 효소적 가수분해

konjak mannan을 건조상태(수분 11.4%)에서 0.5, 1, 2, 5 Mrad의 伽瑪선으로 照射하고 0.5% 基質농도에서 mannannase 粗酵素液에 의하여 가수분해도를 측정 한 결과는 Figure 8과 같다. 이에 의하면 konjak mannan의 효소적 가수분해는 伽瑪선의 조사에 의하여 약간 촉진되는 것을 볼 수 있었다. 그러나 0.5 Mrad 이상에서 照射線量의 차이에 따른 변화는 거의 없었다.

또 konjak mannan을 건조상태, 4배의 물로 水和시킨 상태, 水和시킨 후 boiling water bath에서 10분간 끓인 상태에서 2 Mrad의 伽瑪선으로 照

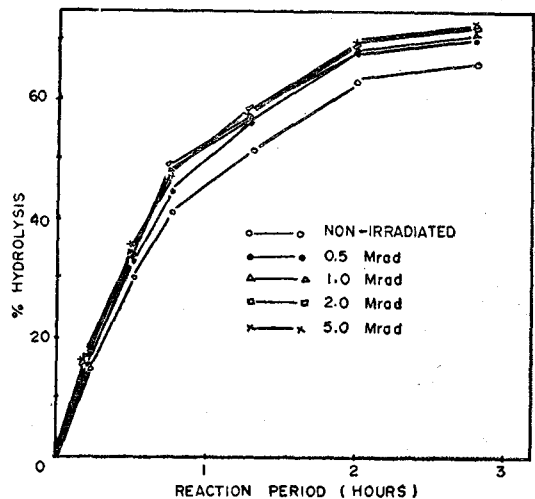


Figure 8. Hydrolysis of gamma-irradiated konjak mannan by a crude mannannase preparation

射시킨 후 효소제에 의하여 가수분해도를 측정 한 결과는 Figure 9와 같다. 이에 의하면 水和 및 糊化시킨 konjak mannan은 건조상태의 것보다 약간 높은 가수분해율을 보였다. 이는 어느정도의 수분으로 인하여 放射線照射시 free radical이 생성되어 효소작용을 받기 쉬운 構造상의 어떤 변화가 일어났기 때문이 아닌가 추측된다.

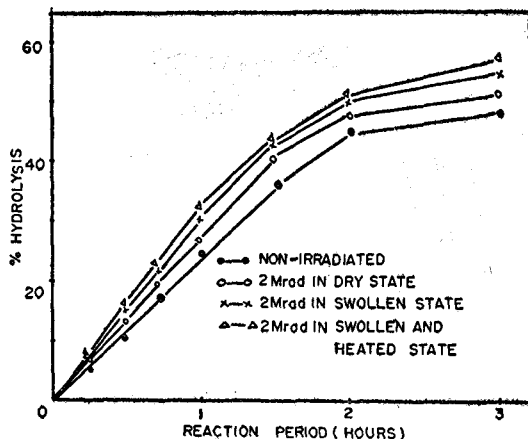


Figure 9. Enzymatic hydrolysis of konjak mannan irradiated in different states

나) 감마線照射한 konjak mannan의還元力 및 粘度 변화

konjak mannan을 건조상태 및 水和상태에서 감마線으로 照射하고 0.5% 1N NaOH 용액으로 만든 후 Somogyi 적정법으로 환원력을 정량한 결과와 0.2% 1N NaOH 용액으로 희석하여 粘度를 측정 한 결과는 Figure 10과 같다.

이에 의하면 감마선 照射에 의하여還元力の 증가가 있었는데 건조상태의 시료보다 水和된 시료에서 그 효과가 더 큰 것을 볼 수 있었다. 또한

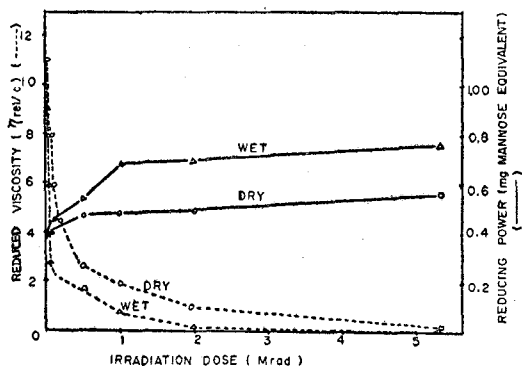


Figure 10. Changes in reducing power and viscosity of konjak mannan by gamma-irradiation

konjak mannan은 감마선照射에 의하여 매우 큰 粘度의 降下를 초래하였고 특히 水和상태에서의 照射에 의하여 그 변화가 현저하였다.

이상의 결과로 보아 konjak mannan은 감마선照射에 의하여 重合도가 감소되는 것으로 생각되며 감마선을 照射한 konjak mannan의 효소분해가 더 촉진됨은 基質의 重合도가 감소하므로써 효소에 의한 작용이 더 용이하게 되는 것으로 생각된다.

## 요 약

*Aspergillus awamori*가 생산하는 konjak mannan 분해 효소群에 관한 연구로서 효소생산조건, 효소의 정제 및 성질, 효소분해에 미치는 감마선 照射의 영향을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 保存菌株 80여개중 konjak mannan 분해효소를 다량 생산하는 것으로 *A. awamori*를 선정하였다.

2) *A. awamori*를 밀기를 고체배양하는 경우 최적 배양일수는 3일, 撒水の pH는 4, 撒水量은 100%가 가장 좋았다.

3) *A. awamori*를 액체 振盪배양하는 경우 최적 배양일수는 6일, 基本培地에 대한 追加炭素源으로는 xylose 0.1%, 窒素源으로는 peptone 0.04%가 가장 좋았다.

4) *A. awamori*의 고체배양물에서 konjak mannan 분해효소를 硫酸鹽析 및 DEAE-Sephadex column chromatography에 의하여 精製하고 fraction I과 fraction II를 분리하였다.

5) fraction I과 fraction II의 작용최적 pH는 모두 4이었고 pH安定범위는 각각 3.5~5 및 3~6이었으며 konjak mannan에 대한 가수분해도는 각각 9%, 50%, guar gum에 대한 것은 각각 14%, 11%이었다.

6) 粗酵素液에 의한 konjak mannan의 가수분해도는 0.5 Mrad 이상의 감마선 照射에 의하여 약간 촉진되었으며 특히 水和상태에서의 照射에 의하여 그 효과가 현저하였다.

7) konjak mannan의 감마선 照射은 粘度강하와還元力증가를 초래하였으며 건조상태보다는 水和 상태에서 그 효과가 현저하였다.

## 참 고 문 헌

- 1) Nishida, K. and Hashima, H.: J. Dept. Agr. Kyushu Imp. Univ., 2, 227 (1930) [Chem. Abstr., 25, 498 (1931)].

- 2) Smith, F. and Srivastava, H. C.: J. Am. Chem. Soc., **81**, 1715 (1959).
- 3) Bourquelot, E. and Herissey, H.: Compt. Rend., **129**, 614 (1899).
- 4) Lee, S. R.: Ph. D. Thesis, University of Minnesota, Minneapolis (1965).
- 5) Reese, E. T. and Shibata, Y.: Can. J. Microbiol., **11**, 168 (1965).
- 6) 李瑞來: 農化學會誌, **7**, 1 (1966).
- 7) Innami, S.: Agr. Biol. Chem. (Tokyo), **25**, 155 (1961).
- 8) Innami, S., Suzuki, T. and Sahashi, Y.: Agr. Biol. Chem. (Tokyo), **25**, 164 (1961).
- 9) Perila, O. and Bishop, C. T.: Can. J. Chem., **39**, 815 (1961).
- 10) Bouveng, H. O., Iwasaki, T., Lindberg, B. and Meier, H.: Acta Chem. Scand., **17**, 1796 (1963).
- 11) Kato, K., Watanabe, T. and Matsuda, K.: Agr. Biol. Chem. (Tokyo), **34**, 532 (1970).
- 12) Tsujisaka, Y., Hiyama, K. and Takenishi, S.: Agr. Biol. Chem. (Tokyo), **46**, 155 (1972).
- 13) 東京大學農學部 農藝化學教室: 實驗農藝化學 (朝倉書店, 東京) p. 587 (1952).
- 14) Somogyi, M.: J. Biol. Chem., **198**, 19(1952).
- 15) Nelson, N.: J. Biol. Chem., **153**, 375 (1944).
- 16) Lowry, O. H., Rosebrough, N.J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: J. Biol. Chem., **193**, 265 (1951).
- 17) Miller, G. L.: Anal. Chem., **31**, 964 (1959).