

*Aspergillus ustus*가 생산하는 Exo-dextranase의 정제에 관한 연구

李建柱·李炯煥
建國大學校 文理大 生物學科 分子 微生物學 教室

Purification of Exo-dextranase from *Aspergillus ustus*

Kon-Joo Lee and Hyung-Hoan Lee

Molecular Microbiology Laboratory, Department of Biology, Kon Kuk University, Seoul 133, Korea

Abstract: *Aspergillus ustus* was cultured in the salts media contained dextran (2%). Then the cultured liquid media were filtrated and concentrated up to 10 folds by evaporation, and then purified by means of acetone precipitation, of a repeated chromatography on the columns of DEAE-Ccellulose, Biogel P-150, and Sephadex G-200. Total proteins in the initial culture filtrate were 38,500mg, but the final amounts of proteins were 172mg. The specific activity of the protein in the culture filtrate was 1,340 μ moles products per minute per mg protein, but the final specific activity of the protein was 2,448 μ moles products per minute per mg protein. The final yields remained about 30% of the initial.

Key Words: *Aspergillus ustus*, Dextran, Exodextranase, Dextranase, Purification.

미생물에 의해 생산되는 dextran의 分解酵素는 1940년대 후반부터 研究되기 시작하였다. dextranase의 초기 연구는 혈액증량제로 텍스트란을 사용하기 위하여 적당한 分子量으로 잘라주는데 主안점을 두었다. Nordström(1948)과 Jean 등 (1950)은 텍스트란이 酵素分解에 의하여 α -1, 6-배당결합을 포함하는 간단한 탄수화물로 절단될 수 있다고 보고 했으며, Ingelman (1948)과, Whiteside-Carlson 등(1952)은 혈액증량제로 텍스트란을 생산하는데 몇종의 텍스트라나제를 사용하였다고 보고했다.

텍스트라나제의 생산은 주로 細菌과 眞菌에 의해 이루어 지고 있다. 細菌에 의한 텍스트라나제의 생산은 Hehre 등(1952), Bailey 등(1958), Richards 등(1972), Cheetham 등(1972)과 Takamori 등(1976) 등에 의하여 보고되었고, 眞菌이 생산하는 텍스트라나제의 보고는(Tsuchiya *et al.*, (1952), Berki *et al.* 1977과 Maksimov *et al.*(1979) 등에 의해 이루어졌다. 眞菌에 의한 dextranase 生産菌株는 주로 *Penicillium*屬에 국한되어 있었으며, *Aspergillus*屬에 관한 보고는 Hiraoka 등(1972)이 보고한 *Asp. carneus*의 효소 특

성이 밝혀진 정도이다. 최근 들어와 dextranase의 기초적인 연구나 텍스트란 생산이나 실험공업 이외에도 충치예방의 차원에서 많이 연구되기 시작하였다. 著자들은 전보(Lee 1980)에서 분리 동정한 *Asp. ustus*가 생산하는 dextranase를 정제하였다.

實驗材料 및 方法

實驗 菌株 및 배양

Aspergillus ustus(Lee, 1980)을 사용하였다. 효소 생산 배양은 NaNO_3 0.2%, NaHPO_4 0.1%, KCl 0.05%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0001%, Malt extract 0.5%, Dextran(Meito Sangyo Co.) 1.0%, yeast extract 2.0%를 증류수에 녹인 후 pH를 8.0 ± 0.2 로 조정한다 다음 121°C , 15Lb에서 멸균한 후에 28°C 에서 5일간 배양하였다.

Dextranase Activity의 측정

역가측정의 방법은 Tsuru 등(1971) 및 Minakova 등(1976)의 방법에 준하여 실시하였다. 기질용액은 pH 5.1의 초산완충액에 든 텍스트란용액(2.5%)을 사용하

였으며 40°C 수욕에서 효소액을 가한 후 일정시간 반응시켜 유리된 환원량의 양을 Somogyi법(1945)에 의해 측정하였다.

단백질의 정량

UV-vis spectrophotometer를 사용하여 280nm에서 흡광도를 측정하고 동시에 lysozyme액을 표준액으로 하여 Folin-Ciocalteu 시약으로 발색시킨 후 500nm에서 흡광도를 측정하였다.

효소의 분리

효소생산 배지에 배양시킨 액 10l를 외부온도를 20°C로 하여 회전 감압증류기로 감압농축하여 약 1l로 하였다. 농축액에 냉각한 아세트산 4l를 가하여 침전을 시킨후 냉장고에서 12시간 정치 시켰다. 다음 원심분리에 의하여 침전을 모으고 소량의 0.01M 초산완충액(pH5.0)에 용해시켜 동일 완충액으로 냉장고에서 24시간 투석시켰다. 투석중 8시간 마다 투석액을 교환하였다.

효소의 정제

투석한 용액 10ml(단백질로서 385mg)를 취하여 원심분리하여 불용성 물질을 제거하고 감압 건조하여 0.05M Tris-HCl 완충액(pH 6.0)으로 균일화시킨 DEAE-cellulose(Sigma Co.) column(2.3×40cm)에 넣고 0.05M Tris-HCl 완충액(pH 6.0)과 0.05M Tris-HCl 완충액-1M NaCl액(pH 6.0)을 일정비율로 혼합하여 유출시켰다. 유출액은 10ml씩 받아 이액의 280nm에서의 흡광도를 측정하여 단백질을 정량하고 유리환원당을 측정하였다. 텍스트라나제 활성을 나타내는 부위를 모아 진공농축 시킨후 0.05M Tris-HCl 완충액(pH 8.0)에 녹여 동일 완충액으로 24시간 냉장고에서 투석하였다. 투석된 액을 가지고 DEAE-cellulose column(2.3×30cm)으로 rechromatography를 실시하였다. 유출은 0.05M Tris-HCl 완충액 0.6M NaCl액(pH 8.0)으로 일정비율로 혼합 유출시켰다. 유출액에 대하여 위와 동일한 조작을 하였다. Dextranase activity를 나타내는 부위를 진공건조시켜 Bio-Gel P-150(Bio-Rad Lab.)을 이용하여 gel-filtration을 실시하였다. 0.01M 초산완충액(pH 5.0)으로 균일화시켜 동일 완충액으로 유출시켰다. Dextranase 활성을 나타내는 부위를 모아 Sephadex G-200 (Pharmacia Fine Chem Inc.)으로 재 정제하였다.

結果 및 考察

배양액을 여과한 액(10l)의 단백질 함량은 38,500mg

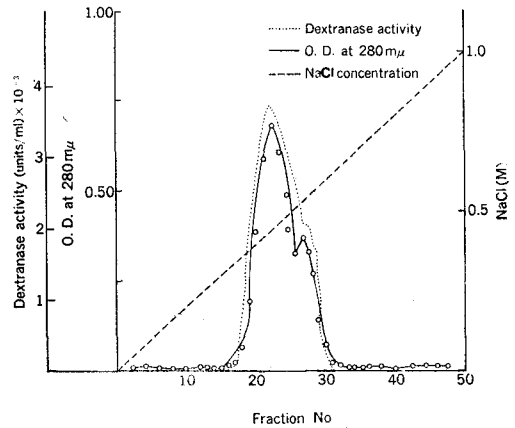


Fig. 1. Column chromatography of DEAE-cellulose of a crude dextranase preparation.

이었으며 총 효소량은 1,340kunits였다. 이 액을 농축하여 침전시키고 투석하여 조효소액을 만든 다음의 단백질 함량은 3,120mg으로 크게 감소하였으며 총효소량은 870kunits로 감소하였다. 다음에 이 액을 DEAE-cellulose로 흡착시켜 부분 정제하였다. 결과는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 No. 17~30에서 효소활성을 나타냈으며 단백질 함량은 702mg이고 총 효소량은 812kunits였다. 효소활성 부위를 모아 탈염과 투석을 시킨 결과 단백질 422mg에 총 효소량은 740kunits였다. 이 효소액을 가지고 DEAE-cellulose에 다시 흡착시켜서 정제한 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 No. 9~20에서 텍스트라나제 활성을 나타냈다. 이 때 단백질의 함량은 258mg으로 감소하였고 총 효소량도 512kunits로 감소하였다. 이 효소액을 Bio-Gel P-150에

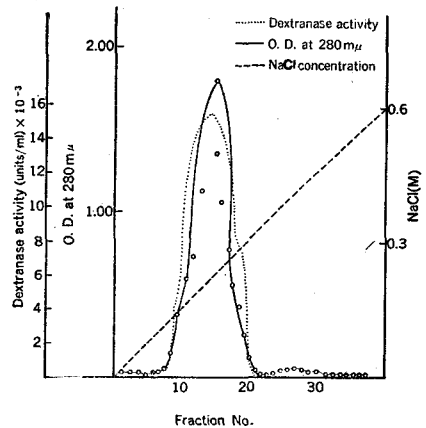


Fig. 2. Elution pattern of a partially purified dextranase preparation in rechromatography on a DEAE-cellulose column.

Table 1. Purification of dextranase from the culture filtrate of *Aspergillus ustus*.

Procedure	Total Protein (mg)	Total ^a activity	Specific ^b activity	Yields(%)
Culture filtrate	38,500	1,340	34.8	100.0
Precipitate and dialysis	3,120	870	278.0	64.9
DEAE-cellulose chromatography	702	812	1,157.0	60.6
Salting out and dialysis	422	740	1,754.0	55.2
DEAE-cellulose rechromatography	258	572	1,985.0	38.2
Gel filtration on Bio-Gel P-150	205	475	2,317.0	35.4
Gel filtration of Sephadex G-200	172	421	2,448.0	31.4

a : μ moles products/min

b : μ mole products formed/min mg protein

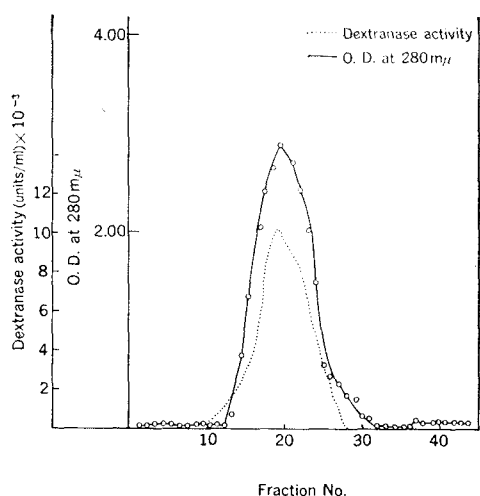


Fig. 3. Gel filtration on Bio-Gel P-150 of a partially purified dextranase preparation.

흡착시킨 후 유출한 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같은 유출 형태를 나타냈으며 No. 10~28까지 텍스트라나제 활성을 나타냈다. Bio-Gel로 부분 정제한 결과 단백질 활성을 나타냈다. Bio-Gel로 부분 정제한 결과 단백질의 함량은 205mg이고 총 효소량은 475kunits였다. 4차 크로마토그래피는 Sephadex G-200을 사용하여 실시하였다. Sephadex G-200의 유출형태는 Fig. 4에서 보는 바와 같이 거의 대칭에 가까운 형태로 No. 3~9까지 텍스트라나제 활성을 나타냈다. 이 때 단백질의 양은 Table 1에서 보는 바와 같이 172mg이었으며 총 효소량은 421kunits였다. 최초 배양여액에서 단백질 함량이 38,500mg이고 총 효소의 활성은 1,340 kunits였으며, 비활성은 34.8 μ mole glucose/min로 나타났고, Sephadex G-200에서 나온 총 단백질은 172 mg이었으며, 효소의 총 활성은 421kunits가 되었다.

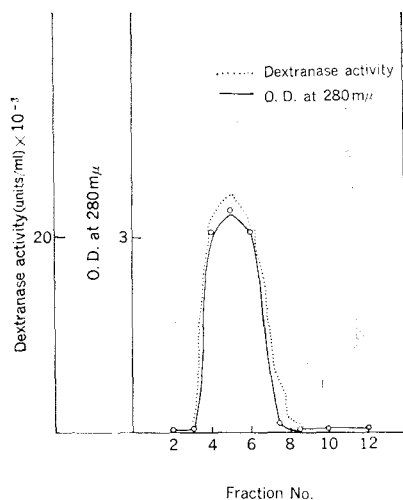


Fig. 4. Gel filtration on Sephadex G-200 of a partially purified dextranase preparation.

이 최종유출액의 잔존효소(172mg)의 비활성은 2,448 μ mole glucos/min을 나타내서 배양여액에 있는 효소의 비활성에 비해서 약 70배로 증가한 최종효소액을 얻었다. 처음 1,340kunits였으나 최종에는 421kunits로 되어 잔존역가는 31.4%였다.

摘 要

*Aspergillus ustus*의 dextranase을 정제하기 위하여 냉각 Aceton에 침전시키고, DEAE-cellulose, Bio-Gel P-150 및 Sephadex G-200을 사용하며 순수정제하였다. 처음 배양액 10l에 대한 총 효소량은 1,340kunits 단백질 양은 38,500mg였으며, 최종정제 단계인 Sephadex G-200에서는 총 효소 활성량은 421 kunits, 단백질량은 172mg이었으며 비활성은 약 70배로 증가했다.

References

- Bailey, R.W. and Clarke, R.T.J. (1958): A bacterial dextranase. *Biochem. J.* 72:49.
- Berki, L., Preobrazhenskaya, M.E. and Nanasi, P. (1977): Investigations of a mould dextranase. *Proc. Hung. Anna. Meet. Biochem.* 17:73.
- Cheetham, N.W.H. and Richards, G.N. (1972): Studies on dextranase. II. An intracellular bacterial dextranase. *Carbohydr. Res.* 25:333.
- Hehre, E.J. and Sery, T.W. (1952): Dextran-splitting anaerobic bacteria from the human intestine. *J. Bacteriol.* 63:424.
- Hiraoka, N., Fukumoto, J. and Tsuru, D. (1972): Studies on mold dextranases. III. Purification and some enzymatic properties of *Aspergillus carneus* dextranase. *J. Biochem.* 71:57.
- Ingelman, B. (1948): Enzymatic breakdown of dextran. *Acta. Chem. Scand.* 2:803.
- Jeans, A. and Wilham, C.A. (1950): Periodate of dextran. *J. Am. Chem. Soc.* 72:2655.
- Lee, K.J. (1980): Studies on mold dextranases. I. Dextranase production by a strain of *Aspergillus ustus*. *Kor. J. Microbio.* 18:188.
- Maksimov, V.I. Danilova, T.I., Khasirdzheva, A.K. and Molodova, G.A. (1979): Stabilization of *Penicillium funiculosum* and *Fusarium solani* dextranase preparations during heating and lyophilization. *Pri. Biokh. Microbio.* 15:846.
- Minakova, A.L. and Preobrazhenskaya, M.E. (1977): Properties and specificity of the action of dextranase from *Penicillium purpurogenum*. *Biokhimiya.* 42:1264.
- Nordström, L. and Hultin, E. (1948): Dextranase, a new enzyme from mould. *Svensk. Kem. Tid.* 60:283.
- Richards, G.N. and Streamer, M. (1972): Studies on dextranases. I. Isolation of extracellular, bacterial dextranases. *Carbohydr. Res.* 25:323.
- Somogyi, M. (1945): A new reagent for the determination of sugars. *J. Biol. Chem.* 160:61.
- Takamori, K., Minzuno, F., Matsuda, Y., Takahashi, N. and Horikawa, T. (1976): Dextran degrading activity of oral microbial flora. *Bull. Tokyo Med. Dent. Univ.*, 23:23.
- Tsuchiya, H.M., Jeans, A., Bricker, H.M. and Wilham, C.A. (1952): Dextran degrading enzymes from molds. *J. Bacteriol.* 64:513.
- Tsuru, D., Hiraoka, N., Hirose, T. and Fukumoto, J. (1971): Part 2. Dextranase production by a strain of *Aspergillus carneus*. *Agr. Biol. Chem.* 35:1727.
- Whiteside-Carlson, V. and Carlson, W.W. (1952): Enzymatic hydrolysis of dextran. *Science*, 115:43.

⟨Received February 20, 1983⟩