

眞菌類의 Glucoamylase 活性的 檢索法에 대한 연구

문인경 · 이형환 · 김종협*

전국대학교 대학원 생물학과 · 동덕여자대학*

Application of Glucose Oxidase for the Rapid Screening of Glucoamylase-producing Fungus

In Kyung Moon, Hyung-Hoan Lee and Jong-Hyup Kim*

Department of Biology, Graduate School, Kon Kuk University, Seoul 133 and

*Dong-Duck Women's University, Seoul 132, Korea

Abstract: *Aspergillus awamori* which produces glucoamylase was cultivated in the starch-Czapek-Dox's medium in which sucrose was depleted. A rapid method for identification and assay of glucoamylase produced by the *A. awamori* in the culture was established by the use of the glucose oxidase. The levels of glucose derived from the breakdown of the starch medium were assayed by using glucose oxidase, which was proved to be effective in the screening of glucoamylase-producing fungi in terms of rapid and simple determination. After the cellulose acetate electrophoresis of the precipitated culture broth, the glucoamylase band in the gel was contacted with 2% starch solution with glucose oxidase, and then color reaction was occurred. Also this method could be effective to identify rapidly the fungal glucoamylase.

Keywords: *Aspergillus awamori*, Glucoamylase, Glucose oxidase.

사상균은 전분의 비환원성 말단부터 포도당을 분리하는 glucoamylase((glucoamylase. E. C. 3. 1. 3, amylo-glucosidase)을 생산하는데, 이것은 β -amylase가 끊을 수 없는 α -1, β -glucoside 결합을 가수 분해할 수 있으며(Rose, 1980), glucoamylase는 분자량이 95,000 정도이며(Reed, 1966), 전분을 포도당 단위까지 분해할 수 있으므로 발효공업에 있어서, 전분질 원료의 당화 및 포도당 제조등에 널리 사용되고 있다(하덕모 등 1977).

그러나 glucoamylase에 대한 신속하고도 간편한 분석법은 아직도 없으며, 대부분 환원당 정량 분석법으로 대응하고 있는데, 특히 배양균을 즉시 검사하고 이 균주를 직접적으로 선별하는 방법이 개발되어야 한다는 것이 균주개량과정에서 간절히 요구되고 있다. 따라서 본 연구에서는 곰팡이의 배양균주를 배양중에 간편, 신속하게 그 당화력을 검사하기 위하여 glucose oxidase 효소를 사용하여 그 가능성을 추구하고 있다.

재 료 및 방 법

실험재료

1) 사용 균주

Aspergillus awamori K-510를 사용하였다.

2) 배지

Czapek-Dox 배지를 사용하였다(Jakoby, 1971).

3) 시약

포도당을 정량하기 위하여 glucose oxidase(Wako Pure Chemical사)를 사용하였으며, pH 7.4의 0.2M phosphate buffer와 0.05% phenol을 사용하였고, color reagent로 mutarotase 5 units/ml, glucose oxidase 2,000 units/ml, peroxidase 60 units/ml, 와 A-Aminoantipyrine을 사용하였다. Dextrose는 0.2g을 증류수 100ml에 녹여 사용하였다.

4) Biuret 시약

곰팡이의 배양액을 냉알코올로서 처리하여 얻은 효

소단백을 정량하기 위하여 Biuret 시약을 사용하였으며 시약 구성은 다음과 같다.

Sodium hydroxide	600mM/L,
Copper sulfate	12mM/L,
Sodium potassium tartrate	29mM/L와
Potassium iodide	30mM/L,

표준 단백질로는 bovine albumin을 8g/100ml로 하여 사용하였다.

실험방법

1) 배양 *Aspergillus awamori* K-510를 1차적으로 Czapek-Dox 배지에서 7일간 22°C에서 증식 배양을 한 후에, 증식 배양된 균을 서당 대신으로 전분을 2%로 넣은 Czapek-Dox 한천 평판배지에 접종하여 7일간 22°C에서 배양해 7일간 배양된 균의 conidiospore를 분리하여 혈구 계산기로서 계산하면서 멸균증류수를 희석하여 3.5×10^6 개로 포자의 수를 보정하였다(Compell, 1980). Conidiospore의 부유액 1ml를 전분이 포함된 200ml의 Czapek-Dox 액체배지에 접종하였다. 한 개는 정치 배양하고, 다른 한 개는 진탕배양(180rpm/min)을 22°C에서 배양하였다.

2) 곰팡이 효소액의 조제

전분이 들은 Czapek-Dox 액체배지에서 2주간 배양한 배양액에서 균체를 여과 제거하고 여기에 95% 냉알코올 400ml를 배양액에 부어 혼합한 다음 4°C 냉장고에 24시간 정치하여 침전된 효소를 모아서 보관하였다.

3) Glucose Oxidase의 측정법

Glucose의 표준액(100, 200, 300, 400, 600, 700mg/100ml)를 준비하여 이 각각의 표준액을 glucose oxidase의 시약으로 발색시켜 그 발색도를 비교하였고, glucose oxidase 실험방법은 ① test ② standard ③ blank로 나누어 test에는 배양액 0.02ml, standard에는 포도당 표준액 0.02ml, blank에는 아무것도 넣지 않았다. 그리고 위의 3개의 튜브에 glucose oxidase 시약을 각각 3ml씩 넣고, 37°C에서 5분간 발색시켜 Spectrophotometer 505nm에서 측정했다. Czapek-Dox 전분한천배지에서 7일간 배양한 한천평판위에 glucose oxidase의 시약 1ml를 가하여 포도당 생성 유무를 판별하였다. 전분 한천평판 배지를 대조구로 하여 비교하였다.

4) 단백질 양의 측정

배양액에 냉알코올을 가하여 효소단백을 침전한 부분의 단백질 함량을 Biuret 방법을 이용하였으며, 이 방법은 ① test ② standard ③ blank을 나누어, test에는 추출시킨 효소 0.1ml, standard에는 bovine albumin 0.1ml, blank에는 증류수 0.1ml씩 넣고, Biuret 시약

을 각각 5.0ml씩 넣어 실온에서 30분간 방치하여 Spectrophotometer 540nm에서 측정하였다(서덕규 등, 1974; Bauer, 1982).

5) 전기영동

배양여과액을 냉알코올로서 침전시킨 부분을 전기영동하여 glucose oxidase로 glucoamylase를 동정하였다. 지지체로서 Titan-III cellulose acetate를 준비하여 완충액에 미리 20분간 담가두고 전기 영동조 양편수조에 tris-barbital, sodium-barbital buffer, (pH 8.8)을 50ml씩 붓고, 1회용 paper wick를 양쪽 수조에 장치하고, 완충액에 담가 두었던 cellulose acetate plate을 추출한 효소를 옮겨놓고, 이 cellulose acetate를 전기영동 수조의 음극쪽에 samples이 오게 장치하여 180volts, 15mA에서 15분간 영동시키고, 그 후에 ponceau-S로 7분간 염색했다. 그 다음에 5% acetic acid로서 5분간씩 3회 탈색한 후 무수메타놀에서 3회 plate를 옮겨 탈수시켰다. 세척액에 2분간 담군다음 plate를 꺼내어 약 1분간 공기중에서 말린 다음 50°C~60°C의 hot plate로 건조하여 투명하게 만들고 plate 표면에 유동 paraffin을 발라서 파장 525nm에서 densitometry하였다(서덕규, 1982; Gordon, 1975).

6) Glucoamylase의 전기영동 분획상의 증명

Cellulose acetate에서 전기영동 한 곳에 2% 전분 용액을 전기영동 되어진 plate 표면에 묻혀 glucoamylase 작용을 시키기 위하여 37°C의 습윤 상자에서 5분간 방치한 다음 glucose oxidase 시약으로 1분간 반응시켰다.

결 과

Glucoamylase생성 추적실험의 결과

*Aspergillus awamori*를 Czapek-Dox배지에서 배양하여 전분을 포도당으로 분해하는 glucoamylase에 추적 실험을 전분한천배지에서 7일간 전분 액체배지에서 14일간 실시한 후, glucose oxidase로서 포도당의 생성 여부를 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. 전분을 함유한 Czapek-Dox 한천 배지에 glucose oxidase 시약 1ml를 첨가하여 1분후 나타난 발색 현상을 Fig. 1 및 Fig. 2에서 추적해 보면 약 600mg의 포도당이 생성되었음을 알았다.

Glucoamylase 생성에 대한 액체 정지배양 및 진탕 배양의 효과 비교

전분이 함유된 Czapek-Dox 액체배양에서 14일간 배양하여 그 배양액을 매일 일정한 시간에 측정하여 액체

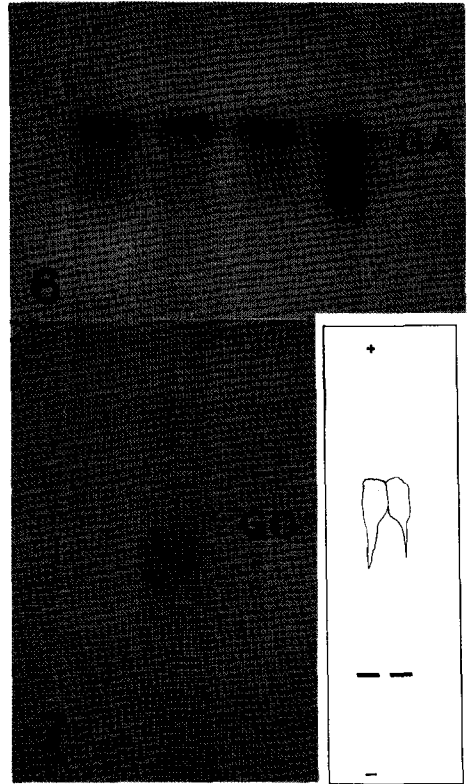
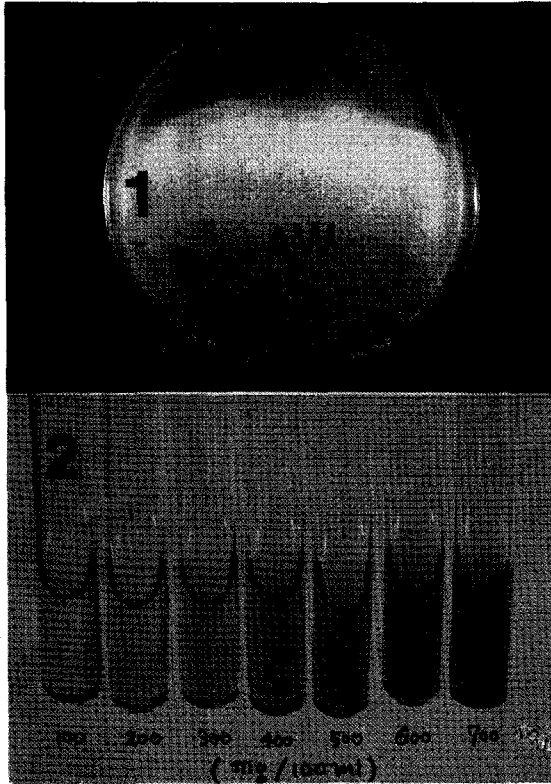


Fig. 1. Reaction of glucose oxidase with glucose which was derived from the starch added to Czapek-Dox medium. Glucoamylase was produced in *Aspergillus awamori*. GO: Glucose oxidase, AW=*A. awamori*

Fig. 2. Color reactions of glucose oxidase series with standard glucose solution (mg/100ml).

Fig. 6. Electrophoresis of precipitated fraction of culture broth with cold ethanol treatment in *Aspergillus awamori*. GA: glucoamylase

Fig. 7. Electrophoresis of precipitated fraction of culture broth which was treated by ethanol. The faint band was contacted with 2% starch solution before glucose oxidase for glucose test. GO: glucose oxidase positive reaction.

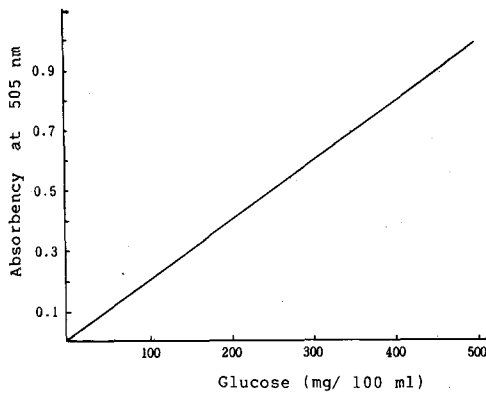


Fig. 3. Calibration curve for glucose assay with use of glucose oxidase.

Table I. Glucose levels during static liquid culture and shaking culture of *Aspergillus awamori* in starch medium. (mg/100ml)

Days	Cultures	Static cultures (mg)	Shaking cultures (mg)
1		42.5	30.9
2		238.9	289.0
3		675.0	753.1
4		986.0	903.3
5		1201.4	821.4
6		1421.5	606.9
7		1518.0	418.5
8		1219.1	249.0
9		920.3	141.2
10		703.7	89.4

정치배양과 진탕배양에서 효과는 Table 1, Fig. 4 및 Fig. 5와 같다. 정치배양 한 것은 7일만에 1,518mg의 glucose 농도를 나타내고 진탕배양 한 것은 4일만에 903mg의 glucose 농도를 나타내고 있다. 이와같이 정

치배양과 진탕배양에서 당농도 생성은 정치배양 구에서 높게 나타내고 있다.

전기영동을 이용한 Glucoamylase의 증명

냉알코올에서 침전한 효소를 전기영동한 결과 cellulose acetate plate에서 2개의 band가 나타났으며(Fig. 6), 이것중에 glucoamylase band는 전기영동하여 염색하기 전에 2% 전분용액을 작용시키고 그 후 glucose oxidase 시약으로 반응시킨 결과 Fig. 7과 같이 나타나고 있다. Fig. 6과 Fig. 7에서 나타난 것처럼 glucoamylase 작용에 의하여 전분이 포도당으로 전환된 것이 glucose oxidase에 의해서 적색을 나타내고 있는 바,

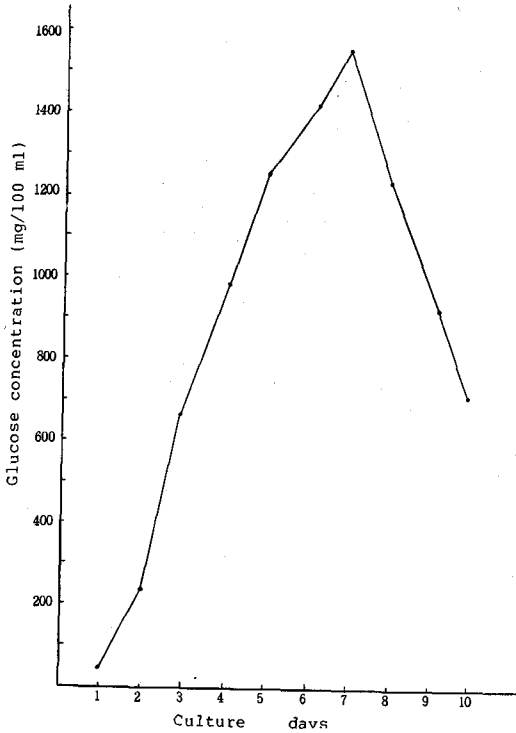


Fig. 4. Glucose levels during static liquid culture of *Aspergillus awamori* in starch medium.

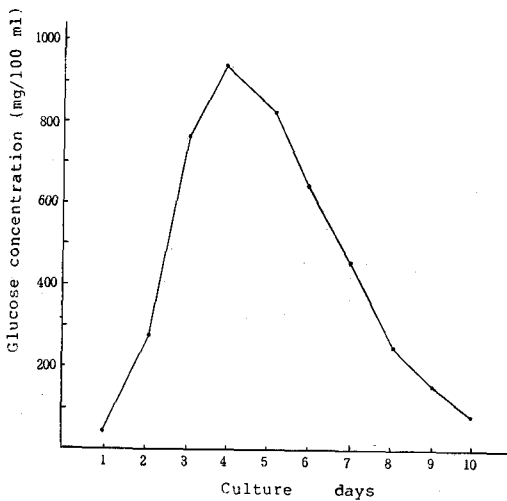


Fig. 5. Glucose levels during shaking culture of *Aspergillus awamori* in starch medium.

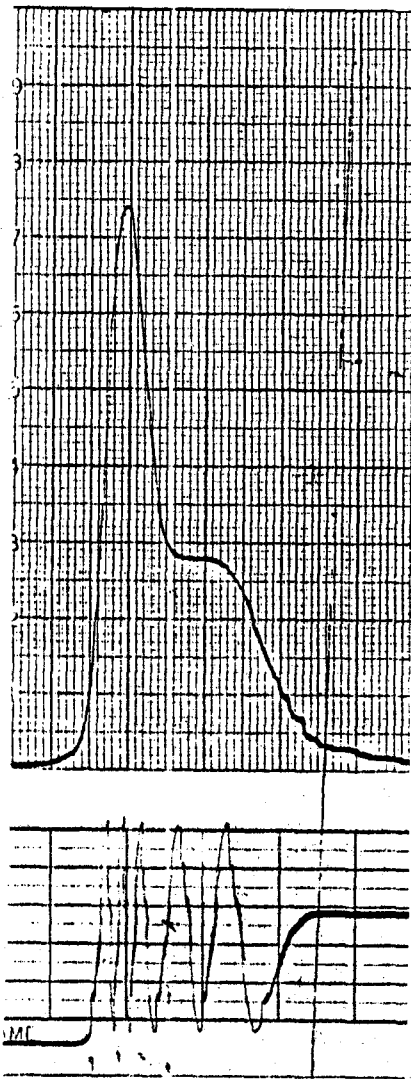
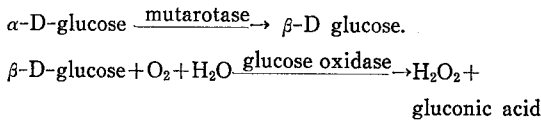


Fig. 8. Densitogram of glucoamylase band that is front band (+, part) in the plate

glucoamylase의 위치는 anode 위치에 있는 쪽이 좁고 염색성이 강한 band 임이 증명되었다. 이와같이 glucoamylase 위치를 Fig. 7에서 증명되었기 때문에 Fig. 6에서 나타난 band를 densitometry해서 나타난 그래프는 Fig. 8과 같이 나타나고 있다. 여기에서 glucoamylase는 쪽이 좁고 peak가 높게 올라간 부분이다. 이것을 계산한 결과 40.6%가 glucoamylase로 나타내고 있으며, 또한 효소의 총 단백질량은 Biuret법에 의해서 1.4mg이었으므로 glucoamylase의 양은 약 0.57mg 정도이다. 이것은 200ml의 2% 전분액배지에서 2주간 배양액에서 생성된 양이다.

고 찰

*Aspergillus awamori*를 전분이 함유된 Czapek-Dox 배지에서 배양하고 그 배양액을 냉알코올로 처리하여 glucoamylase의 활성과 전분한천배지상의 glucoamylase의 생성 사항을 glucose oxidase 시약으로 실험 하였다. 포도당은 glucose oxidase와 특이적으로 반응하는 원리를 이용하였으며 그 반응식은 다음과 같다(Malcom, 1979; Tietz, 1976).



A-aminoantipyrine + phenol $\xrightarrow{\text{peroxide}}$ red quinone dye
 이와같이 적색의 quinone dye를 형성 하는 것을 이용하여 추정한 실험 결과는 Table I, Fig. 4, Fig. 5에서 액체 정치배양은 5, 6, 7일 사이에서 glucoamylase의 활성이 높고, 액체 진탕배양에서는 3, 4, 5일에서 glucoamylase의 활성이 높으며 2일부터 효소 생성이 빠르게 나타나고 있다. 그러나 효소 활성도는 정치배양이 높게 나타났다. 생성된 포도당이 진탕배양 쪽에서는 성장과 대사에 많이 활용되기 때문이 아닌가 보아진다. glucose oxidase로서 포도당의 생성이 간편하게 직접적으로 신속하게 발견이 되며 적색의 농도로서 포도당의 생성량까지 상당히 정확하게 추측 할 수 있었고, glucoamylase의 정량이 효소 활성도를 포도당 생성량으로서 추적 할 수 있었다. 포도당 검량곡선을 이용하여 생성되는 포도당 양을 정량적으로 측정 할 수 있다.

Cellulose acetate판을 사용한 전기영동에서 band와 전분의 효소반응이 가능함을 알았고, 그 결과 glucoamylase의 효소 활성이 포도당 양으로 측정 될 수 있으며 glucose oxidase를 사용하여 가능하다는 것을 알수

있다.

적 요

*Aspergillus awamori*를 전분이 함유된 Czapek-Dox 배지에서 한천평판배지, 액체배지 방법으로 배양하고, glucoamylase의 생성을 glucose oxidase로서 추구하였다.

전분을 함유한 Czapek-Dox 한천배지상의 포도당의 존재와 그 함량은 glucose oxidase을 사용하여 정성, 정량 할 수 있었다. 따라서 많은 종류의 glucoamylase 생성균주를 신속하고 간편하게 검색하는 방법을 확립 하였다.

정치배양은 포도당량은 많았으나, 진탕배양은 반대로 포도당 양은 적었다. 그러나 진탕배양에서 포도당이 성장과 대사에 조속히 활용 되는것 같았다.

Cellulose acetate판을 이용한 전기영동법과 2% 전분 용액을 사용하여 glucoamylase를 동정할 수 있었으며, 이때 glucose oxidase를 사용함으로써 확인이 쉽게 되었다. 전분 당화균의 강력 균주의 검색선발에 있어서 위의 결과를 활용할 것을 제의한다.

문 헌

- 김종협, 이배합, 이지열(1982) : 미생물학 실험서. 대광문화사. 한국. p.66~68.
 서덕규(1982) : 혈청단백분획상. 대학서림. 한국. p.50~52.
 서덕규, 이주섭, 김약수, 윤기은(1974) : *Laboratory Methods in Clinical Chemistry*. 태흥인쇄사, 한국. p.68~69.
 하덕모, 박계인(1977) : 응용 미생물학. 개문사. 한국.
 Bauer, J.D. (1982) : *Clinical Laboratory Methods*. 9th ed. p.472~475. The C.V. Mosby, Co.
 Compbell, J.B. (1980) : *Laboratory Mathematics*. 2nd ed. p.142~151. The C.V. Mosby, Co.
 Dixon, M. and Webb, E.C. (1979) : *Enzymes* 3th ed. p.243~245. Academic Press.
 Gordon, A.H. (1975) : *Electrophoresis of Protein in Polyacrylamide and Starch Gel*. p.7~69. North-Holland.
 Jakoby, W.R. (1971) : *Methods in Enzymology* Vol. XXII. p.73. Academic Press.

Reed, G. (1966) : *Food Science and Technology*. 2nd ed. p. 65~68.

Rose, A.H. (1980) : *Economic Microbiology* 3th ed. p. 119~123. Academic Press.

Ishii, T. (1975) : 임상화학검사Ⅱ. 제 6권. p.156~

161. 의학서립.

Tietz, N.W. (1976) : *Fundamentals of Clinical Chemistry* 2nd ed. p. 245~248. Saunders Company.

<Received February 4, 1984>