

Aureobasidium pullulans C-23이 생산하는 세포외 Fructosyl transferase의 특성

이광준 · 최정도¹ · 임재윤*

충북대학교 자연과학대학 미생물학과

¹충북대학교 자연과학대학 생화학과

Characterization of Extracellular Fructosyl Transferase from *Aureobasidium pullulans* C-23

Lee, Kwang-Jun, Jung-Do Choi¹ and Jai-Yun Lim*

Department of Microbiology and Biochemistry¹,

Chungbuk National University, Cheongju 360-763, Korea

ABSTRACT: Extracellular fructosyl transferase from *Aureobasidium pullulans* C-23 was characterized. The molecular weight of the isolated enzyme was determined to be approximately 170,000 by SDS polyacrylamide gel electrophoresis. The enzyme has the pI value of about 3.7. The enzyme was almost completely inhibited by 5 mM Hg²⁺, but was not significantly affected by other cations tested. The enzyme was inactivated by treatment of tryptophan-specific reagent N-bromo-succinimide and tyrosine-specific reagent iodine. The substrate sucrose showed protective effect on the inactivation of the enzyme by the both reagents. These results suggest that tryptophan and tyrosine residues are probably located at or near active site of the enzyme.

KEY WORDS □ Fructosyl transferase, *Aureobasidium pullulans*, Fructo-oligosaccharides

Fructosyl transferase(EC 2.4.1.9)는 sucrose를 가수분해하여 유리되는 fructose를 sucrose에 전달하여 fructo-oligo당을 생산하는 효소이다. Fructose가 sucrose에 결합하는 위치에 따라 1-kestose, 6-kestose 그리고 neo-kestose등으로 구분되며, 결합되는 수에 따라 kestose(GF2), nystose(GF3), fructosyl nystose(GF4)와 같은 fructo-oligo 당이 생성된다(Shiomi *et al.* 1979). 이 효소는 식물에서 gluco-fructosan 생성에 관여하는 효소로서, 양파(Robert, *et al.*, 1980), 돼지감자(Edelman and Jefford, 1966), asparagus(Shiomi, 1976)등에서 식물 성분중의 fructo-oligo당의 생합성과 관련하여 연구가 되었으나, 식물에서의 fructo-oligo당의 생산은 충분하지 못하므로 미생물에서의 생산이 1950년대 *Aspergillus oryzae*(Pazur, 1952), *Penicillium spinulosum* (Bealing, 1953) 그리고 *Candida krusei*(Edelman, 1954)등이 생산하는 invertase의 연구로부터 시작되었다. 그 이후로 *Claviceps purpurea* (Dickerson, 1972), *Phytophthora parasitica*

(Hankin and McIntype, 1977), *Streptococcus mutans* (Wenham *et al.*, 1979) 그리고 *Fusarium oxysporum* (Gupta and Bhatia, 1980 and 1982) 등에서 생산하는 fructosyl transferase의 반응기작과 fructo-oligo당의 구조 분석등이 연구되었다. Fructo-oligo당은 식물에 널리 분포되어 있는 과당류로서 양파, 우영, asparagus등에 많이 함유되어 있으며 감미도는 sucrose의 20~40% 이지만 저칼로리이며, 장내 소화 효소에 의해 소화되지 않는다(Oku *et al.*, 1984). 물성은 설탕과 거의 비슷하여 식품가공에 사용하는데 설탕대신 사용할 수 있어 가공특성이 매우 양호하다. 특히 장내 유용세균인 *Bifidobacterium*의 증식인자로 장내의 균총에 변화를 줄 수 있으며, 장의 운동을 촉진시켜 변비의 개선 효과가 있다(Adachi, 1983). 그 외에도 충치의 원인이 되지 않으며 지질대사의 개선이 인정된다는 보고가 있어 건강 감미료로서 유용하리라 생각된다. 이러한 이유로 fructo-oligo 당이 건강감미료 및 사료 첨가용으로 수요가 증가하고 있

으며 공업화됨에 따라 fructo- oligo당을 생산하는데 필수적인 fructosyl transferase의 연구 또한 중요하게 대두되었다. 그러나 fructosyl transferase의 생산에 관한 연구는 어느 정도 이루어져 있으나 효소 화학적인 연구는 비교적 되어 있지 않은 실정이다. 외국에서는 Gupta와 Bhatia등(1982)이 *Fusarium oxysporum*에서 fructosyl transferase를 순수분리하여 효소의 기초적 성질에 대한 연구를 수행하였으나, 그 이후 효소의 특성에 대한 연구들이 진전되지 못하였다.

본 실험실에서는 자연계에서 fructosyl transferase의 생산성이 높은 것으로 판명된 *Aureobasidium pullulans* C-23을 분리 동정하였으며(Cho *et al.*, 1990), 균체가 fructosyl transferase를 최대로 생산하는 조건들을 검토하고 그 배양조건에 따라 대량 배양하여 효소를 생산하였다.(Cho and Lim, 1990). 또한 *Aureobasidium pullulans* C-23이 세포 외로 분비하는 fructosyl transferase를 일반적인 효소정제법에 따라 순수 분리하고 이 효소들의 효소 화학적인 기본 성격에 대하여 보고하였다(Lee *et al.* 1991).

본 논문에서는 순수정제한 효소의 특성과 반응기작의 연구를 위하여 특정 아미노산에 작용하는 화학수식제를 처리하여 효소의 활성에 필요한 반응부위의 아미노산에 대하여 조사하였다.

재료 및 방법

배양 방법

자연계로부터 분리한 *Aureobasidium pullulans* C-23을 Czapek-Dox배지를 변형시켜(sucrose 15 K₂HPO₄ 0.5, MgSO₄ 0.05, (NH₄)₂C₂O₄ 0.5, KCl 0.05, FeSO₄ 0.001, yeast extract 0.5) 5L jar fermentor에 pH 6.5, 30°C 조건에서 3일간 대량 배양하였다.

효소 반응액의 조제 및 활성 측정

기질로는 80% sucrose 3.75 ml, 완충액으로는 0.1 M sodium citrate(pH 5.5) 1.15 ml를, 효소 0.1 ml를 사용하였다. 효소 반응은 반응용액을 55°C의 water bath에서 5분 동안 preincubation 한 후 15분 동안 반응을 수행하였다. Fructosyl transferase의 활성은 효소가 1분 동안 1 μmole의 glucose를 유리시키는 효소량을 1 unit로 계산하였다.

당과 단백질의 정량

효소반응액 중의 환원당은 Somogyi-Nelson법(Nelson, 1944)으로 정량하였고, glucose의 정량은 glucose oxidase-peroxidase법(Sigma diagnostic kit No. 510)에 따랐다. 단백질의 정량은 Lowry등(1951)의 방법으로 측정하였고, 표준단백질로는 bovine serum albumin(BSA)을 사용하였다.

효소의 정제

전 보고(Lee *et al.* 1991)에서 기술한 것과 같이 ethanol침전법, DEAE- Sephadex A-50을 이용한 이온교환 수지법 그리고 조제용 disc gel elec-

trophoresis방법을 통하여 순수정제하였다.

분자량 측정

순수 분리된 효소의 분자량은 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 이용하여 Laemmli(1970)의 방법에 준하여 측정하였다. 전기영동 gel은 7.5%를 이용하였고 tube당 8 mA로 4-5시간 전기영동 하였다. 표준 단백질로는 carbonic anhydrase(MW 29,000), egg albumin(45,000), bovine plasma albumin(66,000), phosphorylase B (97,000), β-galactosidase (116,000) 그리고 myosin (205,000) (Sigma MW-SDS-200 kit)을 사용하였다. 전기영동 후 gel은 Coomassie Brilliant Blue G-250으로 염색한 후 탈색하였다.

등전점 측정

등전점은 2 (w/v) carrier pharmalyte(pH 3.0-10.0)를 이용하여 측정하였다. 전기영동은 polyacrylamide 7.5%를 이용하여 200 V로 12시간 걸어준 후 약 30 조각으로 gel을 잘랐다. 각각의 조각을 2 ml의 증류수에 현탁시키고 pH와 효소활성을 측정하였다.

세포외 효소의 metal ion에 대한 영향 조사

효소활성에 영향을 줄 수 있는 metal ion들을 효소반응액에 최종 농도 5 mM로 첨가하여 효소활성을 조사하였다. 효소의 활성에 영향을 보인 금속이온은 효소와 각 농도별로 incubation한 후 남아있는 활성을 측정하였다.

화학수식제의 영향

활성 부위의 아미노산 잔기를 알아보기 위하여 group specific reagent인 iodine, N-bromosuccinimide(NBS), β-naphthoquinone-4-sulfonic acid (NQS), 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid(TNBS), monoiodoacetic acid, glyoxal, p-chloromercuribenzoic acid(PCMB), N-ethylmaleimide, 그리고 5, 5'-dithiobis- nitrobenzoic acid(DTNB)를 가지고 효소를 화학적으로 변형시켰다.

화학 수식제의 처리는 효소에 각각의 수식시약을 농도별로 처리하여 30°C에서 일정시간 incubation 후 남아 있는 효소의 활성을 표준방법에 의해 측정하였다. 효소의 불활성화에 미치는 기질의 영향을 알아보기 위하여 효소의 활성에 영향을 보인 수식시약과 효소를 incubation할 때 기질인 sucrose를 일정량 함께 첨가하여 반응 시킨 후 남아있는 효소의 활성을 시간별로 측정하였다. NBS를 처리한 효소의 기질 특이성을 측정하기 위하여 효소와 NBS를 반응시킨 후 Sephadex G-15 column으로 gel filtration 하여 과량의 미반응 NBS를 제거한 후 기질 농도에 따른 효소의 활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

세포외 fructosyl transferase의 일반적 특성

최근 건강 감미료에 대한 소비가 증가하고 그에 따라 fructo-oligo당의 공업화가 이루어짐으로 fructo-

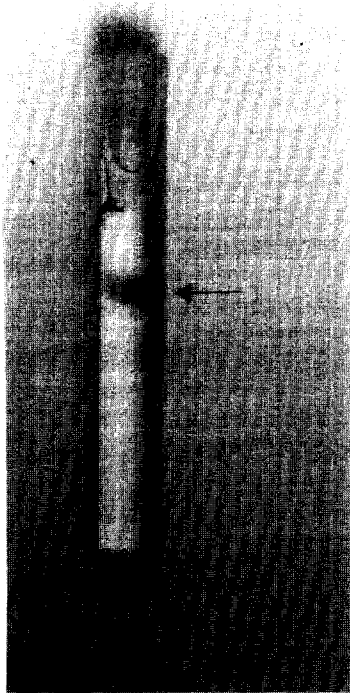


Fig. 1. Disc electrophoresis patterns of purified enzyme.

oligo당의 생산에 필수적이라고 할 수 있는 fructosyl transferase의 연구는 매우 중요하다고 할 수 있다. 그러나 이 효소에 관한 연구는 Gupta와 Bhatia(1982)의 연구 이후 별 진전을 보이지 못했다. 본 실험에서는 전 보고(Lee et al. 1991)에서 순수정제한 세포의 효소의 일반적 성격을 규명하였다. Disc gel electrophoresis로 순수정제를 확인한(Fig. 1) 효소의 분자량은 약 170,000이었다(Fig. 2). 이 분자량은 세포내 효소의 경우 분자량이 190,000정도로 나타난 것과 거의 유사하였다. 또한 SDS-PAGE에 의한 분자량 측정 결과 이 효소는 다른 subunit는 나타나지 않는 단일 band로 이루어져 있었다. 이 효소의 pI는 3.7로 세포내 효소의 경우와 일치하였다(Fig.3). 효소의 활성에 영향을 미칠수 있는 금속이온을 처리한 결과 Hg²⁺에 의하여 활성이 완전히 억제되었고, K⁺, Na⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Ni²⁺, Fe²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, Co²⁺, 그리고 Cu²⁺와 같은 cation에 의해서는 활성에 별 영향이 없었다(Table 1). 또한 EDTA를 5 mM 처리했을 때에도 효소 활성의 83.8 를 유지하는 것을 관찰하였다. 이것은 효소의 반응에 금속이온들이 직접적으로 관여하지 않는다는 사실을 시사해 준다. 효소의 활성을 완전히 억제한 Hg²⁺의 경우 반응 혼합물에서 5 mM의 농도로 효소의 활성을 억제시킨 반면 기질을 제외한 조건에서 효소와 직접 반응시킨 경우는 100

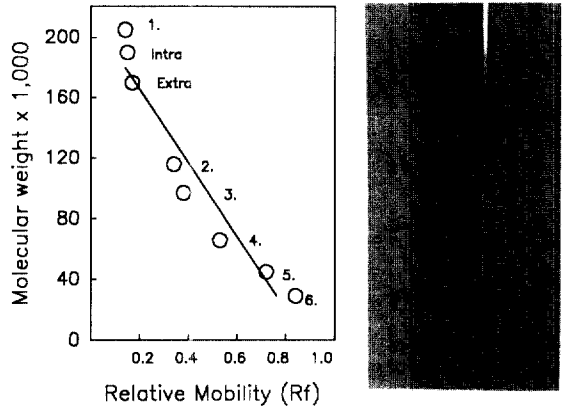


Fig. 2. Molecular weight determination of extracellular fructosyl transferase by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

The standard proteins and their molecular weights were: 1. Myosin(205,000), 2. β -galactosidase(116,000), 3. phosphorlyase B(97,000) 4. bovine plasma albumin(66,000), 5. egg albumin(45,000) and 6. carbonic anhydrase(29,000)

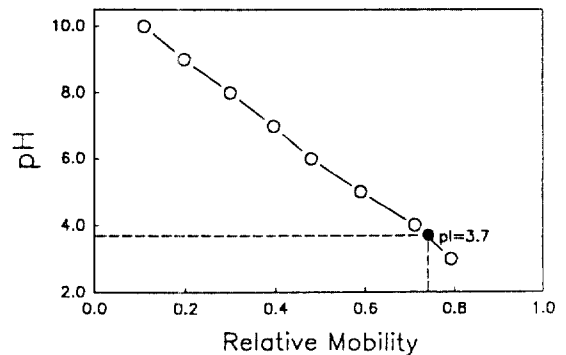


Fig. 3. Determination of pI value of extracellular fructosyl transferase by isoelectric focusing.

Table 1. Effect of metal ions on fructosyl transferase activity.

Agent	Relative Activity (%)	Agent	Relative Activity (%)
None	100.0	KCl	96.2
HgCl ₂	3.4	ZnCl ₂	84.7
NaCl	100.0	CoCl ₂	92.3
NaCl ₂	89.7	CaCl ₂	81.5
MgCl ₂	96.9	FeCl ₂	82.9
FeCl ₂	82.9	MnCl ₂	92.8
MnCl ₂	92.8	EDTA	83.8

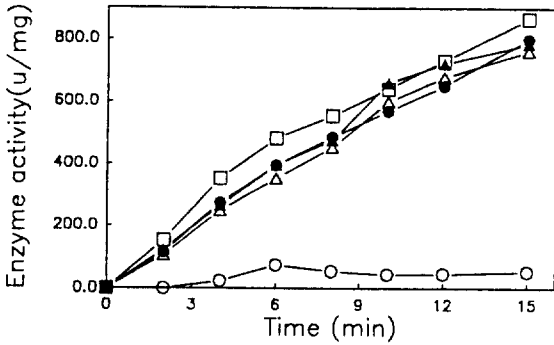


Fig. 4. Effect of β -mercaptoethanol and EDTA on $HgCl_2$ inhibition of the enzyme. The enzyme was incubated with 5 mM $HgCl_2$ (○—○), 5 mM $HgCl_2$ plus 5 mM β -mercaptoethanol (●—●), 5 mM $HgCl_2$ plus 5 mM EDTA (△—△), 5 mM EDTA (▲—▲) and no reagent (□—□).

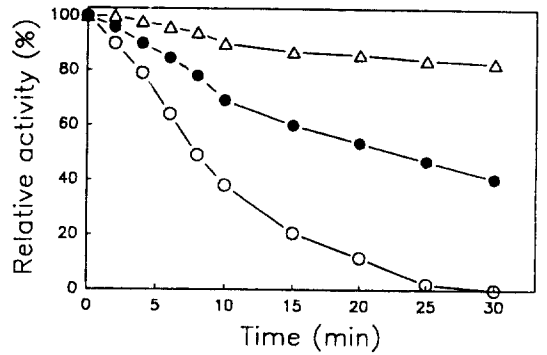


Fig. 5. Effect of NBS on the fructosyl transferase activity. The enzyme was incubated with 1.0 mM NBS (○—○), 0.5 mM NBS (●—●), and 0.1 mM NBS (△—△) as described in Materials and Methods.

Table 2. Effect of group-specific reagents on fructosyl transferase

Reagents*	Relative activity (%)		
	5 mM	20 mM	50 mM
None	100	100	100
Iodine	76	41	0
N-bromosuccinimide	0	0	0
β -naphthoquinone-4-sulfonic acid	100	93	93
2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid moniodoacetic acid	100	95	86
glyoxal	100	100	93
p-chloromercuri-benzoic acid	100	94	95
N-ethylmaleimide	100	98	95
5,5'-dithiobis-nitrobenzoic acid	100	96	94

*Modification reactions were carried out at 30°C in 50 mM citrate buffer, pH 5.5. Modification reactions were initiated by adding reagent to the enzyme solution. Aliquots of reaction mixture were removed after 30 min incubation and assayed for activity.

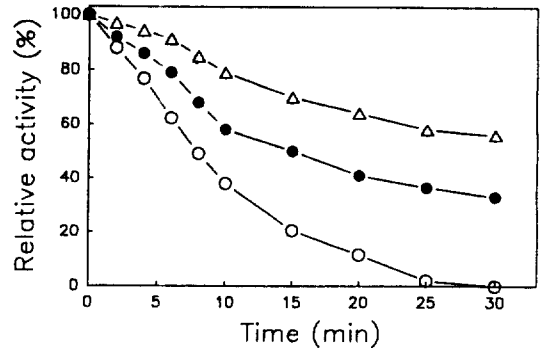


Fig. 6. Protective effect of sucrose on the enzyme inactivation by NBS.

The enzyme was incubated with 1 mM NBS in the presence of no sucrose (○—○), 0.1 M sucrose (●—●), and 1.0 M sucrose (△—△) as described in Materials and Methods.

mM 이상에서도 효소의 활성에 영향을 미치지 못했다. 그 이유는 수은이온이 효소의 활성부위에 직접 결합하여 활성을 억제하는 것이 아니라 효소와 기질의 complex와 반응하는 것으로 사료된다. Hg^{2+} 는 단백질의 sulfhydryl기 (SH기)에 작용하는 것으로 알려져 있으며 또한 단백질자체를 Hg^{2+} 로서 cross link시킴으로써 불활성화된 dimer형태로 변형시키기도 한다고 알려져 있다. 반응 혼합물에서 Hg^{2+} 에 의한 효소의 활성억제는 β -mercaptoethanol과 EDTA에 의하여 Hg^{2+} 이온과 같은 농도에서 각각 방어되었다(Fig. 4). Fructosyl transferase의 화학적 변형

효소활성 부위의 아미노산 잔기를 알아보기 위하여 다양한 반응잔기 수식 시약들을 효소에 처리하였다. 본 효소는 tryptophan-specific reagent인 N-bromosuccinimide(NBS)와 tyrosine-specific reagent인 iodine에 의하여 불활성화 되었다. 그러나, sulfhydryl reagents (moniodoacetic acid, p-chloromercuri-benzoic acid, N-ethylmaleimide 그리고 5,5'-dithiobis-nitrobenzoic acid)와 lysine reagents인 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid와 β -naphthoquinone-4-sulfonic acid, 그리고 arginine reagent인 glyoxal에 의해서는 별 영향을 보이지 않았다(Table 2). NBS에 의한 효소의 불활성화 정도는 농도가 증가하고 반응시간이 길수록 크게 나타났다(Fig. 5). NBS에 의한 효소의 불활성화에 기질인

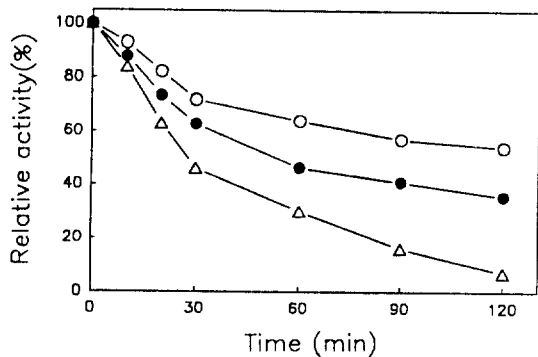


Fig. 7. Effect of iodine on the fructosyl transferase activity.

The enzyme was incubated with 5.0 mM iodine (○—○), 10.0 mM iodine (●—●), and 20 mM iodine (△—△) as described in Materials and Methods.

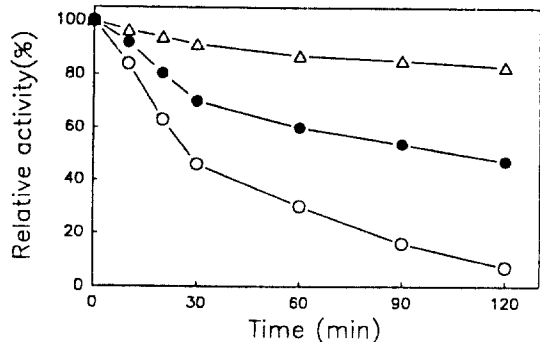


Fig. 8. Protective effect of sucrose on the enzyme inactivation by iodine.

The enzyme was incubated with 20 mM iodine in the presence of no sucrose (○—○), 0.1 M sucrose (●—●), and 1.0 M sucrose (△—△) as described in Materials and Methods.

sucrose가 미치는 영향을 조사해본 결과 sucrose의 농도가 높을 수록 효소의 불활성을 효과적으로 방어

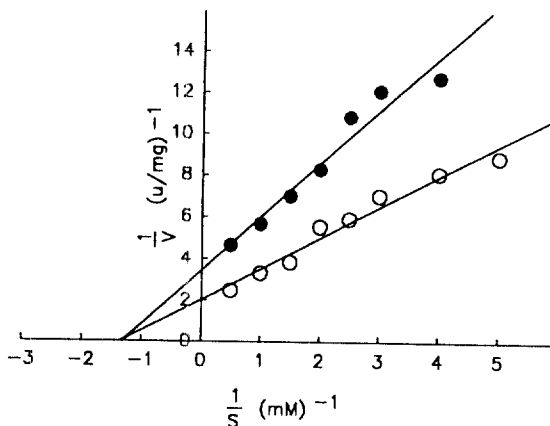


Fig. 9. Lineweaver-Burk plots of intracellular fructosyl transferase.

The reaction was carried out for 20 min with varying concentration of substrate in 0.1 M sodium citrate buffer (pH 5.5) at 55°C.

○—○: no NBS. ●—●: added NBS

하였다(Fig. 6). 또한 tyrosine reagent인 iodine에 의하여 효소의 활성이 억제되었는데, NBS에 의한 억제보다 느리게 그리고 높은 농도에 의하여 효소 활성이 억제되었다(Fig. 7). Iodine에 의한 효소의 불활성화도 sucrose에 의하여 보호되었다(Fig. 8). NBS에 의하여 변형된 효소의 기질 반응 속도를 알아보기 위하여 효소의 변형 후 Sephadex G-15를 이용한 gel filtration을 통하여 미반응의 NBS를 제거하였다. 원 효소와 NBS로 변형된 효소의 Lineweaver-Burk plots는 Fig.9와 같다. NBS에 의하여 변형된 효소의 Vmax는 원 효소와 다르게 나타났다. Km치는 7.4×10^{-4} M로 동일하였다. 따라서 NBS처리에 의하여 기질에 대한 친화력이 변한 부분적으로 불활성화된 효소는 생성되지 않는 것으로 판단된다. 화학수식제의 처리 결과 이 효소의 활성 부위나 그 근처에 tryptophan과 tyrosine이 위치하고 있으리라 생각되며 특히 tryptophan이 효소활성에 중요한 역할을 할 것으로 추측된다.

적 요

Aureobasidium pullulans C-23이 생산하는 세포의 fructosyl transferase의 특성에 대하여 조사해 보았다. 순수 분리된 효소의 분자량은 170,000 정도이었고, pI는 3.7 이었다. 이 효소는 5 mM Hg²⁺에 의하여 활성이 거의 완전히 억제되었다. 화학수식제의 처리 결과 tryptophan-specific reagent인 NBS와 tyrosine-specific reagent인 iodine에 의하여 효소활성이 저해되었고, iodine에 의한 저해는 비가역적 저해양상을 보였다. 효소의 기질인 sucrose는 이들 시약에 의한 효소의 불활성화에 대한 방어효과를 나타내었다. Tryptophan과 tyrosine이 효소의 활성부위에 직접 관여하거나 활성부위 근처에 위치하고 있는 것으로 생각되며 특히 tryptophan이 효소활성에 중요한 역할을 하는 것으로 추측된다.

참고문헌

1. **Bealing, F.J.**, 1953. Mould Glucosaccharase: a fructosidase. *Biochem. J.* **55**, 93-101.
2. **Cho, W.T., J.Y. Lim and S.S. Lee**, 1990. Isolation and identification of the black yeast producing fructosyl transferase. *Kor. J. Mycol.* **18**, 20-25.
3. **Cho, W.T. and J.Y. Lim**, 1990. Optimum culture condition for production of fructosyl transferase by *Aureobasidium pullulans* C-23. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.* **18**, 417-422.
4. **Dickerson, A.G.**, 1972. A β -D-fructofuranosidase from *Claviceps purpurea*. *Biochem. J.* **129**, 263-272.
5. **Edelman, J.**, 1954. Transfer reactions catalysed by some sucrose preparations. *Biochem. J.* **57**, 22-33.
6. **Edelman J. and Jefford, T.G.**, 1966. The metabolism of fructose polymers in plants. *Biochem. J.* **98**, 787-794
7. **Gupta, A.K. and Bhatia I.S.**, 1980. Glucofructosan biosynthesis in *Fusarium oxysporum*. *Phytochem.* **19**, 2557-2563.
8. **Gupta, A.K. and Bhatia I.S.**, 1982. Glucofructosan biosynthesis in *Fusarium oxysporum*. *Phytochem.* **21**, 1249-1253.
9. **Hankin, L. and McIntype, J.L.**, 1977. Production of kestose (fructosyl sucroses) by *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**, 522-524.
10. **Jung, K.H., J.Y. Lim, S.J. Yoo, J.H. Lee and M.Y. Yoo**, 1987. Production of fructosyl transferase from *Aureobasidium pullulans*. *Biotechnol. Lett.* **9**, 703-708.
11. **Jung, K.H., J.W. Yun, K.R. Kang, J.Y. Lim and J.H. Lee**, 1989. A mathematical model for enzymatic reaction of fructo-oligosaccharides from sucrose. *Enzyme Microb. Technol.* **11**, 491-494.
12. **Lee, K.J., W.T. Cho, Y.S. Chang, and J.Y. Lim**, 1991. Purification and immobilization of extracellular fructosyl-transferase from *Aureobasidium pullulans* C-23. *Genetic Engineering Research.* **5**, 27-38.
13. **Laemmli, U.K.**, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**, 680-685.
14. **Lowry, O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J.**, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **153**, 265-275.
15. **Nelson, N.**, 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* **153**, 375.
16. **Oku, T., Tokunaga, T. and Hosoya, N.**, 1984. Nondigestibility of a new sweetener, "Neosugar", in the rat. *J. Nutr.* **114**, 1574-1581.
17. **Pazur, J.H.**, 1952. Transfructosidation reactions of an enzyme of *Aspergillus oryzae*. *J. Biol. Chem.* **199**, 217-225.
18. **Robert J. H. and Darbyshire B.**, 1980. Fructan synthesis in onion. *Phytochem.* **19**, 1017-1020.
19. **Sato S., Koga T. and Inoue M.**, 1984. Isolation and some properties of extracellular D-fructosyltransferases from *Streptococcus mutans* serotype C.E. and F. *Carbohydrate Res.* **134**, 293-304.
20. **Shiomi, N., Yamada, J. and Izawa, M.**, 1976. Isolation and identification of fructo-oligosaccharides in roots of asparagus. *Agric. Biol. Chem.* **40**, 567-575.
21. **Shiomi, N., Yamada, J. and Izawa, M.**, 1979. Synthesis of several fructo-oligosaccharides by asparagus fructosyltransferases. *Agric. Biol. Chem.* **43**, 2233-2244.
22. **Smith, J.A., Grove, D., Luenser, S.J. and Park, L.G.**, 1982. Process for the production of fructosyl transferase enzyme. *US Patent* **4**, 309,505.
23. **Wenham, D.G., Hennessey T.D. and Cole J.A.**, 1979. Regulation of glucosyl- and fructosyltransferase synthesis by continuous cultures of *Streptococcus mutans*. *J. Gen. Microbiol.* **114**, 117-124.
24. **Yoovidhya T., Combes D., and Monsan P.**, 1986. Kinetics and thermal stability studies of rulactine. *Biotechnol. Lett.* **8**, 333-338.
25. **Yun, J.W., Jung, K.H., Oh, J.W. and Lee, J.H.**, 1989. Semibatch production of fructo-oligosaccharides from sucrose by immobilized cells of *Aureobasidium pullulans*. *J. Inst. Biotechnol.* **1**, 16-21

(Received October 4, 1991)

(Accepted November 1, 1991)