

Aspergillus sp. (C-74 strain)가 生産하는 Inulin 分解酵素에 關한 研究

(第 1 報) 分離選別한 菌株酵素의 酵素學的 性質

權 泰 鍾 · 鄭 鎬 權 · 姜 孝 源 · *徐 正 垣 ·

建國大學校 工大 微生物工學科

*(慶北大學校 農大 農化學科)

Studies on the Inulin hydrolyzing enzyme produced by *Aspergillus* sp. (C-74 strain)

Part 1. Some properties of the Inulin hydrolyzing enzyme from selected strain.

T. J. Kwon, H. K. Chung, H. W. Kang, *J. H. Seu

Dept. of Microbiological technology, College of Engineering, Kon-KuK University

*Dept. of Agricultural chemistry, Kyung-Pook National University

(Received April 27, 1973)

Abstract

With an attempt to obtain an Inulin hydrolyzing enzyme from microorganism, a strain C-74 belonging to the genus of *Aspergillus* species was selected from two hundred and seventy microorganisms stored at the lab, of microbiology.

1. Sample Inulase was precipitated mainly at pH 8 to 5 by isoelectric point fraction method.
2. The optimum pH of Inulase activity of the enzyme from C-74 strain was about 3.0
3. The optimum temperature of Inulase activity of the enzyme from C-74 strain was about 55°C
4. The Inulase from C-74 strain was stable at 50°C for 10mins.
5. The range of the pH stability of the Inulase from C-74 strain was about 2.5-4.5
6. Effect of metal ions on the Inulase activity of the enzyme from C-74 strain was activated by Mg^{++} , Sb^{+++} and inhibited by Ag^{++} , Hg^{++}

緒 論

Inulin은 poly saccharide의 一種으로 球根類인 왜지감자, Dahlia 뿌리에 저장수炭素로 存在한다.

순수 Inulin은 白色 結晶性인 粉末이며 Amylase에 依하여서는 加水分解되지 않으나 酸 혹은 Inulase에 依하여서는 쉽게 加水分解되어 D-Fructose를 生産한다. Inulin分解 酵素에 關한 研究는

1887年 Green⁽¹⁾이 Inulin分解酵素의 存在를 確因한 以來 植物性^(2,3), 動物性, 微生物性 Inulase에 對하여 많은 研究 報告가 있다. 特히 微生物性 Inulase에 對하여서는 1942年 本江⁽⁴⁾이 Yeast의 一種인 *Schizo saccharomyces pombe*의 Inulase에 對하여 報告가 있으며, 또 Snyder^(5,6)와 그 研究 同僚者는 *Saccharomyces fragilis*의 그것에 對하여 報告하였으며, Yeast Inulase에 對한 報告는 이 外에도 Adam⁽⁷⁾, Linder⁽⁸⁾, 朝井⁽⁹⁾ Biswas⁽¹⁰⁾ 등의

報告가 있으며, 糸狀菌類의 그것에 對하여서는 1893年 Bourguet⁽¹¹⁾가 *Aspergillus niger*, *Penicillium glaucum* 등이 Inulin 分解酵素를 生産함을 發見한 以來 Boselli⁽¹²⁾ Biekel,⁽¹³⁾ Pringsheim⁽¹⁴⁾, Dedonder⁽¹⁵⁾, Pringsheim and Kohn⁽¹⁷⁾, Pigm-an⁽¹⁸⁾, Edeman⁽¹⁹⁾ 등이 *Aspergillus niger*의 그것에 對하여 報告 하였으며, *Penicillium*屬이 生産하는 Inulase에 對해서는 Pringsheim and Perwosky⁽¹⁶⁾, Masta Mori⁽²⁰⁾, 中村豊産⁽²¹⁾, 朝井⁽²²⁾, 權, 徐⁽²³⁾ 등의 報告가 있으며 *Aspergillus wentii*에 對하여서는 權, 徐⁽²³⁾ 등의 報告가 있다.

本 研究者들은 糸狀菌類로 부터 比較的 Inulin 分解酵素 生産力이 높은 菌株을 檢索하여 本 菌株가 生産하는 Inulase의 酵素學的 性質을 調査하였기에 報告하는 바이다.

實驗材料 및 方法

使用菌株: 本實驗에 使用한 菌株는 建大 工大 微生物工學科 微生物實驗室內에 所藏되어 있는 糸狀菌類 270株를 對象으로 選別實驗을 하였다.

使用基質: 本實驗에 使用한 基質은 純度 98%인 Merk製品の Inulin을 使用하였으며 그 旋光度는 $[\alpha]^{20}_D -36 \sim -40^\circ C$ 였으며 水分含量은 10%이였으며 遊離 D-Fructose含量은 最高 0.2%인 것을 使用하였다.

酵素生成 培地: wheat bran 100gr에 對하여 2% -sucrose溶液 100ml를 力하여 混合한 後 500ml三角 flask에 約 80gr씩 넣고 $1kg/cm^2$ 에서 20分間 高壓殺菌하여 使用하였다.

酵素液의 調製法: 위와 같이 調製한 培地에 各 各 菌의 胞子를 一白金線 接種한 後 $30^\circ C$ Incubator에서 4日間 培養한 後 培養物에 3倍의 cooling distilled water를 加하여 $5^\circ C$ 에서 4時間 抽出하여 濾過한 後 約 2000r. p. m에서 10分間 遠心分離한 後 그 上澄液을 酵素液으로 使用하였다.

酵素活性 測定法: Somogyi⁽²⁴⁾ method에 依하여 Inulin이 分解되어 生成되는 遊離還元糖을 定量하였다.

優良菌株 選別方法: 위 酵素液의 使用하여 그 酵素活性이 強하고 Bran培地에서 比較的 繁殖이 잘되는 *Aspergillus*屬인 No. C-74菌株를 選別하였다.

本 實驗에 使用한 Somogyi 試藥의 標準曲線: 本 實驗에 使用한 Somogyi 試藥의 標準曲線을 알기 爲하여 Dextrose를 50 γ 부터 最高 1000 γ 까지 調製하여 測定한 結果는 Fig. 1과 같았다.

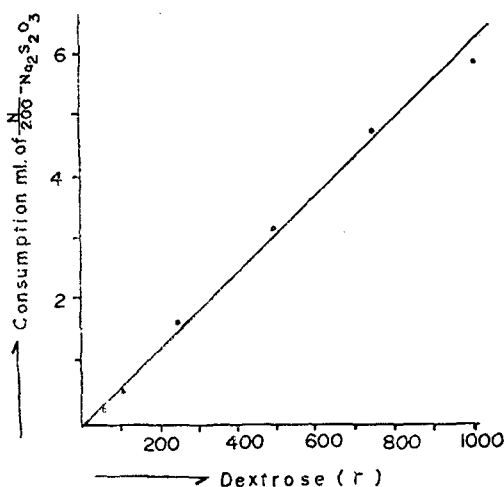


Fig. 1 Standard Curve of Dextrose

Fig. 1에서와 같이 本 試藥은 糖 50 γ 에서 부터 750 γ 까지는 正確하게 測定可能하였다.

實驗結果 및 考察

C-74菌株가 生産하는 Inulase의 粗精製法: 抽出 酵素液을 Active carbon으로 여과한 後 NaOH 及 HCl로써 Iso-electro point에 依한 粗精製法은 Fig. 2와 같이 하였다.

上記 Fig. 2와 같이 分別한 fraction을 各 各 蒸溜水에 溶解한 後 遠心하여 그 上澄液을 酵素液으로 使用하여 그 活性度를 調査한 結果에 依하면 大部分의 酵素蛋白質이 pH 8~5에서 回收됨을 알았다.

選別한 菌株가 生産하는 Inulin分解酵素의 酵素學的 性質:

C-74 菌株 酵素의 活性 最適 pH: C-74'S Inulase 活性의 最適 pH를 調査하기 爲하여 Buffer solution pH를 2.5, 3.0 卽 0.5의 間격으로 調製하여 使用하였으며 各 pH에 對한 活性度를 測定한 結果는 Fig. 3과 같았다.

위 Fig. 3에서와 같이 本 Inulin 分解酵素의 活性 最適 pH는 3.0部附近이었다.

C-74'S Inulase 活性 最適溫度: 選別한 菌酵素의 最適作用 溫度를 調査하기 爲하여 作用溫度를 $30^\circ C$ 에서 부터 $5^\circ C$ 간격으로 最高 $70^\circ C$ 까지 調査하였으며 이때의 反應液은 作用 最適活性 pH Buffer를 使用하였으며 그 結果는 다음 Fig. 4와 같았다.

위 Fig. 4에서 本 酵素는 反應液의 溫度가 上昇함에 따라 그 活性은 높아졌으나 反面 $55^\circ C$ 以上

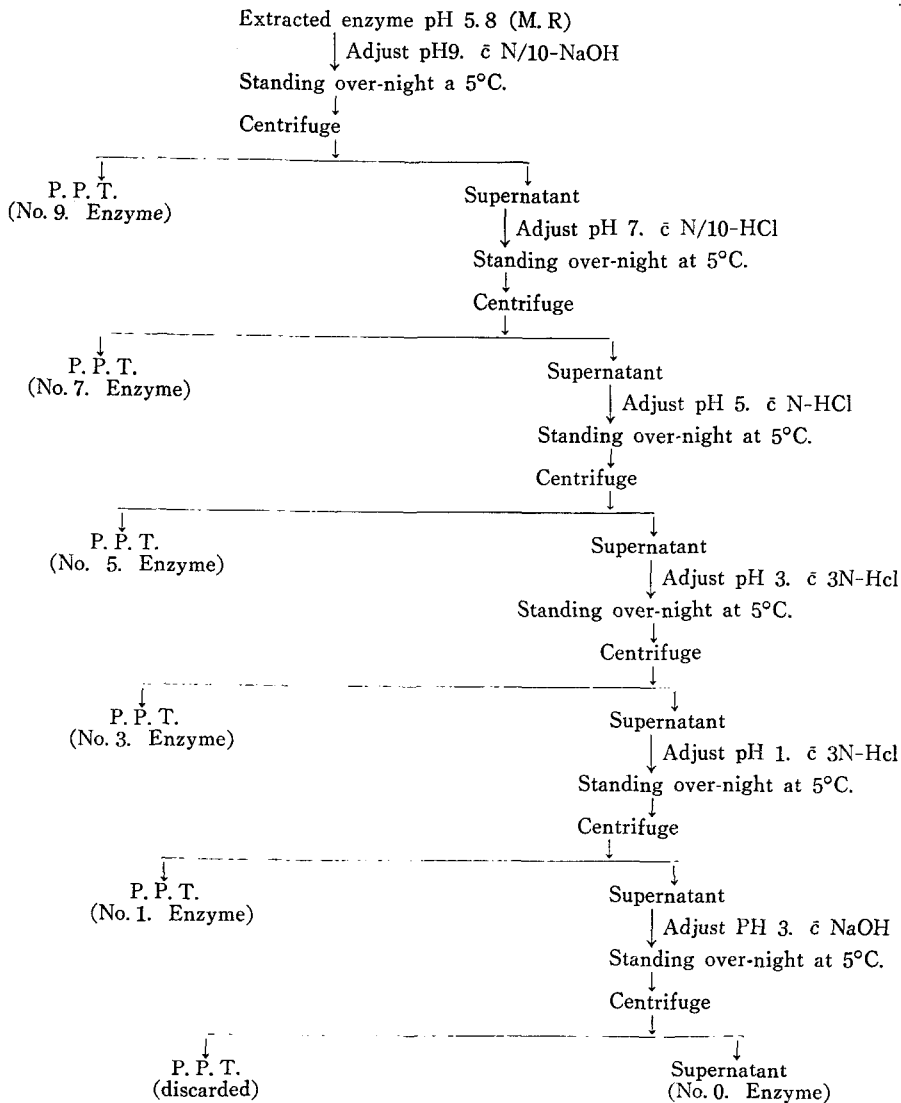


Fig. 2 Purification of Inulase from C-74 strain.

에서는 급격하게 감소하는 결과를 보였다.

C-74'S 酵素의 熱에 對한 安定性: 本 酵素의 熱에 對한 安定性을 調査하기 爲하여 酵素液을 50°C, 60°C, 70°C에서 各各 0, 10, ...120分間 熱處理시킨 後 活性 最適 pH 及 溫度에서 作用시킨 後 그 活性度를 測定한 結果는 다음 Fig. 5와 같았다.

위 Fig. 5에서 本 酵素를 50°C에서 10分間 熱處理하였을 경우 本 酵素는 熱變性을 일으키지 않았으며 45分間 處理에 依하여서는 約 20%失活하였다.

그러나 120分間 熱處理에 依하여 約 43% 失活하였다.

60°C에 10分間 處理하였을 경우 約 25% 失活하였고 또 120分間 熱處理에 依하여 約 60% 失活하

였다.

反面 70°C에서 10分間 熱處理하였을 경우에는 約 93% 失活하였다.

또 45分 以上 處理에 依하여서는 酵素活性이 完全히 失活하였다.

C-74'S 酵素의 安定 pH: 本 Sample 酵素의 安定 pH를 調査하기 爲하여 pH 2.5에서부터 0.5의 間隔으로 8.0까지 調製하여 酵素液과 McIlvaine buffer Salution을 同量混合하여 10°C에서 20時間 靜置한 後 HCl, NaOH 로서 各各 最適 pH로 調節한 後 基質과 作用시켰으며 이때의 Control은 Sample 酵素液을 最適 Buffer溶液과 混合하여 同一하게 靜置하였고 HCl, NaOH 代身 本 酵素活性

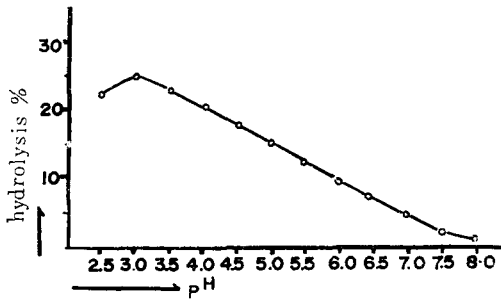


Fig. 3. Effect of pH on the Inulase activity of the enzyme from C-74 strain.

Reaction Mixture; 0.7ml of Mcllvaine buffer solution. and 0.3ml of enzyme solution were added to one ml of 0.5%-Inulin solution The reaction was carried out at 40°C for 3 hrs.

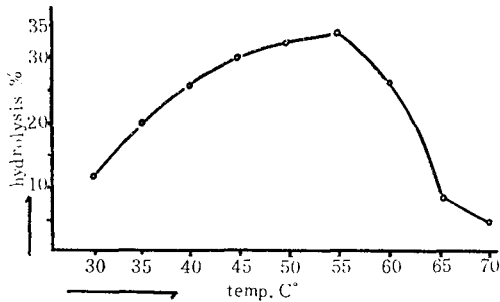


Fig. 4. Effect of temperature on the Inulase activity of the enzyme from C-74 strain.

Reaction Mixture; 0.7ml of Mcllvaine buffer solution (3.0). and 0.3ml of enzyme solution were added to one ml of 0.5%-Inulin solution The reaction was carried out at temperature indicated for 3 hrs.

最適 pH Buffer 溶液을 加하여 作用시킨 後 活性度를 測定한 結果는 다음 Fig. 6과 같았다.

上記 Fig. 6에서 그 活性度는 pH處理를 하지 않은 酵素의 Activity를 100으로 하여 相對活性度로서 表示한 것이다.

Fig. 6에서 本 Sample 酵素의 活性最適 pH 部 近인 pH 3.0에서는 20時間 處理에 依하여서 約 6% 失活하였으며 3.5에서 處理하였을 경우 約 4% 失活함을 보이고 있다. 또 8.0에 處理 시켰을 때 는 約 50% 失活함을 나타 내었다.

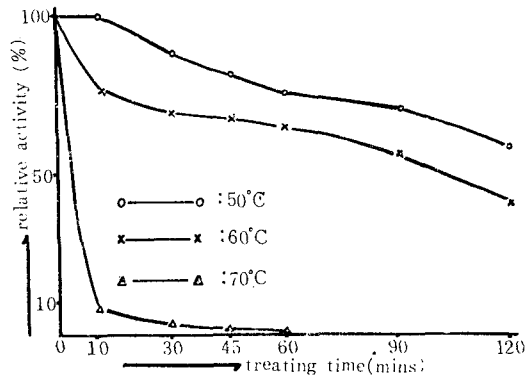


Fig. 5. Heat stability curve of the enzyme from C-74 strain. Reaction Mixture; 0.7 ml of Mcllvaine buffer solution (3.0) and 0.3 ml of treated enzyme solution were added to one ml of 0.5%-Inulin solution Enzymatic reaction was carried out at 55°C for 4 hrs.

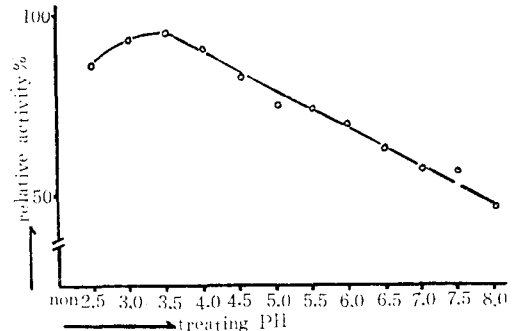


Fig. 6. pH stability curve of the enzyme from C-74 strain. Reaction Mixture; 0.7 ml of Mcllvaine buffer solution (3.0) and 0.3 ml of treated enzyme solution were added to one ml of 0.5%-Inulin solution The reaction was carried out at optimum temperature for 4 hrs.

C-74'S 酵素의 金屬 Ion에 對한 影響 :

本 酵素의 金屬 Ion에 對한 影響을 調査하기 爲 하여 實驗한 金屬鹽은 Pb(NO₃)₂, HgCl₂, CoCl₂, Fe₂(SO₄)₂, ZnSO₄·7H₂O, CuSO₄·5H₂O, Al₂SO₄, MnSO₄, Li₂SO₄, MgCl₂·5H₂O, SbCl₃, Bi(NO₃)₃, KNO₃, AS₂O₃, CaCO₃, MoO₃, BaCl₂, AgNO₃ 等 18個 金屬을 對象으로 하여 最低 Ion 濃度를 10⁻⁸M 로 부터 最高 10⁻²M까지 添加하여 調査하였고 비

Table 1. Effect of metal ions on the Inulase activity of the enzyme from C-74 strain.

Metal name	Final conc.						
	10 ⁻⁸ M	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁴ M	10 ⁻³ M	10 ⁻² M
Control	0	0	0	0	0	0	0
HgCl ₂	+5.3	0	-21.0	-47.3	-57.9	-6.32	-78.9
CuSO ₄	0	+5.3	-15.7	-26.3	-26.3	-31.4	-52.6
MnSO ₄	-15.7	-21.0	-26.3	-31.4	-36.5	-47.3	-47.3
MgCl ₂	-0.2	-15.7	0	+10.5	+15.7	+10.5	+10.5
SbCl ₃	-10.6	-10.6	-5.3	+5.3	+10.6	0	-10.6
Bi(NO ₃) ₃	-15.7	-5.3	+10.6	+15.7	-5.3	-21.0	-31.4
AgNO ₃	+0.6	0	-5.3	-15.7	-31.4	-42.1	-47.3

(Unit: Relative Inhibition %)

Reaction Mixture; 0.5 ml of McIlvaine buffer solution (pH 3.0), 0.2ml of metal ion solution and 0.3 ml of enzyme solution were added to one ml of 0.5%-Inulin solution.

Enzymatic reaction was carried out at 55°C for 5 hrs.

較的 影響이 높은 金屬 ion 들에 對한 實驗 結果 는 다음 Table 1. 와 같았다.

Table 1. 에서 Bi⁺⁺⁺, Sb⁺⁺, Mg⁺⁺ Ion 은 低濃度 에서는 約10~20% 阻害하였으나 金屬 Ion의 最終 濃度 10⁻⁵M~10⁻⁴M에서는 約 10~20% 促進함을 나타내었으며, 더욱 Ion의 濃度가 높아짐에 따라 阻害하는 現象을 보였으며 反對로 Ag⁺⁺ Ion 은 低濃度에서는 促進하였으나 10⁻⁷M에서 부터는 急進의 阻害하는 現象을 나타내었다.

Mn⁺⁺, Cu⁺⁺等은 濃度에 關係없이 阻害하였으며 特히 10⁻²M 濃度에서는 約 50% 阻害되었다. 또 Hg⁺⁺는 他酵素에서와 같이 强하게 阻害함을 보였으며 特히 Hg⁺⁺添力濃度가 10⁻²M였을 때는 約 80% 阻害하였다.

要 約

本實驗에서 얻어진 結果를 要約하면 다음과 같다.

1) Inulin을 分解하는 酵素를 生産하는 *Aspergillus*屬 1株를 選別 하였다.

2) 選別된 苗株酵素的 E.P差에 의한 沈澱은 pH 8~5에서 酵素蛋白質이 多量回收되었다.

3) 選別된 苗株가 分泌하는 Inulase活性最適은 3.0部附近이었다.

4) 選別된 苗株의 Inulin 分解酵素的 活性最適溫度는 55°C였다.

5) 本 Sample酵素的 熱에 對한 安定性은 50°C에서 10分間 熱處理 하여도 安定하였다.

6) 本 Sample酵素的 安定 pH는 2.5~4.5程度였다.

7) 本 Sample酵素的 金屬 Ion에 對한 影響은

Mg⁺⁺는 Activator였으며 Sb⁺⁺⁺, Bi⁺⁺⁺는 低濃度에서는 inhibitor였으나 10⁻⁴M~10⁻⁵M濃度일 때는 促進시켰으며 더욱 金屬 ion濃度가 높아짐에 따라 inhibition 하였으며 Ag⁺⁺, Hg⁺⁺의 경우에는 低濃度(10⁻⁸M)일 때는 Activation하였고 反面, 濃度가 높아짐에 따라 阻害效果가 더욱 컸으며 特히 Hg⁺⁺의 경우 10⁻²M 濃度에서 約 80% 阻害를 나타 내었다.

文 獻

- Green, J. R. ; Ann. Bot. , 1223 (1887)
- Edelman, J. and Jefford, T. C. ; Bioche. J. , 88, 369 (1963)
- Shibuya, ; S. el. ; J. of Jap. Biochem. Soc. , 22, 189-91 (1950)
- 本江元吉, J. ; Agr. Che. Soc. Japan, 18, 981-6 (1942)
- Snyder, H. E. and Phaff, H. J. ; J. Biol. Chem. , 237, 2438-2441 (1962)
- Snyder, H. E. and Phaff, H. J. ; J. Microbiol. Serol. , 26 433-452 (1960)
- Adams, M. et al. ; J. Am. Che. Soc. , 65, 1396 (1943)
- Linder, P. ; Ws, Brau. , 17, 713 (1900)
- 朝井勇宣, 釀工. 16, 511 (1938)
- Biswasm M. M. ; Indian J. Appl. Che. , 26 (3) 56 (1963)
- Bourquelet, E. ; Comptes Rendus Acad. Sci. , 166, 1143 (1893)
- Boselli, J. ; Inst. Pastem Ammist. Pastem. 25, 695-704 (1912)

- 13) Biekel, A.; Ann. Inst. Pasteur, 28, 747-757 (1914)
- 14) Pringsheim, H. and Perewosky, R.; Z. Physiol. Chem., 153, 138-146 (1926)
- 15) Dedonder, R.; Bull Soc. Che. Biol., 34, 157 (1952)
- 16) Pringsheim, H.; Berg., 65, 1242 (1932)
- 17) Pringsheim, H. and Kohn, G.; E. Physiol. Chem., 133, 80-96 (1924)
- 18) Pigman, W. W.; J. Res. Natl. Stds., 30, 159 (1943)
- 19) Edelman, J.; Biochem. J., 49, 446 (1951)
- 20) Masta Mori.; J. of Japan Soc. Food Nutrition, 3, 209-214 (1951)
- 21) 中村豊彦; J. Agr. Chem. Soc.; Japan, 43, 9, 599 (1969)
- 22) 朝井勇宣; J. Agr. Chem. Soc.; 13, 1165 (1937)
- 23) 權徐, 崔榮浩, 教授 頌壽紀念論文集 331~348 (1971)
- 24) Shaffer, P. A., Somogyi, M.; J. Biol. Chem., 100, 695 (1933)