

Aspergillus ficuum 조효소액으로부터 Exoinulinase의 정제 및 특성

한상배¹ · 송근섭¹ · 유향숙² · 노민환³ · 이태규³
손희숙⁴ · 우순자⁴ · 엄태봉^{1*}

¹전북대학교 식품공학과, ²가정교육과,

³전주우석대학교 식품공학과, ⁴고려대학교 식품공학과

Purification and Properties of *Aspergillus ficuum* exoinulinase

Han, Sang-Bae¹, Geun-Seoup Song¹, Hyang-Suk Ryu², Min-Whan Rho³
Tae-Kyoo Lee³, Hee-Suk Sohn⁴, Soon-Ja Woo⁴ and Tai-Boong Uhm^{1*}

¹Department of Food Science & Technology and

²Department of Home Economics, Chonbuk National University, Chonju 560-756, Korea

³Department of Food Science & Technology, Chonju Woosuk University, Samrye-Eub 565-800, Korea

⁴Department of Food Technology, Korea University, Seoul 136-701, Korea

Abstract — An exoinulinase (EC 3.2.1.80) was purified from a commercial inulinase preparation from *Aspergillus ficuum* using ion exchange chromatography on CM-Sephadex C-50 and DEAE-Sephadex 6B and HPLC gel filtration on a Protein Pak 125 column. Native exoinulinase had a molecular weight of $83,000 \pm 1,000$ and was glycoprotein. Optimal pHs of the enzyme were ranged from 4.4 to 4.7. About ninety five percent of the whole activity was maintained even after incubation of 8 hours at 55°C. The enzyme was a typical non-specific β -fructofuranosidase, of which I/S ratio appears to be 0.35.

농산물의 효율적인 생산이용 측면에서 돼지감자는 한때 효모에 의한 알코올 생산가능 작물로서 그 관심이 고조되었었다. 돼지감자는 단위면적당 탄수화물 생산량이 옥수수나 감자와 비슷하고 또한 그 탄수화물이 이눌린이라는 과당의 중합체로 이루어져 있기 때문에 돼지감자는 잠재적인 과당 생산작물로 여겨진다. 현재 생산되고 있는 과당은 glucose isomerase를 이용한 전화당공법으로 만들어지나 이 과정은 다소 복잡하다. 그러나, 이눌린은 과당의 중합체이므로 이눌린을 분해할 수 있는 효소의 처리에 의해 한 번의 공정으로 고품위 과당시럽을 얻을 수 있는 이 점이 있다. 더구나 최근에 이눌린 사슬을 random하게 자를 수 있는 endoinulinase가 곰팡이에서 발견됨에 따라 이눌린의 가수분해효은 exoinulinase와 함께 사용했을 경우 거의 10배 가까이 증가될 수 있음이

보고되었다(1). 또한 열에 안정한 exoinulinase가 *Aspergillus*속에서 분리됨에 따라 이눌린으로부터 산업적으로 과당 생산 가능성이 높아졌다(2).

Inulinase를 분비하는 미생물 중 *Aspergillus ficuum*은 endo-와 exoinulinase를 같이 생산하여 과당생산의 산업적 이용가능성이 높은 미생물로 알려져 있다(1). 이에 우리는 덴마크 Novo 회사로부터 이 미생물이 생산하는 조효소를 얻어 그것으로부터 exoinulinase의 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

재료

*Aspergillus ficuum*으로부터 생산된 조효소액은 덴마크 Novo A/S의 Dr. S. Perderson으로부터 얻었는데 이 효소액은 endo- 및 exoinulinase, protease, cellulase, fructosyltransferase의 효소 등을 함유하고

Key words: inulinase, inulin, *Aspergillus ficuum*

*Corresponding author

있었다.

이 실험에서 사용한 모든 시약은 상업적으로 이용할 수 있는 특급이었다.

효소활성의 측정 및 단백질량 분석

효소활성은 50°C에서 5% 이눌린을 5분간 반응시킨 뒤 생성되는 환원당을 Dinitrosalicylic acid 방법(3)을 이용하여 측정하였다. 자세한 활성측정 방법은 Uhm 등(4)의 방법에 준하였다. Inulinase에 대한 1 unit는 1분당 위 조건하에서 환원당 1 μmol 을 생성할 수 있는 효소의 양으로서 정하였다. Invertase 활성은 50°C에서 5% sucrose를 30분간 반응시킨 뒤 생성되는 환원당을 측정하였다. Invertase에 대한 1 unit는 1분당 위 조건하에서 sucrose 1 μmol 을 분해할 수 있는 효소의 양으로 정하였다. 단백질은 Bradford method(5)에 준하여 그 양을 결정하였다.

효소정제

*Aspergillus ficuum*의 조효소액은 많은 염을 포함하고 있었기 때문에 1 cc씩 5번 Sephadex G-25(1.5×5 cm) column을 통해 desalting을 하였다. Fraction의 앞부분만을 모은 뒤 미리 0.05 M Na-acetate, buffer pH 4.1로 평형화시킨 CM Sephadex C-50(2.5×12 cm) column에 주입하였다. 이 buffer를 이용하여 분당 2 ml의 유속으로 100 ml를 씻어 준 후에 0.7 M NaCl을 이용 linear gradient를 걸어주었다. 약 0.35 M NaCl gradient에서 나오기 시작하는 exoinulinase의 활성 peak를 모아 Amicon concentrator에서 ultrafiltration(M.W. cut-off 30,000)을 하면서 완충액 교환 및 농축을 하였다. 그 후 0.01 M phosphate buffer, pH 7.0으로 미리 평형화시켜 놓은 DEAE Sepharose 6B column(2.5×12 cm)에 윗 농축액을 주입한 뒤 0.5 M KCl을 이용하여 분당 2 ml의 유속으로 linear gradient를 걸어주었다. 여기서 분리된 한 활성 peak를 모아 다시 완충액 교환과 탈염 농축을 위해 ultrafiltration(M.W. cut-off 30,000)을 하였다. 여기서 얻은 농축액은 Protein Pak 125 sw(Waters, 0.8×30 cm) column을 이용 HPLC gel filtration을 하였다. 이 때 elution buffer는 0.01 M phosphate buffer, pH 7.0에 0.1 M NaCl이 함유되어 있었으며 유속은 0.5 ml/min이었다. 여기서 단지 한 개의 활성 peak가 얻어졌으며 이 활성 peaks는 4°C 냉장고에서 다음 실험을

위해 보관되었다.

전기영동

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)는 Laemmli method(6)에 준하여 행하였다. SDS-PAGE에 의한 exoinulinase의 분자량은 표준 단백질(Bio-Rad)의 그것과 비교함으로써 결정되었다.

Gel filtration에 의한 분자량 결정

Native 상태의 exoinulinase 분자량은 Protein Pak 300 sw(Waters, 0.8×30 cm) column을 이용 HPLC gel filtration을 행하였다. 이 때 elution buffer는 0.01 M phosphate buffer, pH 7.0에 0.1 M NaCl이 함유되어 있었으며 유속은 1 ml/min, 표준 단백질로는 ferritin(M.W. 440,000), aldolase(M.W. 158,000), bovine serum albumin(M.W. 67,000) 및 ovalbumin(M.W. 45,000)이 사용되었다.

Exoinulinase의 작용기작

정제된 exoinulinase 2 μg 을 1% 이눌린 450 μl 에 넣어 50°C에서 반응시킨 뒤 5, 10, 15분 간격으로 20 μl 를 뽑아 Waters Carbohydrate analysis column(0.39×30 cm)에 주입하였다. 이 때 flow rate는 2 ml/min이었으며 elution은 80% acetonitrile과 20% 증류수가 사용되었다. 위와 같은 조건으로 Refractive Index detector에서 검출되는 glucose, fructose, sucrose의 retention time은 각각 6.4 ± 0.2 , 5.5 ± 0.1 , 11.5 ± 0.1 분이었다.

결과 및 고찰

효소의 정제

Aspergillus ficuum 배양액을 한외여과 및 ammonium sulfate로 농축시킨 조효소액인 Novozyme 230을 CM-sephadex에서 ion exchange chromatography를 하였다(Fig. 1).

그 결과 sucrose나 이눌린을 분해할 수 있는 peak들이 3개 관측되었다(용출 순서로 I, II, III으로 명명), Peak I은 이눌린을 잘 분해하는 반면 sucrose는 거의 분해하지 않았으며 peak II는 sucrose만 분해하였고 이눌린은 분해하지 못하였다. Peak III는 sucrose와 이눌린을 동시에 잘 분해하였다(이눌린 분해속도/su-

crose 분해속도(I/S ratio)=0.35). 따라서 peak I은 endoinulinase, peak II는 fructosyltransferase나 invertase, peak III는 exoinulinase로 추정되었다. 즉, *Aspergillus ficuum*은 이눌린과 fructoside 결합을 가지는 당들을 효율적으로 분해하기 위하여 endoinulinase와 exoinulinase를 동시에 만들어내는 것 같다. Endoinulinase와 exoinulinase가 동시에 존재했을 때 이눌린 분해의 놀라운 synergistic effect를 고려해 본다면(1), 이 곰팡이는 자라는 동안 최대의 성장 및 번식을 위해 진화적으로 endo-와 exoinulinase의 동시

분해기구를 채택한 것 같다.

Peak III 분획을 모아 DEAE-sepharose 6B, HPLC Protein Pak 125 sw을 통한 정제과정을 거쳐 단백질 mg당 이눌린에서, $2,800 \pm 200$ U의 specific activity를 갖는 효소액을 얻을 수 있었다(Table 1).

분자량 측정 및 당의 함량 측정

이 효소는 SDS-PAGE를 한 결과 $77,000 \pm 3,000$ 의 주된 band와 $57,000 \pm 2,000$ 의 약한 band를 나타내었다(Fig. 2). 또한, HPLC gel filtration에 의한 native 상태에서 추정된 분자량은 $83,000 \pm 1,000$ 을 나타내었다. SDS-PAGE상의 두 bands는 periodic-Schiff's reagent(7)와 반응시켰을 때 둘다 carbohydrate를 함유하는 단백질임을 확인할 수 있었다(결과는 보이지 않음). 특히 두 bands는 동일한 양의 정제된 endoinulinase(22~24% 당함유)와 SDS-gel상에서 비교했을 때 훨씬 퍼진 bands를 보여주어 endoinulinase보다 더 많은 당을 함유하고 있으리라 생각된다. 지금의 결과로는 이 효소가 dimer로 이루어진 것인지 또는 불순물 때문에 두 bands로 나누어 졌는지는 확인하지 못하였다.

비교적으로 *Aspergillus niger*의 exoinulinase에서 조사된 당 함량은 32~34% 수준이었다(4). Exoinulinase에 존재하는 이러한 당이 어떠한 기능을 담당하는지는 정확히 모른다. 그러나 당단백질에서 당은 단백질의 안정성 또는 기질의 최적 결합을 위한 촉매 부위의 입체 구조적 배치에 중요한 역할을 할 수 있다고 생각된다. 실제로 우리는 *Aspergillus*의 endoinulinase에 endoglycosidase 처리를 하여 N-linked된 당을 제거했을 때 그들의 I/S ratio에 변화가 생기는 것을 발견했다(미발표 결과).

효소의 작용 모드

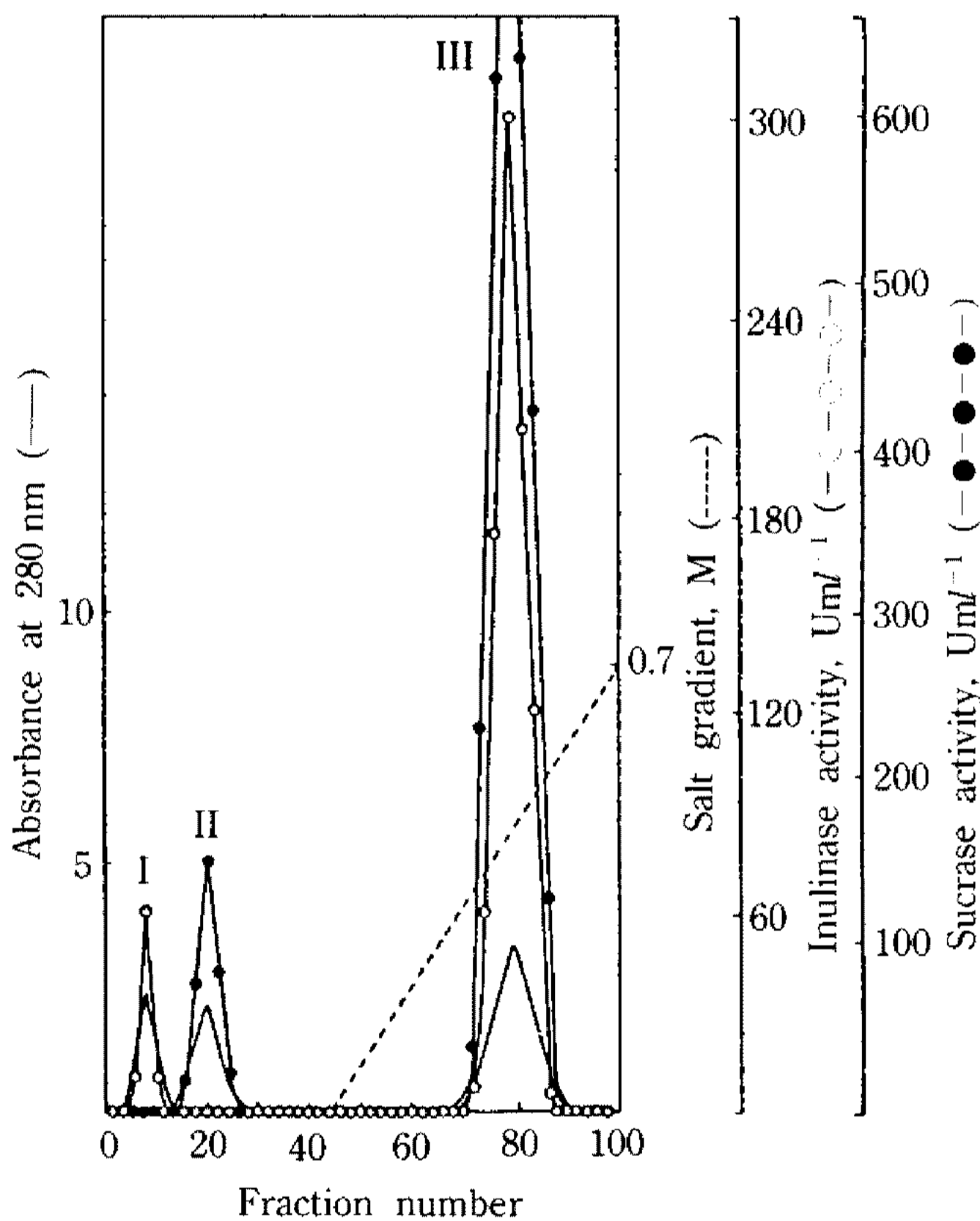


Fig. 1. CM-Sephadex C-50 chromatography of *Aspergillus ficuum* inulinases.

I. endoinulinase; II. fructosyltransferase or invertase; III. exoinulinase. Detailed procedures are described in the text.

Table 1. Summary of a typical purification of exoinulinase from *Aspergillus ficuum*

Step	Volume (ml)	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg protein)	Yield (%)
Crude extract	10	7,900	35.00	226	a
CM sephadex	35	5,950	7.00	850	100
DEAE sephadex	41	5,390	5.04	1,069	90
HPLC Gel column	8.5	3,604	1.27	2,838	61

a: We did not count the yield of exoinulinase because the extract contained both exo- and endoinulinase.

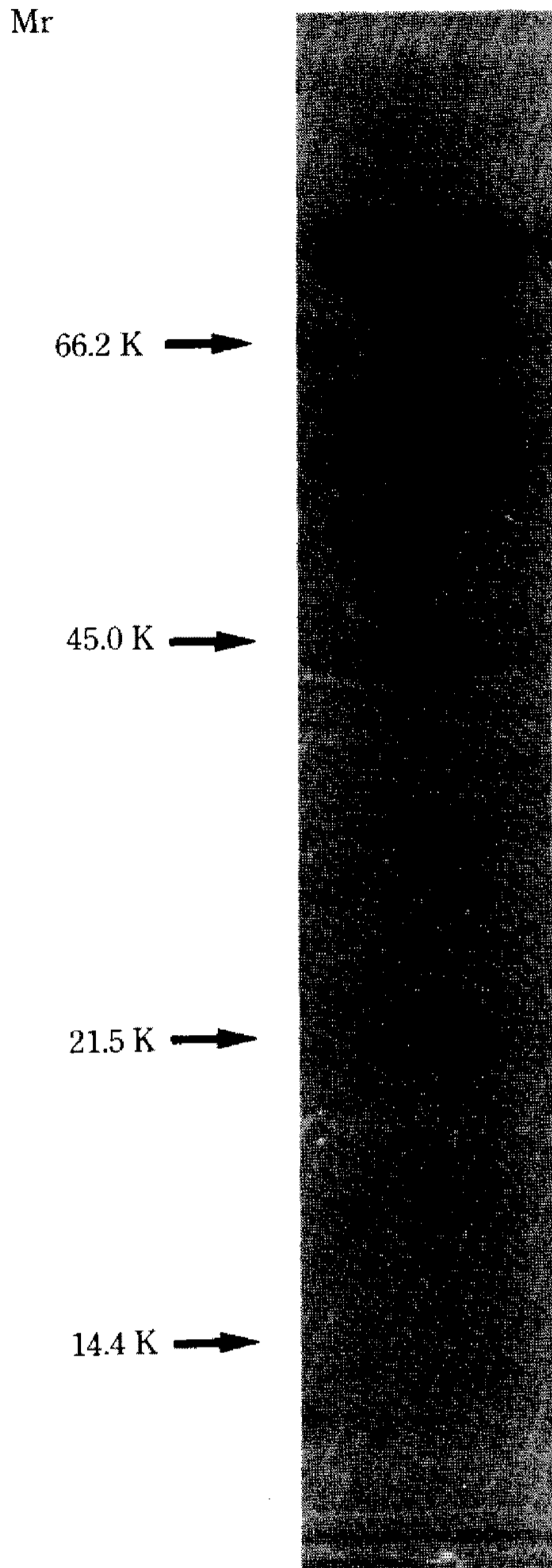


Fig. 2. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of *Aspergillus ficuum* exoinulinase (5 μ g) in 12.6% polyacrylamide gel.

이눌린 기질에 정제된 효소를 반응시킨 후 반응시간에 따른 fructose 양의 변화를 관찰함으로써 이 효소의 작용 mode를 추정하였다. 반응 초기에는 fructose만이 생성되었고 반응시간에 비례적으로 fructose의 양이 증가되었으나(Fig. 3), 반응시간의 증가에 따라 glucose도 생성되기 시작하였다. 이러한 결과는 exoinulinase의 반응 pattern으로서 이눌린의 말단으로부터 β -2,1-fructose unit를 하나씩 끊어 나가는 것을 의미한다.

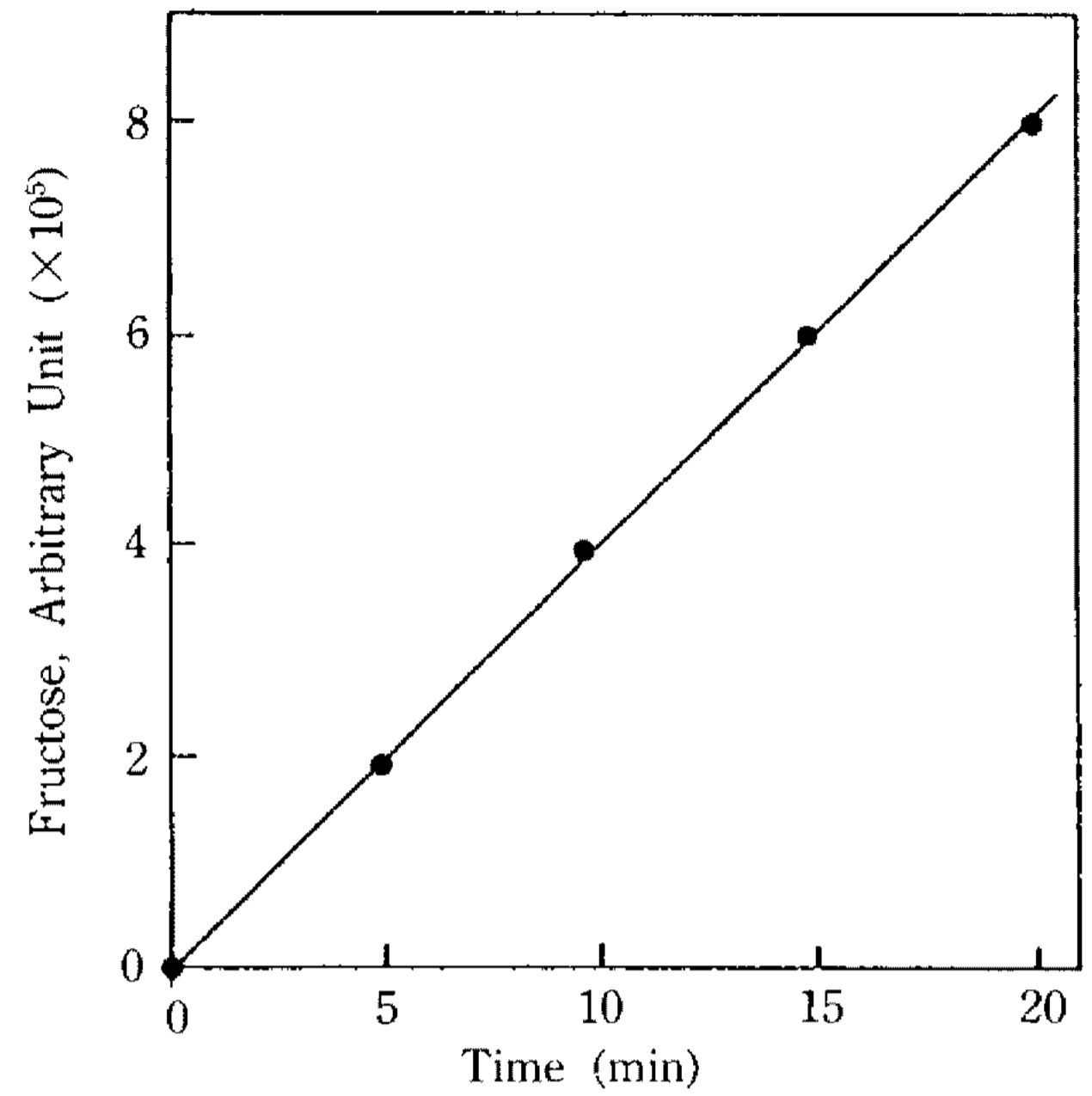


Fig. 3. Changes in fructose content during the hydrolysis of inulin (1.0%) by *Aspergillus ficuum* exoinulinase. Detailed procedures are described in the text.

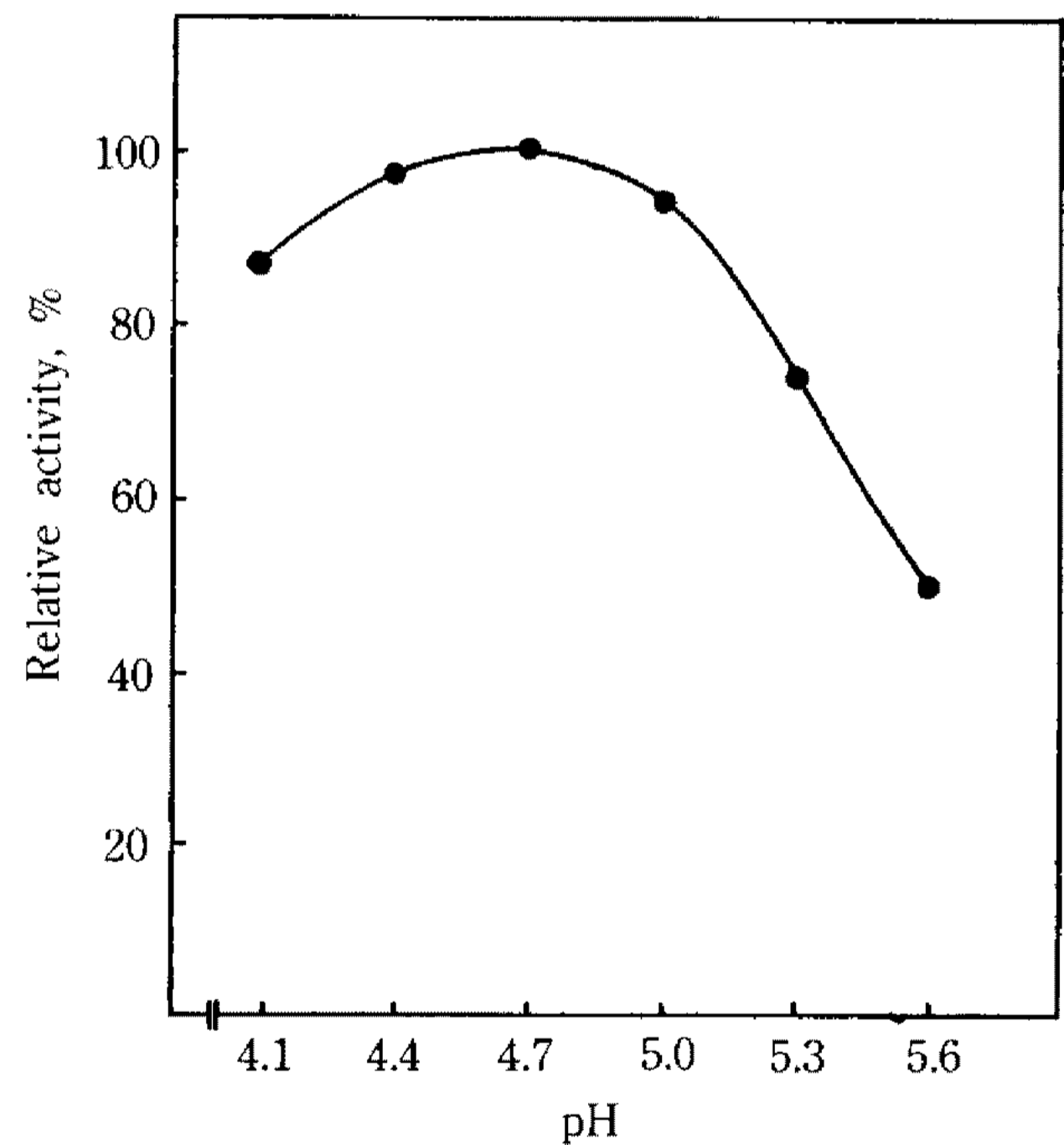


Fig. 4. Effect of pH on the activity of *Aspergillus ficuum* exoinulinase.

효소의 최적 pH

Exoinulinase의 최적 pH는 4.4~4.7 부근이었으며 pH 4.0에서도 그 활성은 약 87%를 보였다(Fig. 4). 그러나 pH가 5.3 및 5.6으로 증가함에 따라 각각 75% 및 50%로 감소하였다. 일반적으로 대부분의 효소 및 곰팡이의 inulinase에 대한 최적 pH는 4~5 부근으로 알려져 있다(8).

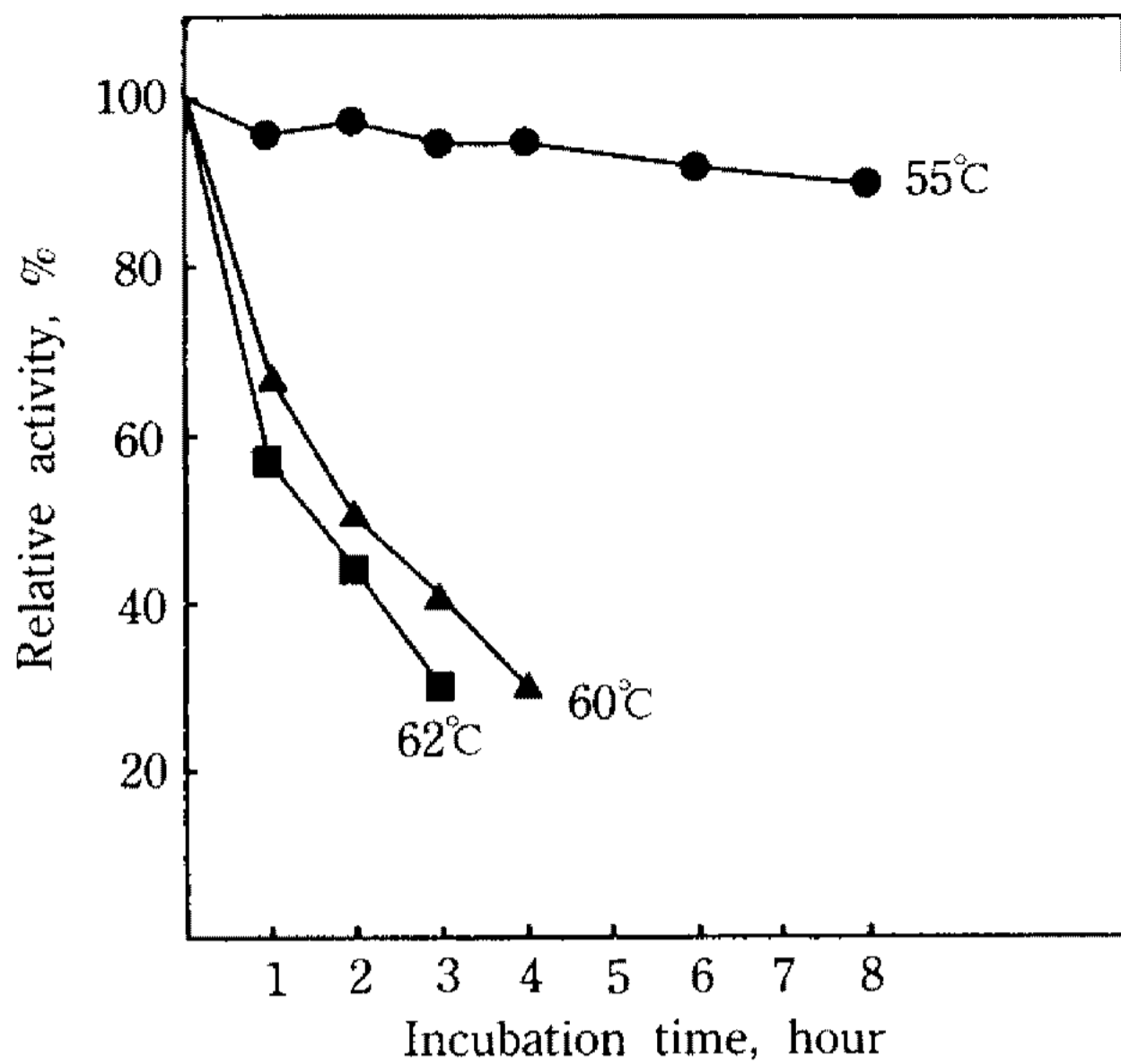


Fig. 5. Thermal stability of *Aspergillus ficuum* exoinulinase.

이눌린의 β -fructosidic linkage는 산 촉매하에서 그 가수분해가 일어나므로 이 효소의 촉매 부위에 pKa 5.6 정도 값을 가지는 아미노산의 H⁺이(아마도 Histidine imidazole ring의 H⁺) general acid catalysis에 관여할 가능성이 높다.

효소의 열안정성

상업적 과정의 생산을 위한 가장 중요한 요소 중의 하나는 exoinulinase의 열안정성이다. 효소의 높은 열안정성은 생산과정 동안 미생물의 증식이나 미생물의 오염을 막을 수 있으며 이눌린 특유의 낮은 용해성(상온에서 7~8%까지 녹을 수 있음) 때문에 높은 온도가 되어야만이 상업적 수준(약 20%)의 기질 이용이 가능하다. 따라서 여러 온도하에서 반응시간에 따른 잔여 효소활성이 조사되었다(Fig. 5). 기질이 없는 상태하에서 *Aspergillus ficuum*의 exoinulinase는 55°C의 온도에서 8시간 노출 후에도 그 활성을 약 95% 유지하였다. 그러나 60°C와 62°C에서는 약 1시간 incubation에서 전체 활성의 67%, 58% 수준으로 떨어졌다. 이 값은 60°C에서 8시간 incubation 동안 85%의 활성을 유지하였던 *Aspergillus niger*의 exoinulinase 보다는 다소 낮은 열안정성을 보여 *Aspergillus* strain에 따라 그 열안정성에 차이가 있음을 보여준다(2).

효소의 기질 특이성

50 mM의 기질을 사용하면서 *Aspergillus ficuum*의

Table 2. Substrate specificity of *Aspergillus ficuum* exoinulinase

Substrate (50 mM)	Linkage	Specific activity (U/mg)
Sucrose	β -2,1	2,844
Raffinose	β -2,1	938
Stachyose	β -2,1	250
Palatinose	α -6,1	0
Turanose	α -3,1	0
Lactulose	β -4,1	0
Melezitose	a	0
Inulin (1.7%)	β -2,1	813
Levan (1%)	b	0

a; (O- α -D-glucopyranosyl-[1-3]-O- β -D-fructofuranosyl [2-1]- α -glucopyranoside

b; Main chain: β -2,6-fructosidic linkage
Side chain: β -2,1-fructosidic linkage

exoinulinase의 기질 특이성이 조사되었다(Table 2).

기질 중 가장 잘 분해되는 것은 sucrose로서 약 2,800 U/mg의 specific activity를 나타내었다. 또한 이눌린(1.7%의 농도)의 분해율은 sucrose의 그것보다 약 0.35배의 효소활성을 보여 I/S ratio(0.28~0.35)에 따른 효소분류방법으로 고려해 볼 때 전형적인 non-specific β -fructofuranosidase(EC 3.2.1.80)임을 보여 주었다. Sucrose에 galactose가 한 개 더 붙은 삼탄당인 raffinose(O- α -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- α -D-glucopyranosyl- β -D-fructofuranoside)와 galactose가 두 개 더 붙은 stachyose(α -D-galactosyl<1 \rightarrow 6> α -D-galactosyl<1 \rightarrow 6>- α -D-glucosyl<1 \rightarrow 2>- β -D-fructofuranoside)는 sucrose에 비해 각각 1/3, 1/10 수준으로 분해되었다. 즉, 이들 기질에 존재하는 galactose residues는 이 효소의 활성부위에서 기질의 결합이나 또는 촉매 활성화에 상당한 영향을 주는 것 같다.

효소의 K_m 및 V_{max} 값

표준 반응조건하에서 기질의 농도를 변화시켜 줌에 따른 반응속도의 변화가 조사되었다. 이눌린의 평균 분자량을 5,000으로 가정하고 농도에 따른 반응속도를 조사하였을 때 sucrose와 이눌린 사이에는 다른 kinetics를 보였다. 즉 낮은 기질농도에서는 sucrose보다 이눌린에 대한 효소활성이 훨씬 높았으나(6 mM 기질농도에서 I/S ratio=4 : 1), 기질농도의 증가에 따라 sucrose에서는 반응속도가 완만하게 계속 증가하

여 이눌린에서의 최대반응속도(V_{max})보다 커졌다. 따라서 이 효소는 기질의 농도가 낮은 곳에서는 이눌린에 효율적으로, 기질의 농도가 높은 경우에는 sucrose를 더 효율적으로 분해하는 특징을 보여주었다. 이 결과를 이용하여, Lineweaver-Burk plot로 얻어진 sucrose와 이눌린에 대한 K_m , V_{max} 값은 각각 90 mM, 6,670 U/mg과 33 mM, 5,000 U/mg이었다.

요 약

*Aspergillus ficuum*이 생산하는 exoinulinase가 CM-Sephadex, DEAE-Sephadex 6B 및 HPLC gel filtration을 통해 단백질 mg당 약 2,800 U의 specific activity로 정제되었다. 이 효소는 native 상태에서 약 $83,000 \pm 1,000$ 의 분자량을 나타냈으며 당을 함유하고 있었다. 이 효소는 최적 pH가 4.4~4.7이었고 55°C에서 8시간 노출 후에도 그 활성을 95% 유지하였다. 이 효소의 I/S ratio는 약 0.35이고 전형적인 non-specific β -fructofuranosidase의 특성을 나타내었으며 raffinose와 stachyose를 분해할 수 있었다.

감사의 말

이 연구는 미원 부설 한국음식문화연구원의 지원에 의해 이루어졌습니다.

참고문헌

1. Ettalibi, M. and J. Baratti: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **26**, 13 (1987)
2. Uhm, T.B., S.M. Byun, Y.J. Kwon, S.B. Han and K.S. Ryu: *Biotechnol. Lett.*, **9**, 287 (1987)
3. Miller, G.L.: *Anal. Chem.*, **31**, 426 (1959)
4. Uhm, T.B., D.Y. Jeon, S.M. Byun, J.S. Hong and J.W.D. Grootwassink: *Biochim. Biophys. Acta.*, **926**, 119 (1987)
5. Bradford, M.: *Anal. Biochem.*, **72**, 248 (1976)
6. Laemmli, U.K.: *Nature*, **227**, 680 (1970)
7. Mathieu, J.M. and R.H. Quarles: *Anal. Biochem.*, **55**, 313 (1973)
8. Vandame, E.J. and D.G. Derycke: *Adv. Appl. Microbiol.*, **29**, 139 (1983)

(Received May 9, 1991)