

Vinylsulfone Activated Agarose에 Endo- 및 Exoinulinase의 고정화

한상배¹ · 송근섭¹ · 정용섭¹ · 손희숙² · 우순자² · 엄태봉^{1*}

¹전북대학교 식품공학과, ²고려대학교 식품공학과

Immobilization of Endo- and Exoinulinase on Vinylsulfone Activated Agarose

Han, Sang-Bae¹, Geun-Seoup Song¹, Yong-Seob Jeong¹, Hee-Suk Sohn²,
Soon-Ja Woo² and Tai-Boong Uhm^{1*}

¹Department of Food Science and Technology, Chonbuk National University, Chonju 560-756, Korea

²Department of Food Technology, Korea University, Seoul 136-701, Korea

Abstract — In order to reuse inulinase effectively, a method for immobilizing both endo- and exoinulinase to vinylsulfone activated agarose via covalent bond was investigated. The immobilized enzyme preparation had, respectively, 400 U for exoinulinase activity and 80 U for endoinulinase activity per gram gel. A thermal stability by immobilization had increased in the case of exoinulinase. Optimum pHs for two immobilized enzymes were 4.4 to 5.0. Synergistic effect which depends on mixed ratio of two immobilized enzymes was the best when the mixed ratio of endo/exo lay between 0.1 and 0.5, and its activity of the mixed enzyme increased 1.7 times as compared to that of each immobilized enzyme. Inulinase activities of both of the immobilized enzymes did not change during 20 times experimental runs in a batch reactor.

이눌린은 포도당 이성화 공정에 의한 과당생산보다도 더 단순한 공정을 통하여 과당을 얻을 수 있는 잇점이 있으나 몇가지 문제점 때문에 그 이용이 제한되어 왔다. 이들 문제점 가운데 가장 큰 제한요소는 산업적 이용가치가 있는 inulinase 분비 균주의 개발이 안되어 있다는 것과 산업적 가수분해 공정을 위한 고정화 방법의 미비라고 생각된다. 최근 Novo A/S (Denmark)는 endo- 및 exoinulinase를 거의 1:1로 분비하는 한 *Aspergillus* strain을 발견하고 이 균주를 이용하여 Novozyme 230이라는 inulinase 조효소액을 시제품으로 실험하고 있다. 그러나 놀랍게도 inulinase의 효율적인 재사용을 위하여 시도된 고정화 방법은 많지 않다. 지금까지 calcium alginate gel(1), glutaraldehyde로 처리된 2-aminoethyl cellulose(2), DEAE-cellulose(3)의 matrix에 효모의 whole cell

immobilization 또는 효모의 inulinase의 고정화가 시도되었다. 특히 2-aminoethyl cellulose에 고정화된 inulinase는 gram matrix당 약 40 Units로 50%의 고정화율을 보였다. 이 효소의 이눌린 분해 비율은 90%로서 상당히 좋은 편이었지만 불행하게도 열안정성은 고정화 후에 더욱 감소되었다. 따라서 본 실험은 inulinase의 고정화를 시도함으로써 효소의 물리화학적 특성(특히 열안정성)을 개선하고, 값비싼 효소의 고정화를 통한 재사용 가능성 및 endo- 및 exoinulinase의 동시 고정화에 의한 이눌린 분해 효율의 증진에 그 목적을 두고 있다.

재료 및 방법

재료

*Aspergillus ficuum*이 생산하는 조효소액 Novozyme 230은 Denmark Novo A/S의 Dr. Perdensen으로부터 얻었는데 이 효소액은 endo- 및 exoinulinase,

Key words: Inulin, inulinase, immobilization

*Corresponding author

protease, cellulase, fructosyl transferase 등을 함유하고 있었다. Endo- 및 exoinulinase는 전보(4,5)에 준하여 정제되었으며 이들 효소 조제액은 fructosyl transferase, levanase 등 inulinase 활성화에 영향을 줄 수 있는 효소는 검출되지 않았다. Vinylsulfone activated agarose(Sigma)는 m/당 활성기인 vinylsulfonyl ethyl group을 10~15 μ moles 함유하고 있었다. 이 실험에서 사용된 다른 모든 시약은 상업적으로 이용할 수 있는 특급이었다.

효소활성 측정 및 단백질량 분석

효소활성은 50°C에서 5% 이눌린은 5분간 반응시킨 뒤 생성되는 환원당을 Dinitrosalicylic acid 방법(6)을 이용하여 측정하였다. 자세한 활성 측정 방법은 Uhm 등(7)의 방법에 준하였다. Inulinase에 대한 1 unit는 1분당 위 조건하에서 환원당 1 μ mol을 생성할 수 있는 효소의 양으로 정하였다. 단백질은 Bradford method (8)에 준하여 그 양을 결정하였다. 고정화 효소의 활성은 250 mg에 해당하는 고정화된 gel(약 1.2 ml)을 1 ml의 0.1 M sodium acetate buffer, pH 4.7에 넣고 3 ml의 5% 이눌린 용액과 혼합한 뒤 50°C에서 5분간 반응 후 상등액 50 μ l를 취하여 DNS 방법으로 환원당 정량을 하였다.

Vinylsulfone activated agarose gel에 endo- 및 exoinulinase의 고정화

1g의 vinylsulfone activated agarose gel을 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 8.0에 넣고 실온에서 2시간 swelling시켰다. pH 8.0으로 미리 조절한 효소 용액 1 ml(exo 효소는 0.5 mg, endo 효소는 1 mg 함유)를 swelled된 gel에 넣고 실온에서 12시간 천천히 교반한 뒤, 이 slurry에 0.1 M이 되게끔 glycine을 첨가하고 12시간 반응시켰다. 이것을 10 cc 용량의 column으로 옮기고 20 cc의 0.1 M sodium acetate buffer, pH 4.7로 washing하였다. Washing한 gel은 압축 공기로 수분을 뺀 뒤 4°C에 보관하면서 고정화 실험에 사용하였다. 이때 vinylsulfone activated agarose의 stabilizer로서 존재하는 lactose는 두 효소의 고정화에 중요한 영향을 미쳤다. 즉 exoinulinase의 고정화에는 lactose의 존재가 필수적이었지만 endoinulinase의 고정화에는 lactose를 제거하기 위하여 gel의 swelling 과정 동안 충분한 washing이 필요하였다.

결과 및 고찰

고정화를 위한 matrix의 선정

Endo-와 exoinulinase를 고정화시키기 위하여 사용된 몇가지 matrices 중에서 DEAE-Sepharose 및 vinylsulfone activated agarose가 다른 matrices에 비해 상대적으로 높은 고정화율을 보였다. 그러나 DEAE-Sepharose에 고정화시킨 효소는 반복하여 반응시키는 동안 그 활성이 약 1/9로 감소됨을 나타내어

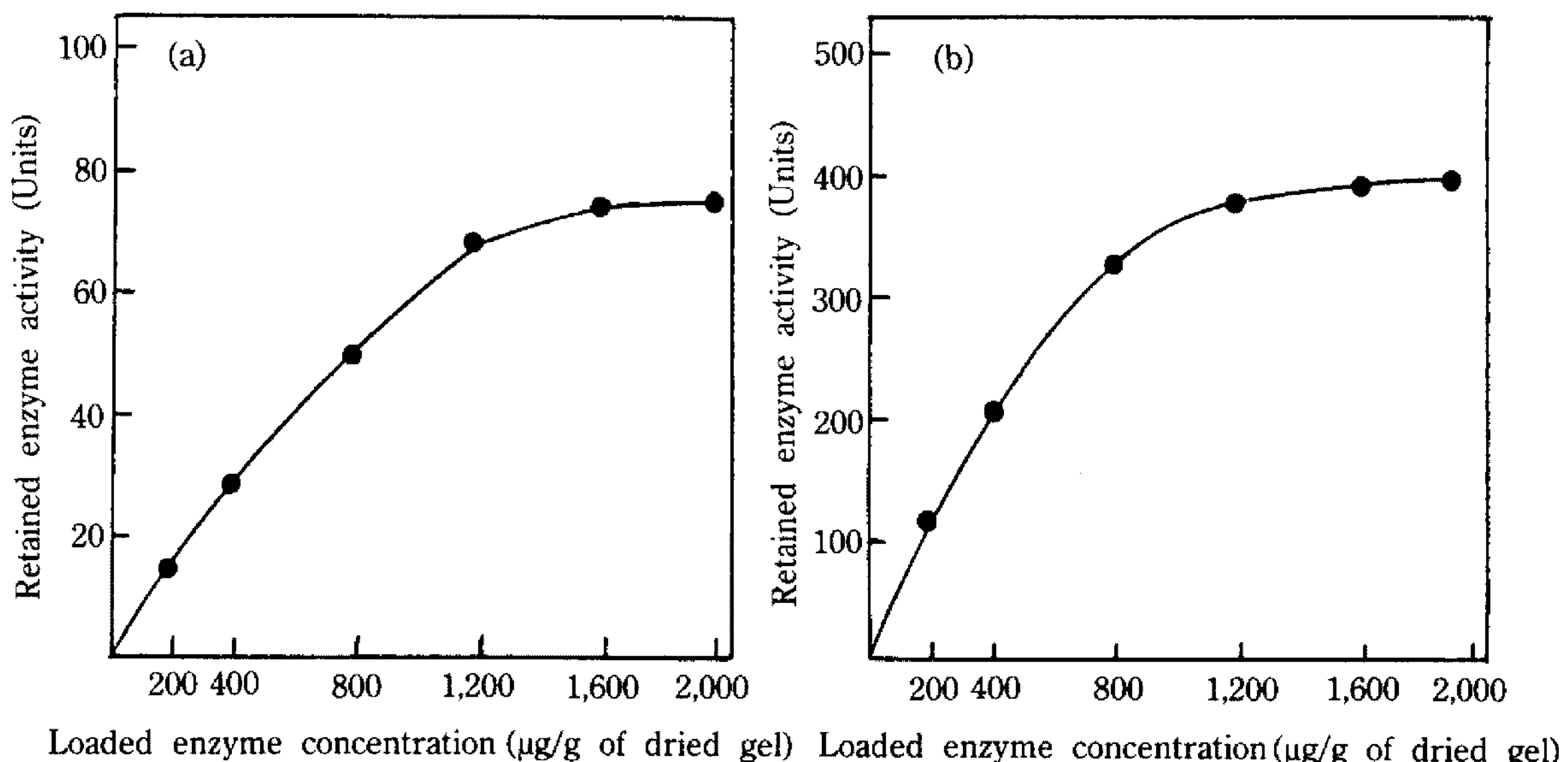


Fig. 1. Plot of enzyme activity retained on the gel against the loaded enzyme concentration.
(a) endoinulinase, (b) exoinulinase

우리는 vinylsulfone activated agarose를 두 효소의 고정화를 위한 지지체로서 일차 선정하였다. Vinylsulfone activated agarose gel은 oxirane gel과 비슷한 reaction mechanism을 가지나 pH가 더 낮은 상태에서도 효소와 공유결합을 형성할 수 있다는 점에서 inulinase 고정화에 잇점을 가지고 있다(9).

효소의 고정화율

효소를 vinylsulfone activated agarose gel과 반응시켰을 때 g gel당 얼마만큼 효소가 결합될 수 있는가를 효소의 활성 단위로 조사하였다. Exoinulinase는 g gel당(건조된 상태로 환산하였을 때) 최고 400 U까지 활성을 나타낼 수 있는 반면 endoinulinase는 같은

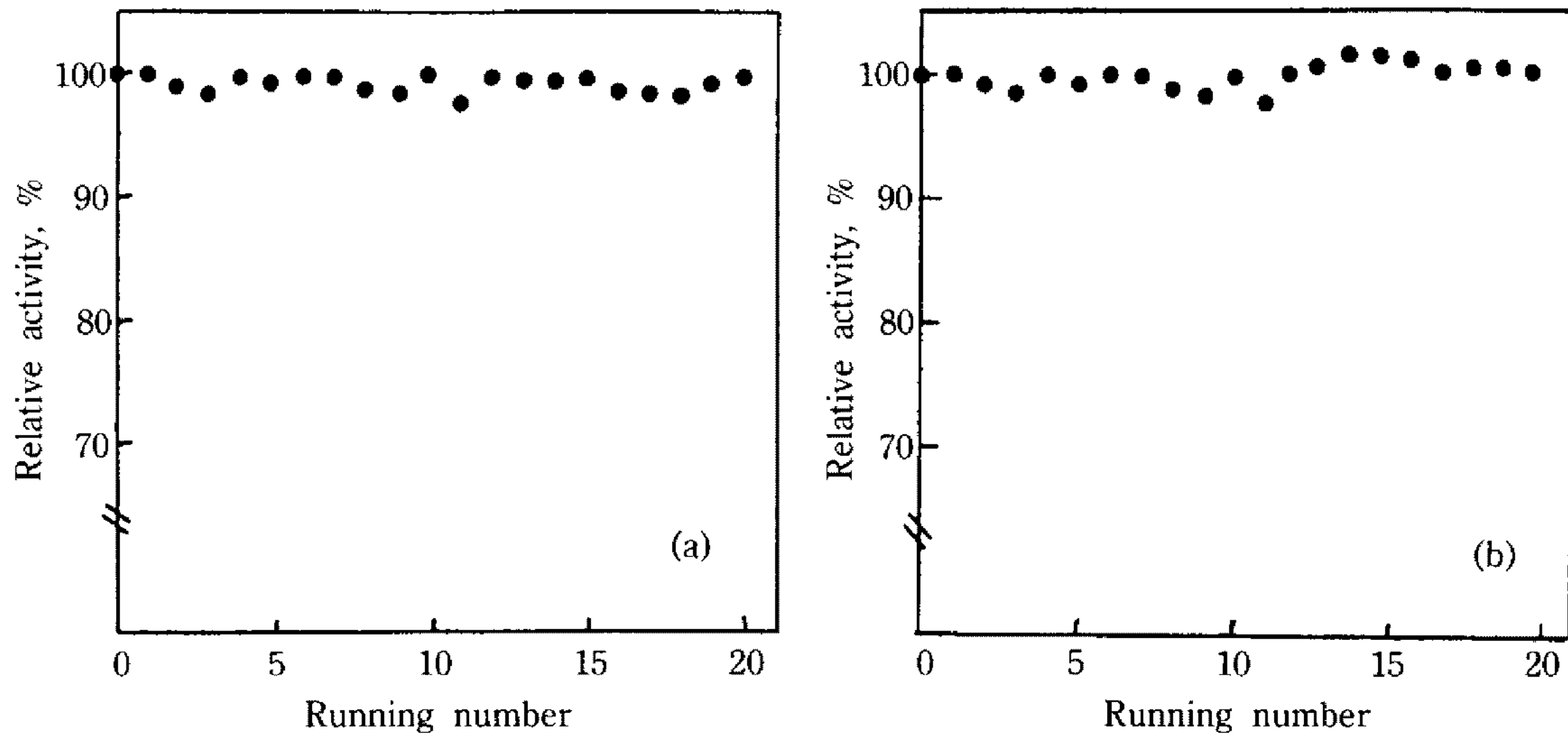


Fig. 2. Operational stability of immobilized inulinase.

(a) endoinulinase, (b) exoinulinase: Each run was performed on a 5 ml batch reactor, at 50°C. After reaction, the gels were washed twice with 10 ml of 0.1 M sodium acetate buffer, pH 4.7 and then used for the next run.

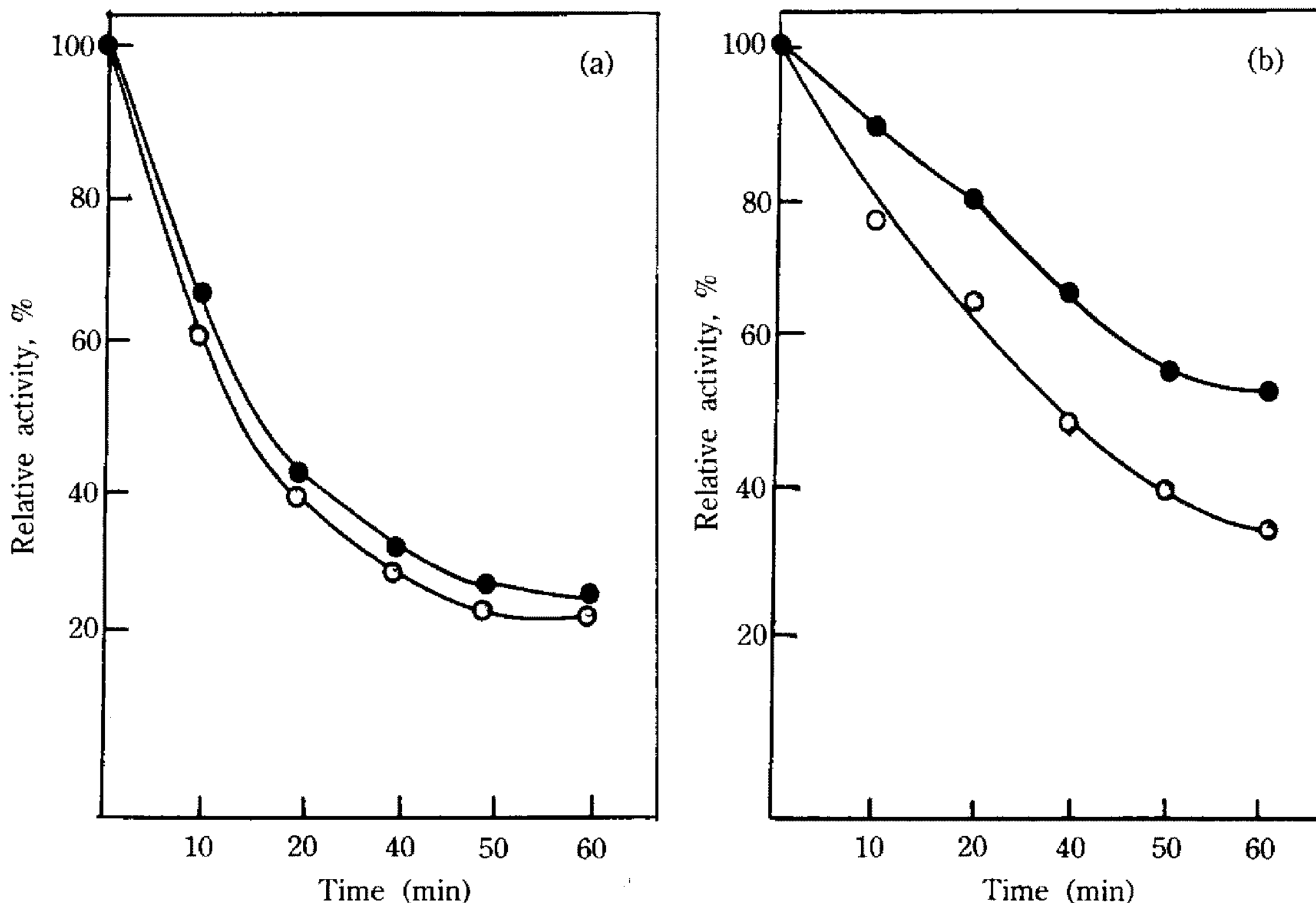


Fig. 3. Heat denaturation of soluble and immobilized forms of inulinase at 65°C in 0.1 M sodium acetate buffer (pH 4.7).

(a) endoinulinase, (b) exoinulinase; Soluble enzyme (○—○), Immobilized enzyme (●—●)

matrix에서 최고 약 80 U까지 활성을 보였다(Fig. 1). 이때 첨가된 효소의 활성당 고정화된 gel에서 나타나는 활성의 비율(Q)은 g gel당 1 mg 첨가된 exoinulinase 경우 약 40%의 값을 보였으며, 같은 조건의 endoinulinase 경우 Q값은 20%이었다.

Optimal stability

고정화된 두 효소를 각각 batch reactor에서 반복하여 반응시키는 동안 활성의 감소 정도를 조사하였다(Fig. 2). 고정화된 두 효소 모두 20번의 반복된 반응동안 전혀 그 활성 감소를 보이지 않았다. 일반적으로 공유결합은 높은 결합에너지 때문에 다른 결합 방식에 비해 안정이된 구조를 가진다. Inulinase의 thiol(-SH)이나 amino(-NH₂) groups은 친핵성 공격에 의하여 gel의 vinylsulfonyl groups에 안정된 공유결합을 형성하며, 이것이 이 두 가지 고정화 효소의 높은 operational stability에 기여할 것이라 생각되었다.

열안정성

Vinylsulfone activated agarose에 고정화된 endo- 및 exoinulinase의 열안정성을 조사하였다. Fig. 3에서와 같이 65°C에서 1시간 보온 후 고정화된 exo- 및 endoinulinase의 잔여 활성도는 각각 53%, 24%이었고 같은 조건하에서 가용화된 exo 및 endo 효소의

잔여활성도는 각각 32%, 20%이었다. 즉 고정화되었을 때, exo 효소는 endo 효소에 비하여 더 높은 열안정성을 보였으며, 또한 고정화된 exo 효소는 가용화 exo 효소에 비해서도 열안정성이 증가됨을 나타내었다. 그러나 고정화된 endo 효소는 가용화된 endo 효소와 열안정성에 있어서 별 차이가 없었다. 온도의 증가에 따라, exo 효소의 반응 group들과 gel의 vinyl-

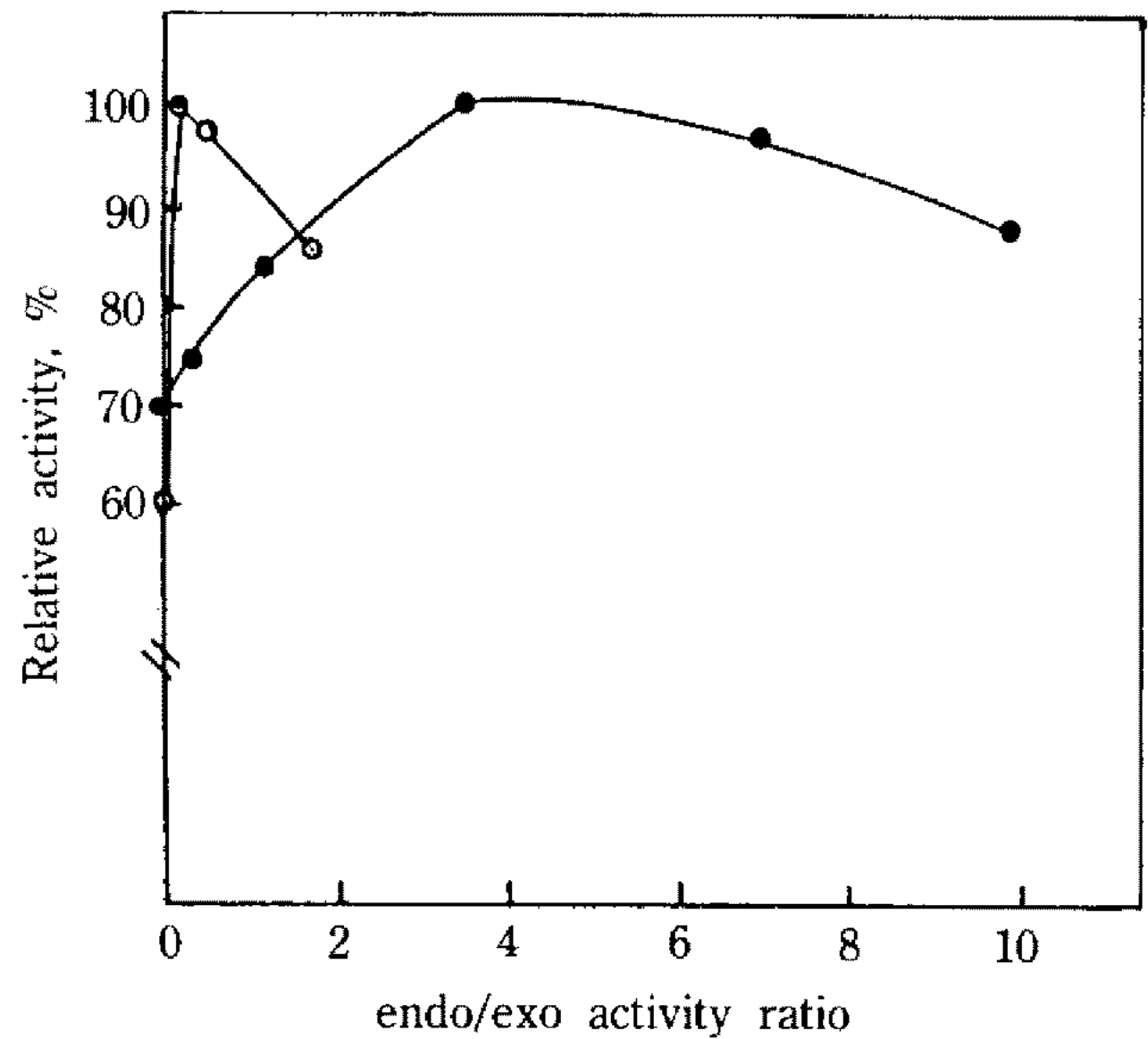


Fig. 4. Effect of hydrolysis of inulin by the mixing ratio of immobilized endo- and exoinulinase.

Before mixing, activity of each immobilized enzyme was 2 units. Soluble enzyme (●-●), Immobilized enzyme (○-○)

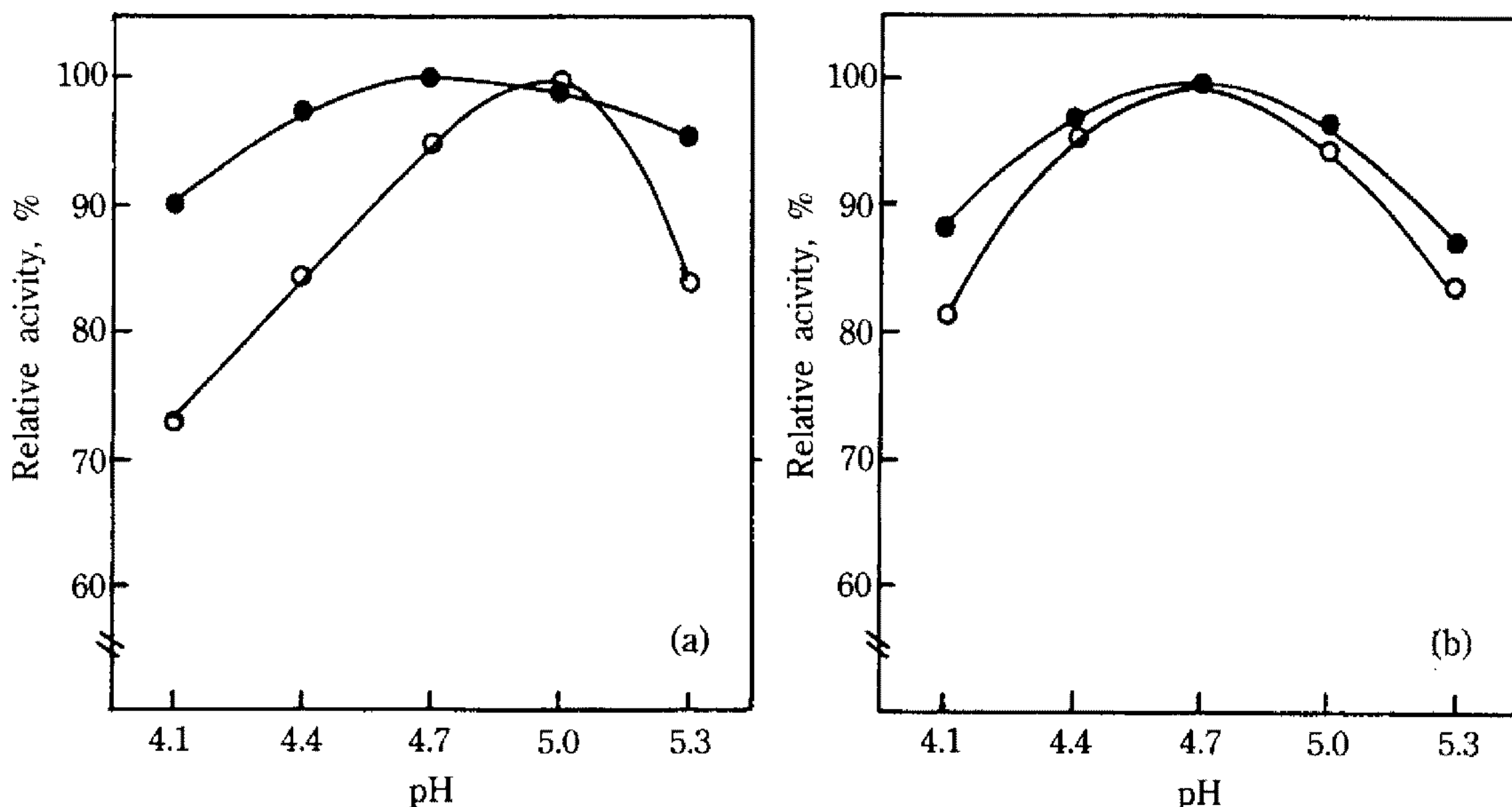


Fig. 5. pH-activity curves of soluble and immobilized forms of inulinase.

(a) endoinulinase, (b) exoinulinase; Soluble enzyme (○-○), Immobilized enzyme (●-●)

sulfone group과의 상호 결합이 endo 효소의 그것에 비해 안정된 3차원적인 구조를 유지하여 더 높은 열 안정성을 보이는 것으로 추정되었다.

pH 영향

고정화된 endo- 및 exoinulinase의 최적 pH는 각각 4.4~5.3, 4.4~5.0에서 최대활성의 95~100%를 보였다(Fig. 5). 또한 고정화 효소의 경우 pH 4.1~5.3의 범위에서 가용성 효소에 비해 pH 변화에 따른 효소 활성의 영향을 덜 받는다는 것을 보여주었다.

Synergistic effect

각각 2 units로 고정화된 endoinulinase와 exoinulinase를 일정비율로 혼합한 뒤, 두 효소의 혼합 비율에 따른 이눌린 분해의 synergistic effect를 조사하였다(Fig. 4). Batch reactor에서 조사하였을 때 두 고정화 효소의 활성 비율(R, 고정화된 endoinulinase 활성/고정화된 exoinulinase 활성)이 0.5~0.1에서 이눌린의 분해 정도가 가장 높게 나타났으며 endo- 또는 exoinulinase만을 단독으로 넣었을 때보다 그 활성이 약 1.7배 증가되었다. 비교적 가용성 효소인 경우 R값 2~4에서 이눌린의 가수분해 정도가 가장 높게 나타났고 이때 혼합되지 않은 상태의 각 효소에서 보다도 활성이 약 1.4배 증가하였다. 이와 같이 고정화된 효소는 가용성 효소에 비하여 R값이 감소되는 현상을 나타내었는데, 이것은 고정화된 효소의 경우 endoinulinase에 의한 이눌린 분해산물인 oligofructan이 gel matrix로부터(또는 matrix내로) 쉽게 확산이 되지 않아 고정화된 exoinulinase가 효율적으로 작용하지 못하였기 때문이거나 고정화에 의해 두 효소의 기질에 대한 친화력의 변화나 반응속도의 변화가 이러한 현상을 일으킬 수 있다고 사료되었다.

요 약

Inulinase의 효율적인 재사용을 위하여 vinylsulfone activated agarose에 endo- 및 exoinulinase를 고정화시켰다. Gram gel당 exoinulinase는 400 U, endoinulinase는 80 U까지 고정화시킬 수가 있었고 열 안정성은 exoinulinase에서 증가되었다. 두 고정화 효소의 혼합비율에 따른 synergistic effect는 endo/

exo가 0.5~0.1일 때 가장 컸으며, synergistic effect는 혼합되지 않은 상태의 고정화 효소에 비해 그 활성이 약 1.7배 증가하였다. 두 고정화 효소의 최적 pH는 4.4~5.0 범위이었으며 operational stability는 batch reactor에서 20번 반복된 실험결과 어떠한 효소활성의 감소도 보이지 않았다.

감사의 말

이 연구는 미원 부설 한국음식문화연구원의 지원에 의해 이루어졌습니다.

참고문헌

1. Kiersan, M. and C. Bucke. 1977. The immobilization of microbial cells, subcellular organelles, and enzymes in calcium alginate gels. *Biotechnol. Bioeng.* **19**: 387-397.
2. Kim, W., S.M. Byun and T.B. Uhm. 1982. Hydrolysis of inulin from *Jerusalem artichoke* by inulinase immobilized on aminoethylcellulose. *Enzyme Microb. Technol.* **4**: 239-244.
3. Guiraud, J.P., J. Daurelles and p. Galzy. 1981. Alcohol production from *Jerusalem artichoke* using yeasts with inulinase activity. *Biotechnol. Lett.* **3**: 683-685.
4. 한상배, 유향숙, 노민환, 이태규, 손희숙, 우순자, 엄태봉. 1991. *Aspergillus* 조효소액으로부터 Endoinulinase의 정제 및 특성. *산업미생물학회지.* **19**: 15-162.
5. 한상배, 송근섭, 유향숙, 노민환, 이태규, 손희숙, 우순자, 엄태봉. 1991. *Aspergillus* 조효소액으로부터 exoinulinase의 정제 및 특성. *산업미생물학회지.* **19**: 253-258.
6. Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
7. Uhm, T.B., D.Y. Jeon, S.M. Byun, J.S. Hong and J.W.D. Grootwassink. 1987. Purification and properties of β -fructofuranosidase from *Aspergillus niger*. *Biochim. Biophys. Acta.* **926**: 119-126.
8. Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-251.
9. Klaus Mosbach. 1976. *Methods in Enzymology*. Vol. XLIV pp. 32-33. Academic Press, New York.

(Received October 22, 1991)