

Endo- 및 Exo-Inulinase를 이용한 Inulin 가수분해

박선규 · 최용진 *

고려대학교 농과대학 유전공학과

Hydrolysis of Inulin by Endo- and Exo-Inulinase

Park, Sun-Gyoo and Yong-Jin Choi *

Department of Genetic Engineering, College of Agriculture,
Korea University, Seoul 136-701, Korea

Abstract— Inulin degradation was examined using partially purified enzyme mixtures of the Exo-inulinase from a *Bacillus* spp. and the Endo-inulinase from a *Pseudomonas* spp.. The highest synergistic action of the two enzymes was observed when the Exo- and the Endo-inulinase were mixed at the ratio of 1 to 13, and the rate of hydrolysis of the above process was enhanced approximately 1.6 times higher than that of the reaction catalysed with a single enzyme of the same units. The enzyme mixture showed the maximal activity at pH 6.0 and 55°C, and in the presence of 0.5 mM each of Co^{2+} and Mn^{2+} . Under the optimal condition described above, fructose was accumulated with the overall concentration of 84% after 36 hours of the reaction.

Inulin 가수분해를 촉매하는 효소인 inulinase는 각종 식물과 미생물 등 자연에 널리 분포되어 있으며(1-7) 기질특이성과 효소작용 양식에 따라 Endo-acting, β -2,1-fructan-fructanohydrolase(EC 3.2.1.7)와 Exo-acting β -D-fructofuranosidase(EC 3.2.1.26)의 두 종류로 대별될 수 있다(8,9). Endo-inulinase에 의한 inulin 분해는 반응이 진행됨에 따라 다량의 fructose oligomer를 생산, 자신의 기질농도는 점차적으로 감소시키나 Exo-inulinase의 기질량은 오히려 증가시키는 효과를 가져온다. 이에 반해 Exo-inulinase는 반응이 진행되더라도 자신의 기질농도에는 큰 변화를 주지 않으면서 Endo-inulinase의 기질이 되는 분자수를 현저히 감소시키는 결과를 가져온다(8). 따라서 기질작용 특성이 달라 상기와 같이 서로 다른 가수분해 효과를 나타내는 두 효소의 혼합이용은 반응조건에 따라 높은 가수분해 상승효과(synergistic effect)를 얻을 수 있으리라고 기대된다. 그러므로 본 연구에서는 inulin의 효율적인 가수분해 공정을 개발

하므로서 fructose를 경제적으로 대량생산하기 위한 연구의 일환으로 본 연구실에서 분리, 동정한 세균이 생산하는 Endo-inulinase(10)와 Exo-inulinase(11)를 혼합 이용하여 가장 효율적인 가수분해 조건을 조사, 분석하였다.

재료 및 방법

시약

Inulin과 3,5-dinitrosalicylic acid 등을 비롯한 대다수의 시약은 Sigma 제품, 1-kestose, nystose 및 frutofuranosyl nystose는 명치제약 제품(일본), 기타 일반 시약류는 시판 1등급 이상 분석용 시약을 사용하였다.

효소액 조제

본 연구실에서 분리, 동정한 *Pseudomonas* spp.(10)와 *Bacillus* spp.(11)를 각각 Endo-inulinase 및 Exo-inulinase 생산균주로 사용하였다. 즉, *Pseudomonas* spp.를 효소생산 최적배지에 접종, 약 60시간 진탕배양하여 얻은 조효소액을 ammonium sulfate(70%)로

Key words: Inulin degradation, Exo-inulinase, Endo-inulinase, Synergistic effect

*Corresponding author

침전, 분리 후 0.01 M acetate buffer(pH 5.5)로 투석한 다음 사용하였다(12). *Bacillus* spp.는 42시간 전탕배양하여 얻은 조효소액을 ammonium sulfate(60%)로 침전, 분리 후 0.01 M phosphate buffer(pH 6.5)로 투석한 다음 사용하였다(11).

효소활성 측정

효소활성은 inulin 가수분해에 의해 생산되는 환원당을 DNS법(13)으로 측정, 1분간에 1 μmol의 환원당(fructose로 환산)을 생산하는 효소량을 1단위로 표시하였다.

분해산물 분석

효소반응 생성물은 다음과 같은 조건에서 HPLC를 이용하여 분석하였다(14).

Pump ; Waters Model 510

Detector ; RI(R401)

Integrator ; Waters Model 741

Column ; Carbohydrate analysis column(3.9×300 mm)

Mobile phase ; Acetonitrile : Water mixture(75 : 25, v/v)

Flow rate ; 2 ml/min

결과 및 고찰

Exo- 및 Endo-inulinase의 기질특이성

Bacillus spp.가 생산하는 Exo-inulinase는 Table

Table 1. Substrate specificity of the exo-inulinase

Substrate	Relative activity (%)
Inulin	100
Sucrose (GF)	470
1-Kestose (GF ₂)	287
Nystose (GF ₃)	241
Fructofuranosyl	
Nystose (GF ₁)	217
Levan (β-2,6-fructan)	0
Melezitose	
(glc α1-3fru β2-1aglc)	0

The concentration of each substrate was 1%. The obtained results were compared with the hydrolysis rate of inulin.

1에 표시되어 있는 바와 같이, 기질로서 inulin보다는 오히려 분자크기가 작은 각종 fructose oligomer에 더욱 효과적으로 작용하며 특히, sucrose에 대해 매우 큰 활성을 보여 I/S값이 0.2에 가까운 수치를 보이고 있다. 그러나 levan과 melezitose에는 전혀 작용하지 않는 bond specificity를 가지고 있음을 알 수 있었다. 또한 Exo-inulinase에 의한 inulin 가수분해반응은 반응초기부터 어떤 형태의 fructose oligomer도 검출되지 않았으며 단지 fructose monomer만이 분석되었다. 그러므로 본 Exo-acting inulinase는 Basic exo-type mechanism이 아닌 Single-chain mechanism(15)에 의해 inulin 기질을 분해하고 있다고 믿어진다(Fig. 1 참조). 이에 비해 Endo-inulinase는 Table 2와 같이 levan과 melezitose는 물론이고 한 분자의 glucose를 가진 dimer(sucrose), trimer(1-kestose) 및 tetramer(nystose)의 어느 것도 분해하지 않았다. 그러나 pentamer(fructofuranosyl nystose)는 분해, dimer 한 분자와 trimer 한 분자를 생산하였으며, 이때 생산된 dimer는 sucrose 분자인 것으로 확인되었다. 그러므로 *Pseudomonas* Endo-inulinase는 적어도 pentamer 이상의 크기를 가진 분자(말단에 1분자의 glucose가 결합되어 있는 fructose oligomer)만을 기질로 이용한다는 것을 알 수 있었다. 한편 inulin의 Endo-inulinase 분해생성물을 반응시간에 따라 분석

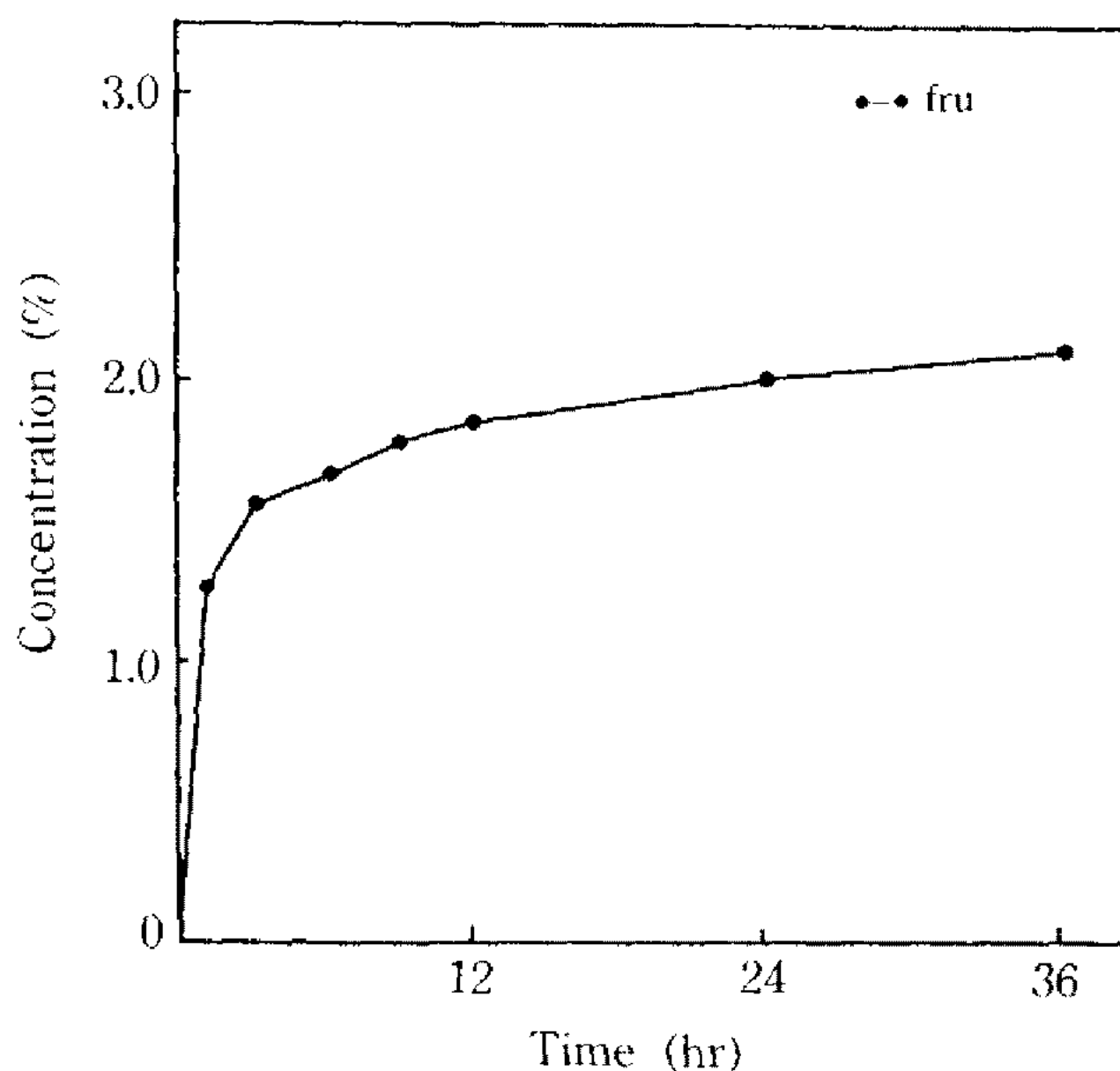


Fig. 1. Products of hydrolysis of inulin by the exo-inulinase.

The reaction was carried out in the presence of 2.5% inulin at 55C, pH 6.0 and 0.6 unit of enzyme was used.

Table 2. Substrate specificity of the endo-inulinase

Substrate	Products
Sucrose (GF)	-
1-Kestose (GF ₂)	-
Nystose (GF ₃)	-
Fructofuranosyl Nystose (GF ₄)	Disaccharide & Trisaccharide
Levan (β-2,6 fructan)	-
Melezitose (glc α1-3fruβ2-1αglc)	-

The reaction was carried out in the presence of 1% substrate at 55C and pH 6.0. The products were analysed by HPLC.

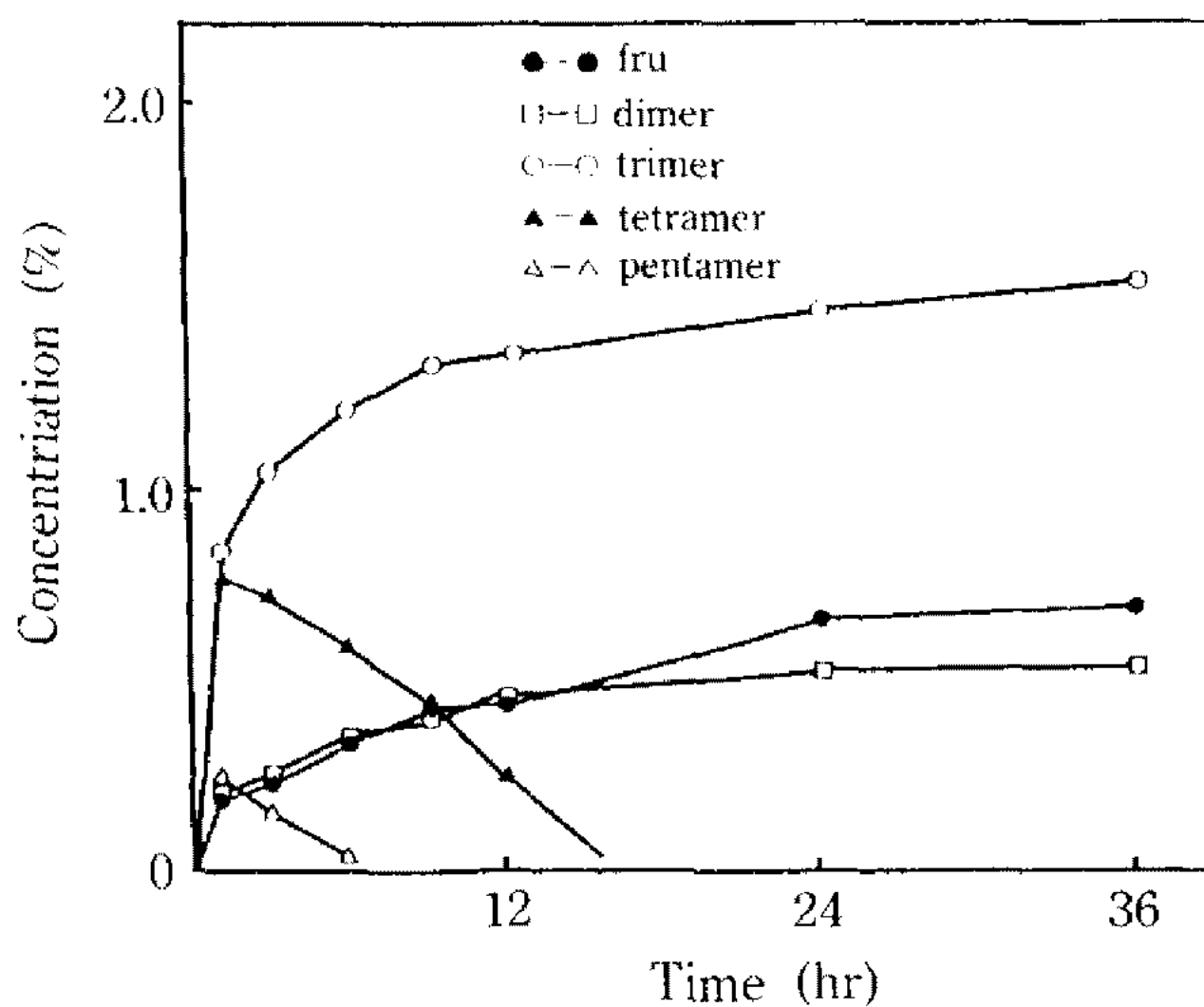


Fig. 2. Products of hydrolysis of inulin by the endo-inulinase.

The reaction was carried out in the presence of 2.5% inulin at 55C, pH 6.0 and 0.6 unit of enzyme was used.

해 본 결과 Fig.2와 같이 trimer와 dimer가 주반응 생성물이 되고 있음을 확인할 수 있었으며, 이와 같은 결과는 inulin의 Endo-inulinase 처리는 Exo-inulinase 기질농도의 현저한 증가로 표현할 수 있어(8) 두 효소의 적절한 혼합이용은 inulin 가수분해의 높은 상승효과를 가져올 수 있을 것으로 쉽게 예상할 수 있었다. 또한 반응초기에 다량생산되었던 tetramer 및 pentamer는 90분 가량의 반응시간이 지나면서 급격한 감소를 보였다. 이것은 주로 fructose만으로 구성된 이들 fructose oligomer가 Endo-inulinase에 의해 쉽게 2차 공격을 받아 더욱 분해되는 것으로 추측된다. 이상의 결과를 종합, 분석해 본 결과(Fig.3 참조) Endo-inulinase는 최소한 fructose 4분자 이상으로

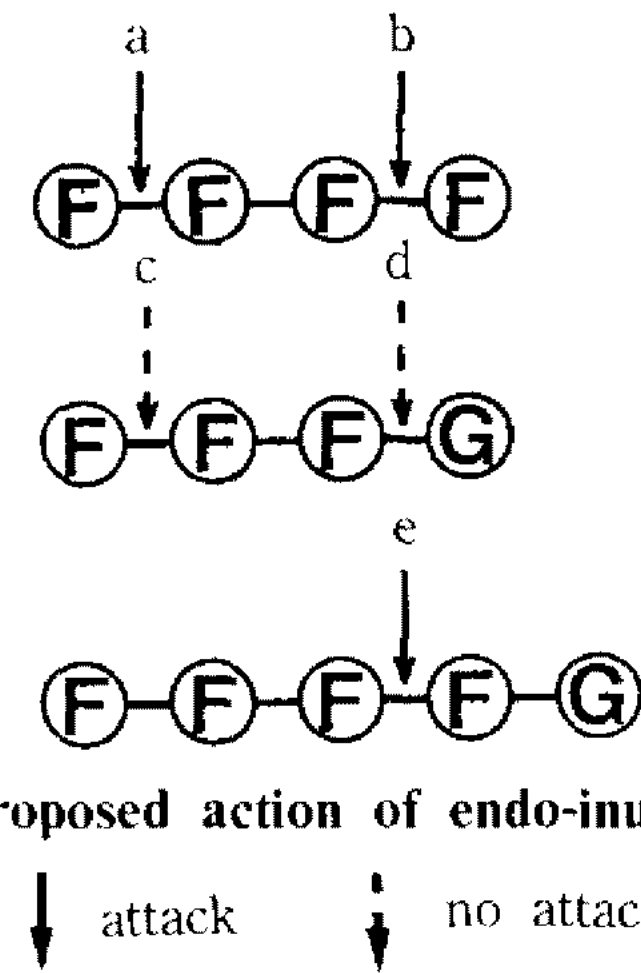


Fig. 3. A proposed action of endo-inulinase.

구성된 oligomer만을 분해할 수 있다는 것을 알 수 있었다. 즉, 본 Endo-inulinase는 glucose 한 분자가 결합된 tetramer는 c, d 어느 결합도 공격하지 못하나 같은 tetramer라도 fructose만으로 구성된 tetramer는 a나 혹은 b 위치의 결합을 절단, 한 분자의 fructose와 한 분자의 fructose trimer를 생산하는 것으로 추측되며 pentamer 기질은 e 위치의 결합을 절단, sucrose 한 분자와 trimer 한 분자를 생산하는 것으로 판단 된다.

효소 혼합비에 따른 가수분해 상승효과

Exo-inulinase와 Endo-inulinase의 혼합이용은 과연 가수분해율의 상승효과가 있으며, 또 효과가 있다면 어떤 혼합비율이 가장 높은 상승효과를 나타낼 것인가를 알아보기 위하여 효소혼합 이외 기타 다른 반응제한 조건이 없는 상태에서 두 효소를 혼합사용해 본 결과 Fig.4와 같이 기질분해의 뚜렷한 상승효과가 있음을 인정할 수 있었다. 또한 이와 같은 상승효과는 효소 혼합비율에 큰 영향을 받는 것으로 나타났다. Exo와 Endo-inulinase의 혼합비율이 약 1:13일 때 가장 높은 상승효과를 얻었으며 이 때 기질분해율은 두 효소를 단독 사용하였을 때에 비해 약 1.6배의 증가를 가져왔다.

기질농도의 영향

4.5 mU Exo-inulinase와 56 mU Endo-inulinase를 혼합, 첨가한 효소반응액 중의 inulin 양을 달리하여 효소활성에 미치는 기질농도의 영향을 조사해 본 결과 Fig.5에서 보는 바와 같이 inulin 농도 3%까지는 기질분해율의 급격한 증가를 보였으나, 그 이상의 농도에서는 분해율의 증가세가 크게 둔화되며 5% 전

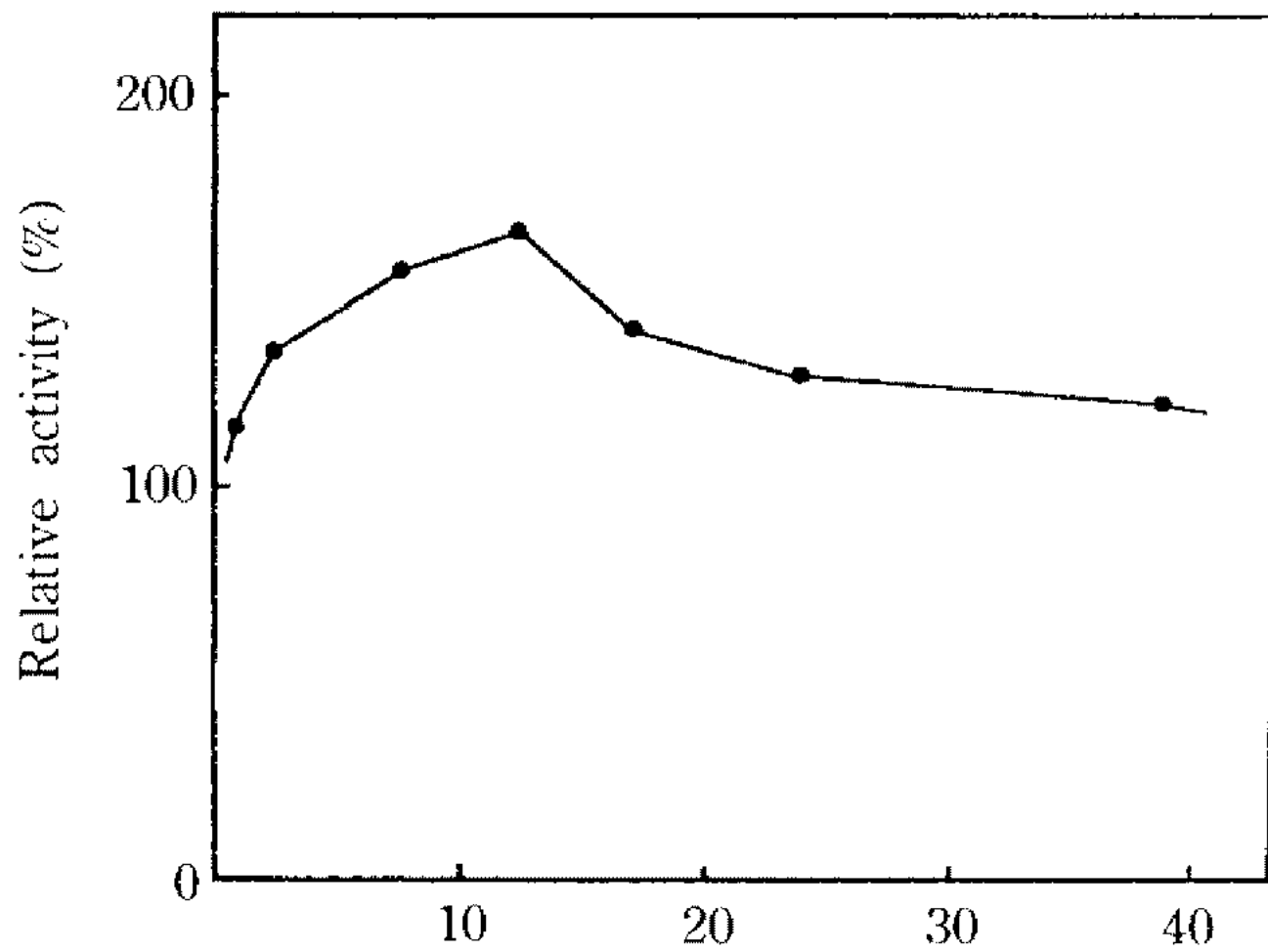


Fig. 4 Endo-inulinase units/Exo-inulinase 1 unit.
The reaction was carried out in the presence of 1% inulin at 55°C and pH 6.0.

Table 3. Effects of temperature & pH on the activities of the inulinase

	Endo-inulinase	Exo-inulinase		Mixture of enzymes
		inulinase	invertase	
Optimum temperature	55°C	50°C	50~55°C	55°C
Optimum pH	6.0	6.0	6.5	6.0

The reaction was carried out in the presence of 1% inulin.

Table 4. Effects of metal ions on the inulinase activities

Metal ions	Endo-inulinase	Exo-inulinase		Mixture of enzymes
		inulinase	invertase	
None	100	100	100	160
Co ²⁺	161	163	139	167
Mn ²⁺	81	147	145	194
Mg ²⁺	91	104	104	130
Na ⁺	91	106	96	116
Mn ²⁺ + Co ²⁺	—	—	—	210

The enzyme solutions were preincubated in the presence of each metal ion (0.5 mM) for 1 hr at 37°C before activity measurement and were incubated at 55°C for 30 min. after the addition of equal volume of 2% inulin (pH 6.0)

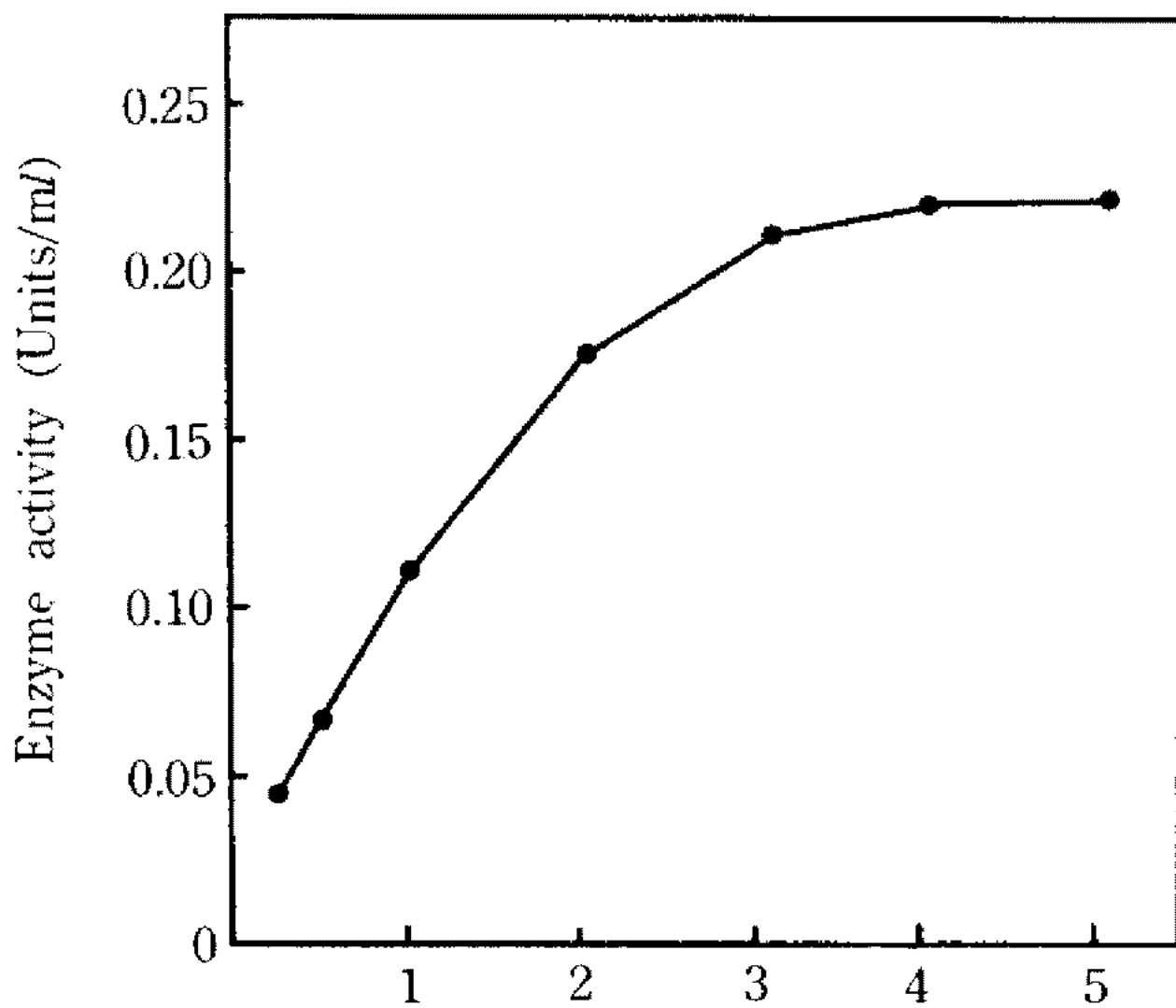


Fig. 5. Concentrations of inulin (%).
The reaction was carried out at 55°C and pH 6.0.

후의 기질농도에서 최대치의 분해율을 나타내었다.

온도와 pH의 영향

혼합효소를 이용한 inulin 가수분해반응의 최적온도와 최적 pH를 조사한 결과 각각 55°C와 pH 6.0에서 가장 높은 효소활성이 측정되었다. 이와 같은 결과는 Table 3에 표시되어 있는 바와 같이 Exo- 및 Endo-inulinase 각각의 효소활성 최적조건과 큰 차이가 없었다. 사용 완충용액 종류에 따른 효과 역시 뚜렷한 유의차는 없었으나 그 중에서 McIlvaine buffer(citrate-phosphate buffer)가 비교적 효과적이었다(별도 자료제공은 하지 않았음).

금속이온의 효과

Exo-와 Endo-inulinase 혼합효소 활성화에 미치는 금속이온의 효과를 조사, 단독효소에 대한 효과와 비교해 본 결과 Table 4와 같이 Exo-와 Endo-inulinase에 다같이 매우 높은 활성화 효과를 보였던 Co²⁺ 이온(11, 16)이 혼합효소에 대해서는 뚜렷한 활성화 효과를 나타내지 않았다. 이에 반해 Endo-inulinase에 대해서는 약간의 저해효과를 보였으나 Exo-inulinase에는 오히려 약 50% 정도의 활성화 효과를 보였던 Mn²⁺ 이온의 경우, 혼합효소 활성을 약 94% 증가시켜주는 매우 흥미있는 결과를 나타내었다. 이와 같은 결과는 Endo-inulinase에 의해 분해 생산된 각종 fructose oligomer가 Exo-inulinase의 기질이 되며 이때 Mn²⁺ 첨가는 Exo-inulinase 활성을 더욱 증가시키는 효과 때문이라고 추측된다. 한편, Mn²⁺ 이온과 Co²⁺ 이온의 동시 첨가는 누적적인 활성화 효과를 보여 각 이온을 0.5 mM 농도로 첨가했을 때 가장 높은 기질분해율을 나타내었다.

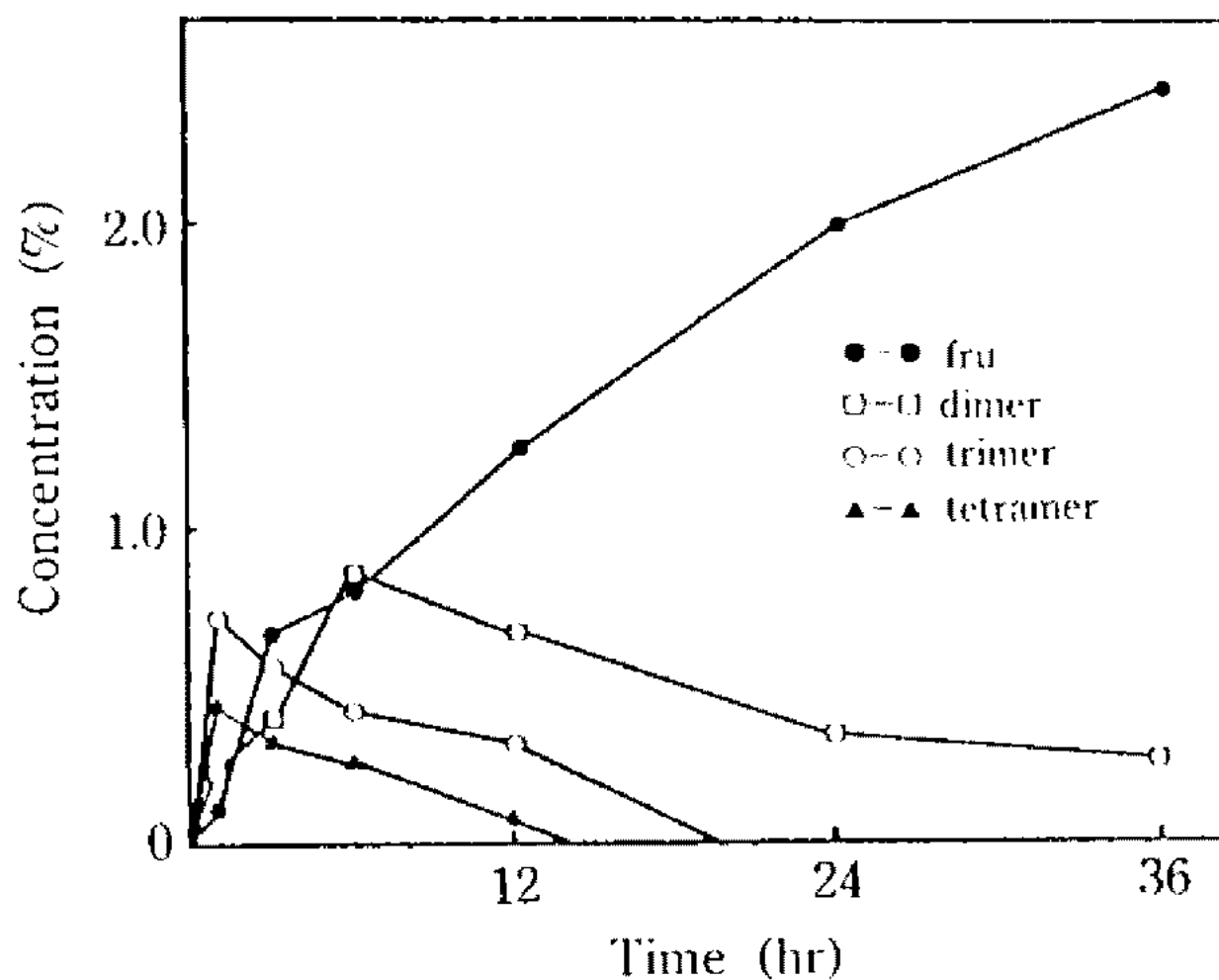


Fig. 6. Products of hydrolysis of inulin by the endo- & exo-inulinase

The reaction was carried out in the presence of 2.5% inulin at 55°C, pH 6.0 and used the mixture of 0.042 unit of exo-inulinase and 0.56 unit of endo-inulinase.

Inulin 분해생성물의 경시적 분석

Fig. 6은 Exo-와 Endo-inulinase 혼합효소를 이용한 inulin 가수분해반응의 반응생성물을 반응시간에 따라 분석한 결과이다. 반응개시와 더불어 trimer와 tetramer 생산은 급격한 증가를 보이다가 반응 약 90분 이후부터는 서서히 감소, 15시간 전후에는 거의 완전분해, 제거되는 경향을 보였다. 이와 같은 inulin 가수분해반응 양상은 효소혼합에 의한 가수분해율의 상승효과를 잘 설명해주는 결과라고 하겠다. 이에 비해 dimer 형태의 반응생물은 반응 6시간까지는 증가를 보이다가 그 이후부터는 점차 감소되고 있으나 반응 36시간 이후에도 상당량 잔존하고 있었다. 이와 같은 결과는 최종산물인 fructose의 다량 축적에 의한 Exo-inulinase의 활성저해에 일부 원인이 있는 것으로 추측된다. 그러나 최종 분해산물인 fructose 생산량은 꾸준히 증가, 반응 36시간째에 약 84% 최종 생산량을 보였다. 이상 Exo-와 Endo-inulinase의 혼합효소를 이용한 몇 가지 inulin 가수분해 실험결과를 종합, 분석해 본 결과 혼합효소에 의한 inulin 가수분해공정은 앞으로 많은 연구를 요하는 가능성 높은 공정이라는 결론을 얻을 수 있었다.

요 약

부분 정제된 *Pseudomonas* spp. Endo-inulinase와 *Bacillus* spp. Exo-inulinase를 13 : 1의 비율로 혼합

사용하여 inulin을 가수분해한 결과, 단독으로 사용했을 때에 비해 약 1.6배의 향상된 가수분해율의 상승효과를 얻었다. 혼합효소는 반응온도 55°C, 반응액의 pH 6.0 및 각 0.5 mM 농도의 Mn^{2+} 와 Co^{2+} 이 존재하는 반응조건하에서 가장 높은 가수분해율을 보였으며 이 때 최종 가수분해 산물인 fructose의 생산량은 84%를 나타내었다.

감사의 말

본 연구는 한국과학재단의 목적기초연구비로 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

- Vandamme E. J. and D. G. Derycke: *Adv. Appl. Microb.*, **29**, 139 (1983).
- J. W. D. Groot Wassink and S. E. Fleming: *Enzyme Microb. Technol.* **2**, 45 (1980).
- 김기철 : 한국농화학회지, **18**(3), 177(1975).
- Kim, W. Y., S. M. Byun and B. H. Nahm: *Korean J. Food Sci. Technol.*, **11**(4), 283 (1979).
- Irene Efstathiou, Gilles Reysset and Nicole Truffaut: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 143 (1986).
- Ph. Looten, D. Blanchet, and J. P. Vandecasteele: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 419 (1987).
- Anil K. Gupta, Bela Nagpal, Narinder Kaur and Rangil Singh: *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **42**, 69 (1988).
- Rosa Azhari, Alda M. Szlak, Ehud Ilan, Samuel Sideman, and Noah Lotan: *Biotech. and Appl. Biochem.* **11**, 105 (1989).
- Moussa Ettalibi and Jacques C. Baratti: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **26**, 13 (1987).
- Lee, T. K., H. C. sung, Y. J. Choi, and H. C. Yang: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **15**, 176 (1987).
- 김경남 : 고려대학교 석사학위논문(1989).
- Lee, T. K., Y. J. Choi, and H. C. Yang: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **16**, 259 (1988).
- Miller, G. L., Blum, R., Glennon, W. E., and Burton, A. L.: *Anal. Biochem.* **2**, 127 (1960).
- W. Praznik and R. H. F. Beck: *J. Chromatography*, **303**, 417 (1984).
- H. E. Snyder and H. J. Phaff: *J. Biol. Chem.* **237**, 2438 (1962).
- Lee, T.K., H.C. Shin, Y.J. Choi, and H.C. Yang: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **16**, 484 (1988).

(Received November 12, 1991)