

녹맥아에서 추출한 endo- β -1,3-glucanase의 효소학적 성질

손봉수 · 성낙계

경상대학교 식품공학과

초록 : 녹맥아로부터 endo- β -1,3-glucanase를 추출하여 각종 수지로써 정제하여 glucanase I과 glucanase II의 존재를 확인하였고, 정제한 두 효소의 특성에 대하여 실험한 결과, 두 정제 효소의 분자량은 각각 35,000과 28,000으로 추정되었으며 최적 pH는 5.5이었고 pH 안정 범위는 각각 달랐다. 두 정제효소의 최적 온도는 glucanase I, II 다 같이 40°C이었으며 glucanase I에 비해 glucanase II가 열에 다소 안정하였다. 그리고 AgNO₃와 HgCl₂와 같은 화합물은 효소활성을 저해하였다. Laminarin을 기질로 하여 측정한 Km값은 glucanase I, II 각각 1.03 mg/ml, 1.20 mg/ml이었다(1992년 3월 23일 접수, 1992년 5월 4일 수리).

보리 배유 세포벽의 주성분¹⁾은 β -glucan과 arabinoxy-lan으로 구성되어 있으며 β -glucan은 D-glucose units로서 30%는 β -1,3결합, 70%는 β -1,4결합으로 연결된 linear polymer이다.

일반적으로 β -glucan함량은 품종간에 차이가 있으며 Morgan²⁾은 3.43%, Bamforth³⁾는 5.3%라고 보고하였고 1981년 Martin과 Bamforth⁴⁾가 *Trichoderma reesei*에서 생성되는 crude cellulase를 이용하여 총 β -glucan의 함량을 측정된 결과 Zephyr품종이 건물로서 8.62%이었다고 보고한 바와 같이 함량이 높은 경우도 있다. 이러한 β -glucan을 함유하고 있는 세포벽은 Thompson과 Loberge⁵⁾에 의해 65°C의 물에 43%, 알카리에 50%가 용해되며 이 중 약 70%가 β -glucan이라는 것이 밝혀졌다.

이와 같은 가용성 β -glucan은 맥주 양조과정에서 맥아용해를 어렵게 하며, 맥즙용출과 맥주여과에 악영향을 주어 양조 수율을 낮추며 최종맥주에 혼탁과 젤 형성에 관여하여 제품의 shelf life를 단축시키는 등 여러문제를 야기시킨다. 그러나, 가용성 β -glucan은 내재되어 있는 효소에 의해서 분해되어지므로 발아기간중 내재되어있는 효소를 최대한으로 활성화시켜 이러한 문제를 줄일 수 있다.

본 연구는 사천 6호, 두산 12호 및 두산 22호 등의 현행 국산 맥주맥이 한국의 토양과 기후특성 때문에 외국산 품종에 비해 β -glucan의 함량이 높아 맥아 품질을 저하시키므로 발아기간중 효소를 최대한으로 활성화시켜 맥아의 품질을 향상시키기 위한 기초 자료로써 활용하기

위하여 국산 맥주맥을 발아시켜 cytolytic reaction에 작용하는 endo- β -1,3-glucanase를 녹맥아에서 추출, 정제하여 효소학적 성질 등을 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료

국내에서 가장 많이 재배하는 두줄보리인 사천 6호를 경남 고성군에서 수확하여 침맥도가 43%일때 실내습도 95% 이상이 유지되는 발아실에 옮겨 품온을 15°C로 유지하여 6일간 발아시킨 녹맥아를 시료로 하였다.

효소의 추출 및 정제

Ballance와 Meredith방법⁶⁾에 의하여 추출하였으며 DEAE-Sephadex A-50, CM-sephadex C-50, Sephadex G-75등의 수지를 이용하여 효소를 정제하였다.

효소의 활성화 측정

정제효소 희석액 0.1 ml와 0.1% laminarin용액을 이용하여 DNS법으로 500 nm에서 흡광도를 측정하여 D-glucose를 정량하였다. 이때 효소활성 단위는 μ M D-glucose/ml/min로 표시하였다.

분자량 측정

정제효소의 분자량은 전기영동법으로 측정하였으며 표준 단백질로서 β -lactoglobulin, trypsinogen, egg albu-

min과 bovine albumin 등을 사용하였다.

정제효소의 효소학적 특성

정제효소의 최적 pH를 조사하기 위하여 McIlvaine buffer를 사용하였으며 pH안정성 시험에서는 상기 완충용액과 효소액을 혼합하여 40℃에서 20분간 방치한 후 최적 pH로 조절하여 잔존활성을 측정 하였다.

효소활성의 최적온도를 측정하기 위하여 각 온도에서 60분간 반응시켜 효소활성을 측정하였고 열 안정성은 각 효소액을 최적 pH로 조절한 후 40℃와 50℃에서는 30분부터 30분 간격으로, 60℃에서는 5분부터 5분 간격으로 방치시킨 후 기질을 첨가하여 잔존활성을 측정하였다.

각종 화합물이 효소활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 50 mM phosphate buffer(pH 6.0)에 용해한 각종 화합물과 효소용액을 동량 혼합하여 40℃에서 20분간

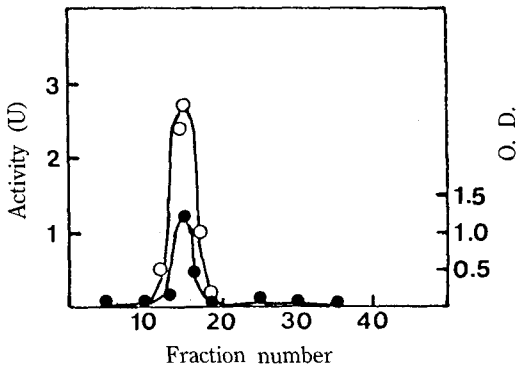


Fig. 1. Gel filtration chromatogram of glucanase peak I on Sephadex G-75.

○—○ : Activity(U), ●—● : O. D.(280 nm)

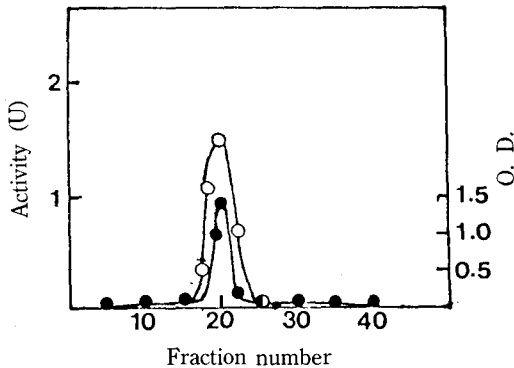


Fig. 2. Gel filtration chromatogram of glucanase peak II on Sephadex G-75.

○—○ : Activity(U), ●—● : O. D.(280 nm)

방치한 후 효소의 잔존활성을 측정하였다.

Michaelis constant를 구하기 위해 laminarin을 1.0~10.0 mg/ml까지 농도별로 정제효소와 반응시켰고 gluca-nase I, II의 초기반응속도를 측정하여 Michaelis-Menten식에서 Km값을 구하였다.

결과 및 고찰

Glucanase의 정제

녹맥아에서 추출한 효소액을 DEAE-Sephadex A-50 column으로 분획한 결과 비흡착 분획중에서 endo-β-1,3-

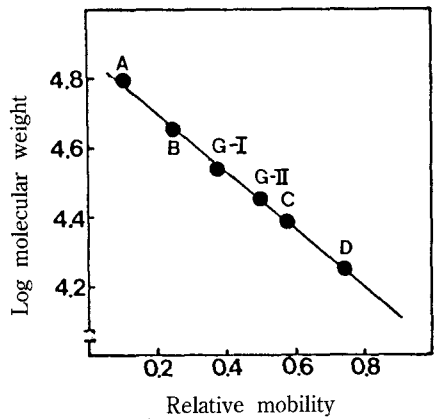


Fig. 3. Determination of the molecular weight of the purified glucanase I, II by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

A : Bovine albumin(66,000), B : Egg albumin(45,000), C : Trypsinogen(24,000), D : β-lactoglobulin(18,400), G-I : Glucanase I(35,000), G-II : Glucanase II(28,000)

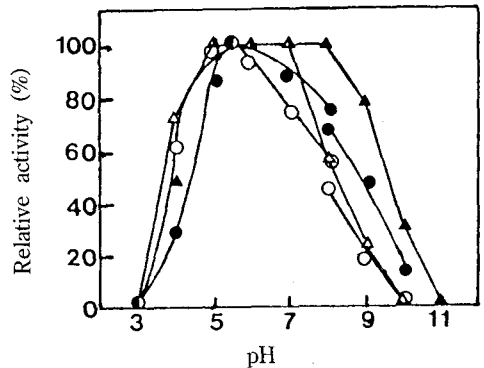


Fig. 4. Optimal pH and pH stability of purified glucanase from green malt.

Optimal pH; ○—○ : Glucanase I, ●—● : Glucanase II
pH stability; ▲—▲ : Glucanase I, △—△ : Glucanase II

glucanase 활성이 높은 부위(이하 glucanase I)와 흡착 분획 중에서 활성이 높은 부위(이하 glucanase II)가 나타났다.

비흡착 분획을 CM-Sephadex C-50 column과 Sephadex G-75 column으로 분획한 결과 Fig. 1과 같이 fraction No. 10~20에 단일 peak가 분리되었으며 흡착 분획을 sephadex G-75 column으로 gel filtration한 결과는 Fig. 2와 같이 fraction No. 16~24에 단일 peak가 분리되었다.

정제효소의 분자량

18,400에서 66,000까지의 분자량을 가진 표준 단백질을 사용하여 bromophenol blue의 상대이동도에 대한 분자량을 semi-log plot한 결과는 Fig. 3과 같았으며 따라서 35,000과 28,000으로 추정되었다. Abeles등⁷⁾은 콩잎에서 추출한 glucanase의 분자량을 34,000으로 추정

하였는데 이는 본 실험의 정제효소 I과 유사했다.

정제효소의 효소학적 특성

정제효소의 pH특성을 조사한 결과는 Fig. 4과 같이 최적 pH는 pH 5.5이었다. Manner와 Marshall⁸⁾은 malted barley에서 추출한 endo-β-1,3-glucanase의 최적 pH는 pH 5.3이라고 보고하였고, Ballance와 Meredith⁹⁾은 녹맥아에서 추출한 endo-β-1,3-glucanase의 최적 pH는 pH 5.0이라고 보고하여 이들과 유사한 경향을 보였다. 그리고, pH안정성은 glucanase I은 pH 5.0~7.0에서 안정하였고 glucanase II는 pH 5.0~8.0에서 안정함을 보여 glucanase I에 비해 II가 다소 넓은 범위의 pH에서 안정함을 나타내었다.

두 효소의 최적 온도는 Fig. 5과 같이 40℃임을 알 수 있었다. 대부분의 미생물이 생성한 glucanase의 최적 온도^{9,10,11)}는 35~40℃로서 이와 비슷한 경향을 보였다. 그리고 정제효소의 열안정성은 Fig. 6과 같이 glucanase I은 40℃에서 60분간, 50℃에서 30분간, 60℃에서 5분간 안정하였고 그 이후는 보온 방치시간이 경과함에 따라 급격하게 활성이 떨어졌다. 한편, glucanase II는 40℃와

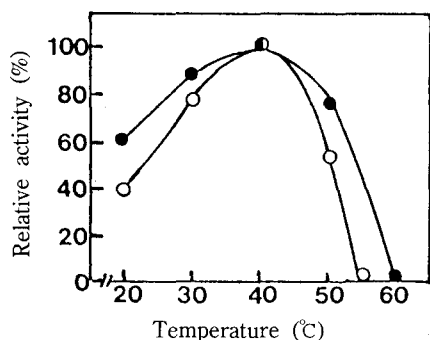


Fig. 5. Optimal temperature of purified glucanase I, II from green malt.

○—○ : Glucanase I, ●—● : Glucanase II

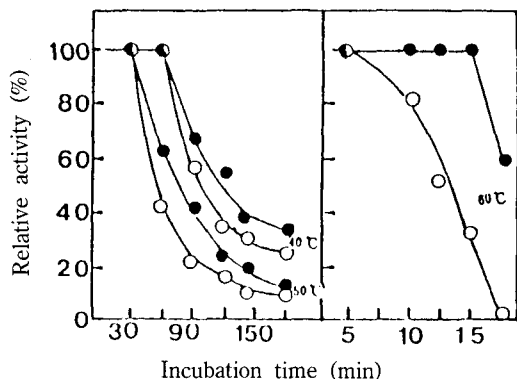


Fig. 6. Thermal stability of purified glucanase I, II from green malt.

○—○ : Glucanase I, ●—● : Glucanase II

Table 1. Effect of various compounds on the activity of purified glucanase I, II from green malt

Compounds	Relative activity (%)	
	I	II
Control	100	100
Na ₂ SO ₄	94	96
NaNO ₃	91	100
CH ₃ COOK	83	98
NaH ₂ PO ₄	87	94
CaSO ₄	80	100
K ₂ SO ₄	88	98
LiCl	75	98
MnSO ₄	114	127
FeSO ₄	108	120
MgSO ₄	102	90
NaCl	101	108
KNO ₃	90	103
Na ₂ CO ₃	79	100
KH ₂ PO ₄	91	91
CaCl ₂	113	100
KCl	67	96
NH ₄ Cl	67	94
EDTA	75	98
AgNO ₃	38	15
HgCl ₂	0	0
ZnSO ₄	96	90

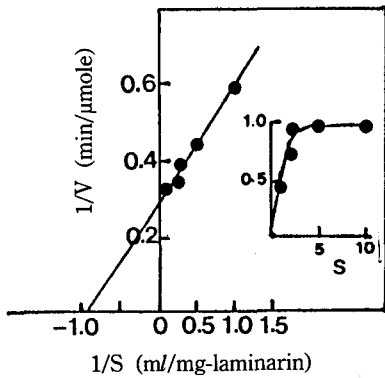


Fig. 7. Lineweaver-Burk plot of glucanase I from green malt.

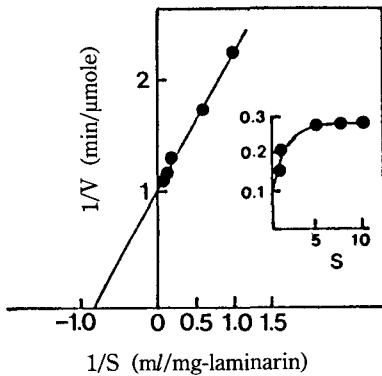


Fig. 8. Lineweaver-Burk plot of glucanase II from green malt.

50 °C에서는 Glucanase I과 유사한 안정성을 보였으나 60 °C에서는 15분간 안정하였다. Ballance와 Meredith⁶⁾가 녹맥아에서 정제한 endo-β-1,3-glucanase는 60 °C에서 40 분간 안정하였다고 보고하였는데 이는 본 정제효소보다 안정성이 좋았다.

NaCl을 비롯한 각종화합물의 영향을 검토한 결과 Ta-

ble 1과 같이 CaCl₂, FeSO₄ 그리고 MnSO₄ 등은 효소활성을 저해하지않고 AgNO₃와 HgCl₂ 등에 의해서는 활성이 저해됨을 알 수 있었고 특히 HgCl₂에 의해서는 두 효소 모두 실패되었다. *Oerskovia* sp.^{10,12)}가 생성하는 효소는 Fe, Mn 그리고 Zn 이온에 의해 저해받지 않고 Hg 이온에 의해 저해받는다라는 것과는 비슷한 경향을 보였다.

그리고, 정제효소와 기질과의 초기 반응속도를 측정하여 Lineweaver-Burk의 방법에 따라 plot한 결과는 Fig. 7 및 Fig. 8과 같으며 glucanase I과 glucanase II의 Michaelis constant 값은 각각 1.03 mg/ml, 1.20 mg/ml이었다. *Arthrobacter* 속⁹⁾이 생성한 glucanase의 Km 값이 1.09 mg/ml로 정제효소 I과 유사한 경향을 보였다.

참 고 문 헌

1. Thompson, R. G. and Laberge, D. E. : MBAA Tech. Quart., 18(3) : 116(1981)
2. Morgan, A. G. and Gill, A. A. and Smith, D. B. : J. Inst. Brew., 89 : 283(1983)
3. Bamforth, C. W. : J. Inst. Brew., 89 : 391(1983)
4. Martin, H. L. and Bamforth, C. W. : J. Inst. Brew., 86 : 216(1980)
5. Bamforth, C. W. and Martin, H. L. and Wainwright, T. : J. Inst. Brew., 89 : 391(1979)
6. Ballance, G. M. and Meredith, W. O. S. : J. Inst. Brew., 82 : 64(1976)
7. Abeles, F. B., et al. : Plant physiol., 47 : 129(1970)
8. Manners, D. J. and Marshall, J. J. : J. Inst. Brew., 75 : 550(1969)
9. Kitamura, K. and Kaneko, T. and Yamamoto, Y. : J. Gen. appl. Microbiol., 20 : 323(1974)
10. Obata, T. and Yamashita, K. and Nunokawa, Y. : J. Ferment. Technol., 53(5) : 256(1975)
11. Akio, K. : J. Ferment. Technol., 46(10) : 930(1968)
12. Obata, T. and Yamashita, K. and Nunokawa, Y. : J. Ferment. Technol., 54(9) : 640(1976)

Characteristics of endo- β -1,3-glucanase from green malt

Bong-Soo Son and Nack-Kie Sung(Department of Food Science and Technology, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea)

Abstract : Two types of endo- β -1,3-glucanases were purified from green malt and their basic characteristics were studied. Molecular weights of glucanase I and glucanase II were estimated, by electrophoresis, to be 35,000 and 28,000, respectively. Purified glucanase I and II showed the highest activity at pH 5.0~7.0 and 5.0~8.0, respectively. The optimal temperature of purified glucanase I and II was 40 °C. Purified glucanase I and glucanase II were stable at 40 °C for 60 min and at 50 °C for 30 min. All enzymes were inactivated by AgNO₃ and HgCl₂ while those were not activated by various compounds tried. Km values of glucanase I and II were 1.03 mg/ml, 1.20 mg/ml, respectively.