韓 國 菌 學 會 誌 第 11 卷 第 1 號
Kor. J. Mycol. Vol. 11, No. 1, 15~21, 1983

*Aspergillus ustus*의 Exo-dextranase의 특성에 관한 연구

李 建 柱·李 炯 煥
建國大學校 文理大 生物學科 分子微生物學教室

Characterization of Exo-dextranase from *Aspergillus ustus*

Kon-Joo Lee and Hyung-Hoan Lee
Molecular Microbiology Laboratory, Department of Biology, Kon Kuk University, Seoul 133, Korea

Abstract: Exodextranase from *Aspergillus ustus* was purified by chromatography and characterized by various conditions. The optimal pH of the purified dextranase was 6.5 and this enzyme was maximally activated at 40°C. The enzyme was stable at the temperature below 50°C. The enzyme was markedly inactivated by Hg^{2+}, Cu^{2+}, KCN and Co^{2+}, but Ba^{2+}, Fe^{2+}, cysteine, EDTA, and ascorbic acid enhanced the activity of the enzyme. The main products from the hydrolysis of dextran incubated with the dextranase were glucose, isomaltotriose and oligosaccharide. When dextran was incubated with the mixture of pullulanase and α-amylase, it was hydrolyzed into glucose, isomaltose and oligosaccharide. Polysaccharides in the decade teeth powder were hydrolyzed by the dextranase into glucose, isomaltotriose and oligosaccharides. In the hydrolysis of the teeth powder with the mixture of dextranase, pullulanase and α-amylase were proved to be simiar to the dextran hydrolysates.

Keywords: Exodextranase, *Aspergillus ustus*, Dextranase, Dextran, Decade teeth powder.

Dextranase (EC 3, 2, 1, 11)는 dextran을 분해하는 효소로 몇 종의 세균과 진균에 의해 생산되고 있다. 효소생산 균주의 종류에 따라 작용 특이성이나 분해산물의 차이를 보여주고 있다. 그 특징에 따라 endo-dextranase, exodextranase, α-1, 3-glucanase, α-glucosidase 등으로 나누게 되며 분해산물도 포도당만 유리시키는 효소(Tsuchiya *et al.* 1952; Zeuenhuizen, 1968), isomaltose, isomaltotriose와 glucose를 유리시키는 효소(Tsuchiya *et al.* 1952; Jeans *et al.* 1953), isomaltose와 isomaltotriose를 유리시키는 효소(Jeans *et al.* 1953) isomaltotriose 및 그 이상의 분자량을 가지는 oligosaccharide로 분해시키는 효소(Bailey *et al.* 1958), isomaltose만 유리시키는 효소(Sawai *et al.* 1974)가 보고되어 있다. 그 이외에 glucose와 isomaltose 및 isomaltodextrin(Statt *et al.* 1976)으로 분해하는 효소가 보고 되어 있다. 분해산물의 차이와 작용온도, pH, 중금속의 영향 등에 따라 효소의 특성을 구분하게 된다. 본 실험에서는 전보(Lee and Lee, 1983)에서 분리 정제한 *Aspergillus ustus*의 dextraease에 대한 특성을 조사한 결과를 보고한다.

材料및方法

효소액

전보(Lee and Lee, 1983)에서 정제한 Sephadex G-200의 유출액중 dextranase활성을 나타내는 부위를 사용하였다.

pH 안전성

덱스트란(Meito Sangyo Co.)를 녹여 pH를 4~10으로 조정하여 덱스트란의 최종농도가 2.5%가 되게 만든 후 이액 5ml에 효소액 0.1ml씩을 가하여 40°C 수욕에서 1시간 동안 반응시킨 후 유리환원당을 Somogyi 법(1945)으로 측정하였다.

열 안전성

0.01M 초산완충액(pH 6.0)에 녹인 덱스트란(2.5%) 용액 5ml에 효소액을 0.1ml씩 가한후 30°C에서 70°C

까지 10°C 간격으로 1시간동안 작용시켜 유리환원당을 측정하였으며 열 안전성은 초산완충액(pH 6.0) 1ml에 효소액 1ml를 가한후 50°C, 60°C, 70°C로 1시간동안 열처리시키며 잔존역가를 조사하였다.

금속이온 등의 영향

$Zn(AcO)_2$, $Mn(AcO)_2$, $Cu(AcO)_2$, $Co(AcO)_2$, $HgCl_2$, $Ba(AcO)_2$, $Pb(AcO)_2$, $AgNO_3$, $FeCl_2$, KCN, EDTA-2Na, ascorbic acid, glutathione 및 cysteine을 20mM농도로 증류수에 녹여 각 용액 1ml와 효소액 0.1ml를 섞어 40°C에서 1시간 처리한 후 효소의 역가를 조사하였다.

Dextranase에 의한 분해산물의 확인

Thin layer chromatography(T.L.C.)법과 Gas chromatography(G.C.)법을 병용하여 조사하였다. 기질로 덱스트란(Meito Sangyo Co.와 Sigma Co.)과 충치에 의해 발치한 치아 분쇄물을 사용하여 효소액으로 처리하였다. 대조로 포도당(Merck제)을 사용하였다. T.L.C.는 Silica gel 60F 254(Merck제 5×20cm)를 쓰고 전개용매는 n-batamol: ethanol: water(50:30:20)을 썼다. 발색제는 α-naphthol-sulfuric acid를 써서 105°C에서 10분간 발색시켰다. G.C.법은 효소분해물을 진공건조후 pyridine 2ml와 trimethylchlorosilane(TMCS) 1ml를 넣고 85°C에서 4시간 반응시킨 후 원심분리하여 상등액을 취하여 진공건조시킨 후 다시 pyridine 2ml와 TMCS 2ml를 넣고 silyation을 시켰다. 이 액을 원심분리하여 상등액을 취하여 진공건조시킨후 벤젠 1ml를 가하여 G.C.의 시료로 하였다. G.C.(Shimadzu 7 AG)의 조건은 OV-17 1.5%의 3m glass cloumn을 사용하여 주입구 온도는 320°C, column온도는 150°C에서 3분 정지 후 분당 10°C씩 상승시켜 300°C까지 승온분석을 하였다. 운반 gas는 N_2이며, 유속은 분당 30ml로 하고 감도는 10×32~256으로 하였다.

전분 분해 효소의 첨가 효과

위의 기질용액에 덱스트라나제를 가하여 분해시키고 동시에 pullulanase(ABM PS-1, 500)와 α-amylase (ABM)을 첨가 또는 단독으로 사용하여 덱스트란에 대한 분해효과를 조사하였다. 조사방법은 위의 T.L.C.법과 G.C.법에 따랐다.

實驗結果및考察

pH 안정성

*Aspergillus ustus*의 pH에 따른 영향은 Fig. 1에서 보는 바와 같이 pH 6.0과 pH 7.0에서 거의 같은 분

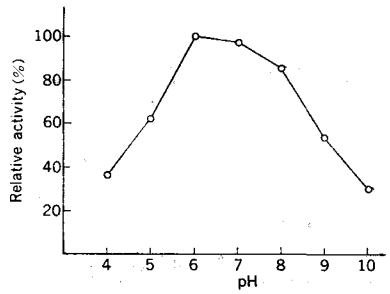

Fig. 1. Effect of pH on the activity of *Asp. ustus* dextranase.
Dextran was dissolved in 0.01M acetate buffer solution of the indicated pH values to give a final concentration of 2.5%. To 5ml of the substrate was add 0.1ml of the enzymes and the reaction mixture was incubated at 40°C for 1 hr.

해능을 나타내서 최적 pH는 6.5부근으로 추정된다. Hiraoka 등(1972)이 보고한 *Asp. carneus*의 dextranase는 pH 5.0~5.5에서 최적이었고 Sugiura 등(1973)이 보고한 *Pen. funiculosum*의 dextranase는 pH 6.0에서 최적이었다. 그이외의 *Fusobacterium*(daCosta 등 1974)과 *Bacteroides ochraceus*(Statt *et al.* 1976) 등의 대부분의 dextranase는 pH 4~7의 약산성에서 안정성을 보인다고 보고되어 있고, *Brevibacterium*(Yamaguchi *et al.* 1973)에서는 pH 8.0의 약 알카리에서 최적조건을 나타낸다고 보고되어 있다.

온도에 따른 영향

본 효소의 최적온도는 Fig. 2에서 보는 바와 같아

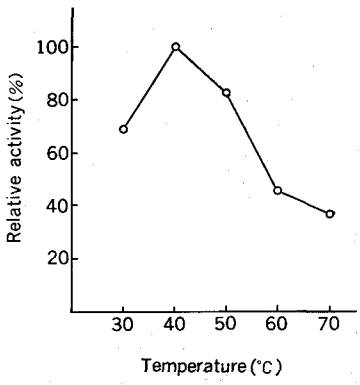

Fig. 2. Effect of temperature on the activity of *Asp. ustus* dextranase. The reaction mixture in 0.01M acetate buffer (pH 6.0) was incubated for 1 hr. at various temperatures. The substrate concentration was 2.5%.

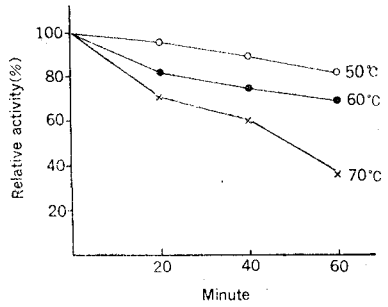

Fig. 3. Effect of temperature on the stability of *Asp. ustus* dextranase.
The enzyme solution in 0.01M acetate buffer (pH 6.0) was incubated at various temperature. After 20, 40, and 60 minutes, it was cooled and subjected to the assay of residual activity by the Somogyi method.

40°C였으며 30°C~50°C에서 비교적 분해능이 좋았다. 열에 대한 안전성은 Fig. 3에서 보는 바와 같이 50°C에서 열처리한 경우 1시간후 약 91%의 잔존역가를 나타내 50°C 이하에서는 비교적 안정한 것으로 나타냈으나 70°C에서 1시간후는 약 38%의 잔존역가를 나타냈다. *Lactobacillus bifidus*(Bailey *et al.* 1959)의 dextranase는 40°C~50°C에서 안정하며, *Asp. carneus*의 효소는 60°C에서 최적이며, *Brevibacterium*효소는 53°C에서, *Pen. funiculosum*의 효소는 pH6.0에서 최적으로 보고 되어 있고, *Streptococcus mutans*(Guggenheim *et al.* 1974)의 효소는 37°C가 최적으로 보고되어 있다.

금속이온 등의 영향

Table I에서 보는 바와 같이 cysteine, EDTA 및 ascorbic acid 처리에서 효소활성이 약간 상승하였으나 Cu^{2+}, KCN과 Co^{2+} 등은 약간의 저해 작용을 나타냈으며, Hg^{2+}는 거의 완전한 저해작용을 나타냈다. *Aps. carneus*의 dextranase는 Hg^{2+}에 의해서 완전저해 작용을 받으며 Ag^{2+}, Cu^{2+}, Fe^{3+}에서 저해작용이 약간 있었고, EDTA, PCMB, ascorbic acid, glutathion 및 cystein 에서 상승작용을 나타낸다고 보고되어 있으며(Hiraoka et al. 1972), *Pen. funiculosum*의 dextranase는 Ag^{2+}, Hg^{2+} M-bromosuccinimide 및 iodine 에서 저해작용을 Co^{2+}, Mn^{2+}, Cu^{2+}에서 상승작용을 나타낸다고 보고(Sugiura, 1973)되어 있어 금속이온에 따른 활성의 차이를 보여준다.

Table I. Effect of some metal-salts, chelators and other chemicals on activities of dextranase.

Chemicals	Remaining activity(%)	Chemicals	Remaining activity(%)
None	100	$AgNO_3$	92
$Zn(AcO)_2$	94	$FeCl_2$	69
$Mn(AcO)_2$	98	KCN	72
$Cu(AcO)_2$	82	EDTA	118
$Co(AcO)_2$	90	Ascrobic acid	105
$HgCl_2$	4	Glutathione	97
$Ba(AcO)_2$	87	Cysteine	104
$Pb(AcO)_2$	96		

* One ml of enzyme was mixed with 0.5ml of 20mM test solution at pH 6.0 after incubation at 40°C for 1 hour.

Dextranase 활성에 의한 분해 산물

*Asp. ustus*의 dextranase에 의한 dextran (Meito Sangyo Co.) 분해산물은 Fig. 4에서 보는 바와 같이 glucose와 isomaltotriose로 측정되는 부위와 그 이상의 분자량을 가지는 oligosaccharide로 구성되어 있으며 pullulanase와 α-amylase을 혼합하여 분해시킬 경우 isomaltose로 추정되는 부위가 분해산물로 나타났으며, 고분자량을 가지는 물질이 감소된 것으로 나타났다. dextran(Sigma Co) 역시 Fig. 5에서 보는 바와

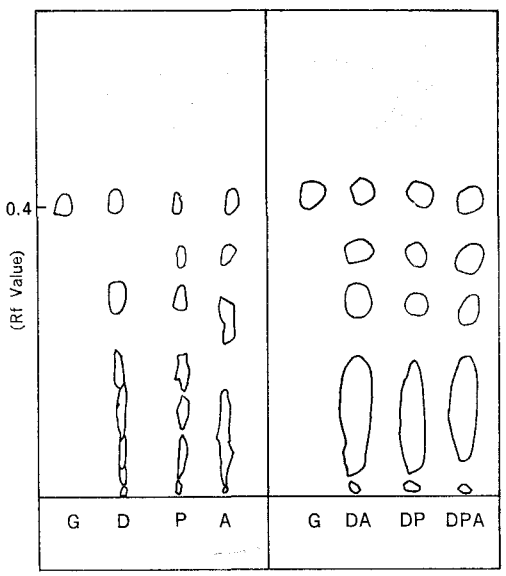

Fig. 4. Thin-layer chromatgraphy of reaction products resulting from degradation of dextran (Meito Sangyo Co.) by purified *Asp. ustus* dextranase.
G: standard glucose D: dextranase
P: pullulanase A: α-Amylase
DA: D+A, DP: D+P, DPA: D+P+A

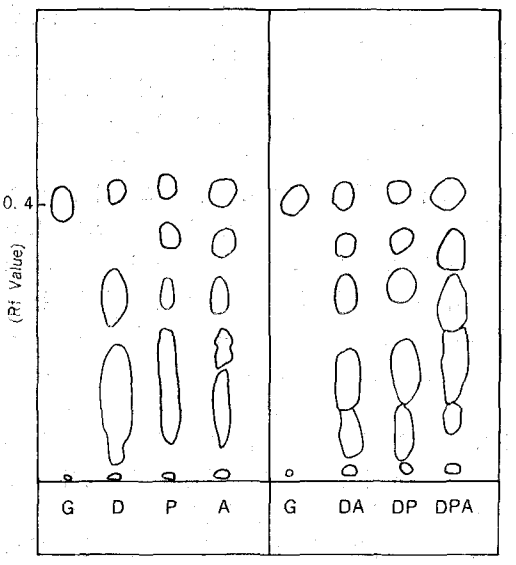

Fig. 5. Thin-layer chromatography of reaction products resulting from degradation of dextran (Sigma) by purified *Asp. ustus* dextranase.
G: standard glucose D: dextranse
P: pullulanase A: α-amylase
DA: D+A, DPA: D+P+A, DP: D+P

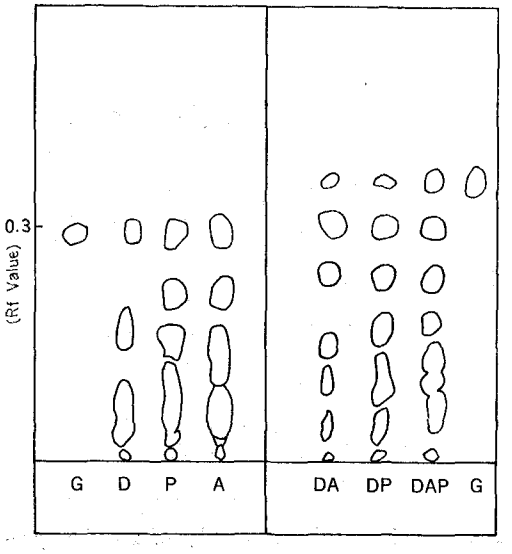

Fig. 6. Thin-layer chromatography of reaction products resulting from degradation of teeth power by purified *Asp. ustus* dextranase.
G: standard glucose P: pullulanase
D: dextranase A: α-amylase
DA: D+A, DP: D+P, DPA: D+P+A

같은 Meito Sangyo Co.의 dextran의 분해산물과 유사한 것으로 나타났다. G.C.법으로 *dextranase*에 의한 dextran 분해물을 조사한 결과 Fig. 7과 Fig. 8에서 보는 바와 같이 glucose 부위와 isomaltotriose 부위가 확인되었다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 치아분쇄물에 dextranase와 pullulase를 혼합하여 처리한 경우 isomaltose 부위가 확인되었으며, Fig. 11에서 보는 바와 같이 pullulanase 및 α-amylase를 추가한 경우 분해산물의 구성이 glucose 부위가 증대되고 isomaltose 부위와 isomaltotriose 부위의 분리가 잘 되었다. 이러한 결과로 보아 *Asp. ustus*의 dextranase는 dextran으로 부터 glucose와 isomaltotriose 및 그 이상의 분자량을 가지는 oligosaccharide를 유리시킨다. 초기의 연구에서 *Asp. niger*의 dextranase는 glucose만 유리시키고 그 이외의 곰팡이는 대부분 isomaltose, glucose 및 isomaltotriose를 유리시킨다고 보고되었다(Tsuchiya *et al.*

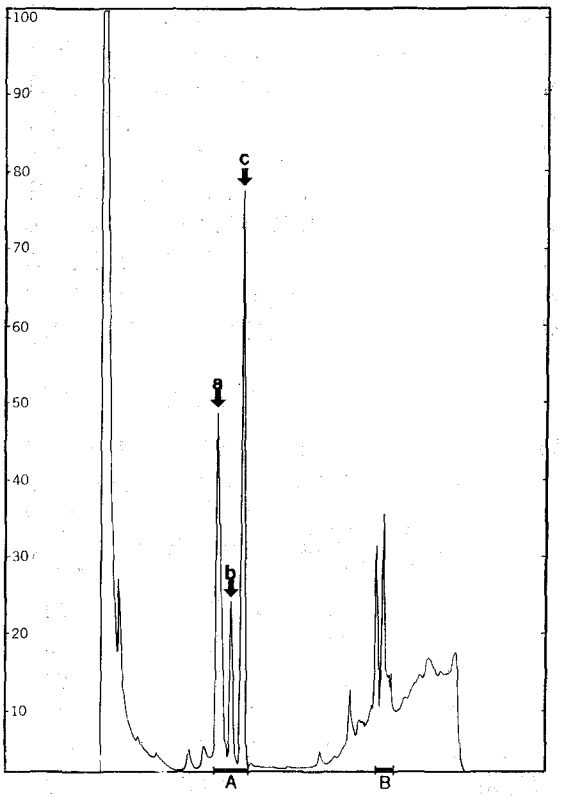

Fig. 7. Gas chromatogram of silylated reaction products resulting from degradation of dextran (Meito Sangyo Co.) by purified *Asp. ustus* dextranase.
A: glucose B: isomaltotirose
a: α-glucose b: γ-glucose c: β-glucose

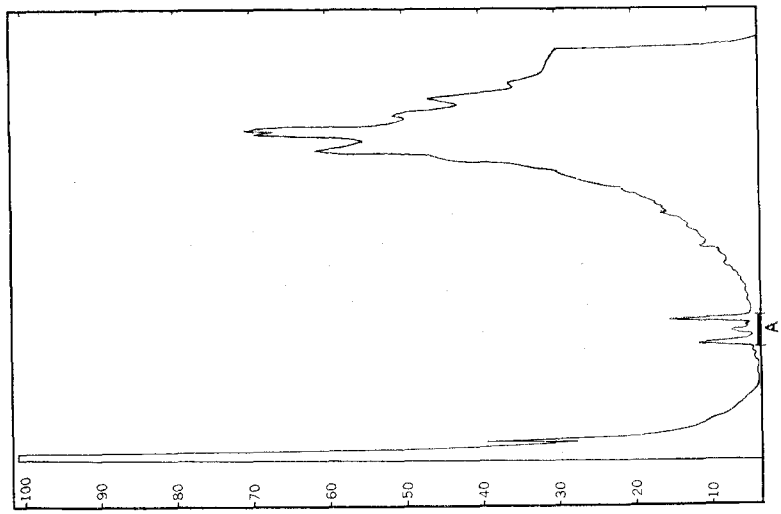

Fig. 10. Gas chromatogram of silylated reaction products resulting from degradation of teeth powder by α-amylase.
A: glucose

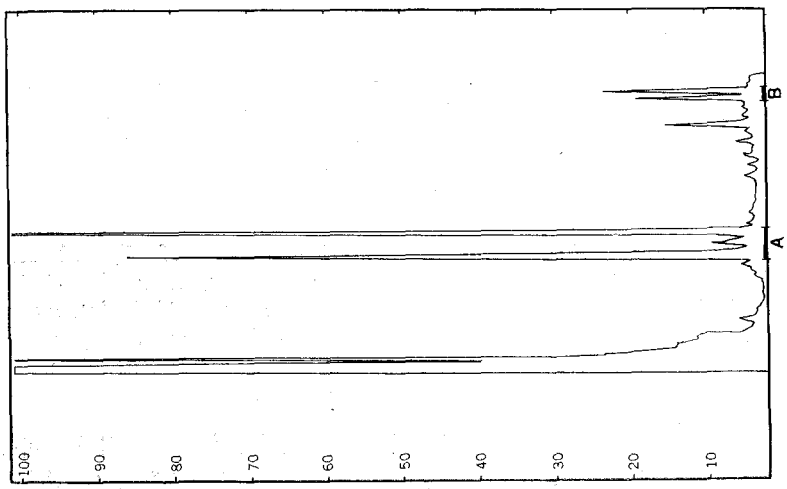

Fig. 9. Gas chromatogram of silylated reaction products resulting from degradation of teeth powder by purified *Asp. ustus* dextranase.
A: glucose B: isomaltotriose

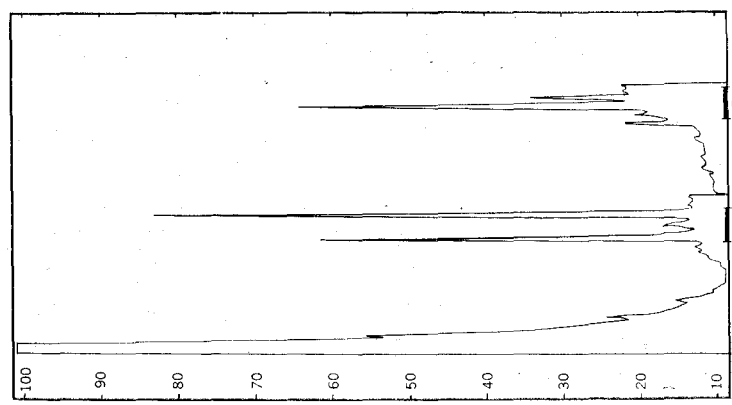

Fig. 8. Gas chromatogram of silylated reaction products resulting from degradation of dextran (Sigma Co.) by purified *Asp. ustus* dextranase.
A: glucose B: isomaltotriose

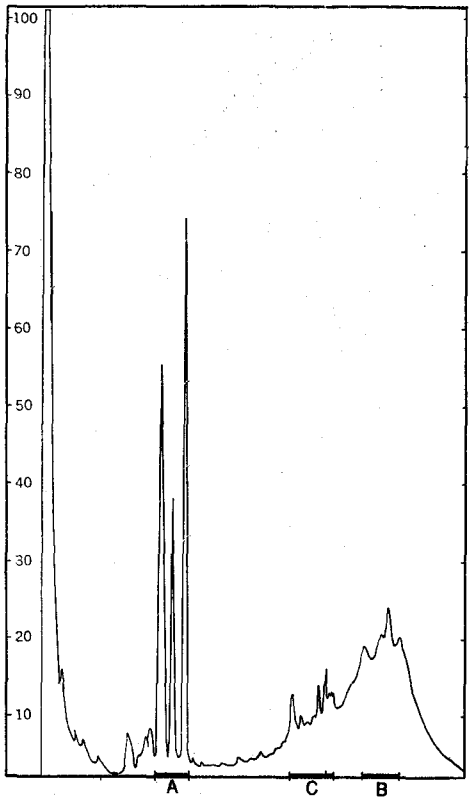

Fig. 11. Gas chromatogram of silylated reaction products resulting from degradation of teeth powder by purified *Asp. ustus* dextranase and pullulanase.
A: glucose B: isomaltotriose
C: isomaltose

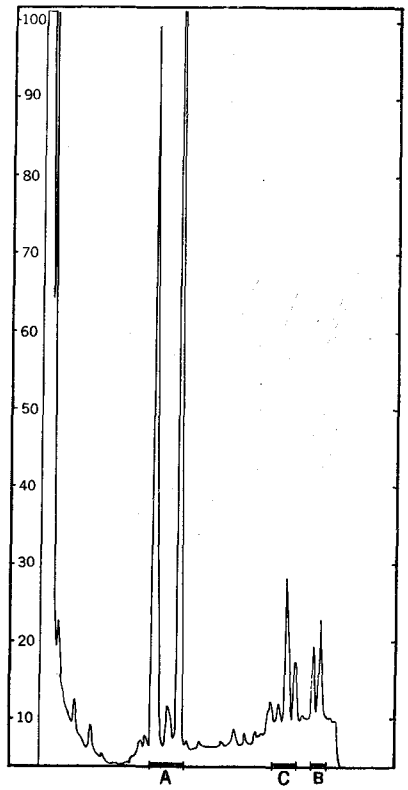

Fig. 12. Gas chromatogram of silylated reaction products resulting from degradation of teeth powder by purified *Asp. ustus* dextranase, pullulanase and α-amylase.
A: glucose B: isomaltotriose
C: isomaltose.

1952; Jeans *et al.* 1953). 그후 *Pen. purpurogenum* 은 α-1,6결합을 절단한다고 보고했으며(Berkei *et al.* 1977), *Pen. purpurogenum*의 dextranase는 isomaltose에는 작용하지 않고 isomaltotriose를 느리게 가수분해하며, isomaltoterose에 작용할 경우는 용이하게 2mole의 isomaltose로 분해시킨다고 보고했다(Minakova *et al.* 1977). *Asp. ustus*의 dextranase의 특징은 isomaltose를 유리하지 않고 glucose, isomaltotriose와 oligosaccharide가 유리되는 점이다.

摘 要

정제된 *Aspergillus ustus*의 dextranase 특성을 조사하기 위하여 최적 pH 최적온도 및 열 안정성 금속이온의 영향 및 분해산물을 조사하였다. 기질로는 dextran을 사용했다. 조사결과 dextranase의 활성 최적 pH는 6.5였으며, 작용 최적온도는 40°C이고, 30°C~50°C에서 비교적 분해능이 좋았고, 열 안전성은 50°C에서 1시간 처리한 경우 약 91%의 잔존역가를 나타내고, 70°C에서는 약 38%의 잔존역가를 나타내 50°C까지는 안정한 것으로 나타났다. 금속이온 등의 영향은 cysteine, ascorbic acid와 EDTA에서 상승작용을 나타냈고, Cu^{2+}, KCN, Co^{2+}에서는 약한 저해 작용을 나타내고, Hg^{2+}는 완전히 저해되었다.

덱스트란을 분해시킨 분해산물은 glucose와 isomaltotriose 및 그 이상의 분자량을 가지는 oligosaccharide로 구성되어 있고, 치아부착 다당류에 대한 분해도 덱스트란과 유사하였다.

References

Bailey, R.W. and Clarke, R.T.J. (1958): A bacterial dextranase. *Biochem. J.* **72**:49.

Berki, L., Preobrazhenskaya, M.E. and Nanasi, P. (1977): Investigations of a mould dextranase. *Proc. Hung. Anna. Meet. Biochem.* **17**:73.

daCosta, T.L., Bier, C. and Gaida, F. (1974): Dextran hydrolysis by a *Fusobacterium* strain isolated from human dental plaque. *Arch. Oral. Biol.* **19**: 341.

Guggenheim, B. and Burkhardt, J.J. (1974): Isolation and properties of a dextranase from *Streptococcus mutans* OMZ 176. *Helv. Odont. Acta.* **18**: 101.

Hiraoka, N., Fukumoto, J. and Tsuru, D. (1972): Studies on mold dextranases. III. Purification and some enzymatic properties of *Aspergillus carneus* dextranase. *J. Bicchem.* **71**:57.

Jeans, A. Wilham, C.A., Jones, R.W., Tsuchiya, H.M. and Rist, C.E. (1953): Isomaltose and isomalotriose from enzymatic hydrolyzates of dextran. *J. Amer. Chem. Soc.* **75**:5911.

Lee, K.J. and Lee, H.H. (1983): Purification of exo-dextranase from *Aspergillus ustus*. *Kor. J. Mycol.* **11**:10.

Minakova, A.L. and Preobrazhenskaya, M.E. (1977): Properties and specificity of the action of dextranase from *Penicillum Biokhimiya* **42**:1264.

Sawai, T., Toriyama, K. and Yano, K. (1974): A bacterial dextranase releasing only isomaltose from dextrans. *J. Biochem.* **75**:105.

Staat, R.H. and Schachtele, C.F. (1976): Analysis of the dextranase activity produced by an oral strain of *Bacteroides ochraceus*. *J. Dent. Res.* **55**: 1103.

Somogyi, M. (1945): A new reagent for the determination of sugars. *J. Biol Chem.* **160**:61.

Sugiura, M., Ito, A., Ogiso, T., Kato, K. and Aseno, H. (1973): Studies on dextranase. Purification of dextranase from *Penicillum funculosum* and its enzymatic properties. *Biochem. Biophys. Acta.* **309**:357.

Tsuchiya, H.M., Corman, J. and Montgomery, E.M. (1949): Hydrolysis of the α-1, 6-glucosidic linkage in isomaltose by culture filtrate of *Aspergillus niger* NRRL 330. *J. Am. Chem. Soc.* **71**:3265.

Yamaguchi, T. and Gocho, S. (1973): Production and properties of alkaline dextranase from a newly isolated *Brevibacterium*. *Agr. Biol. Chem.* **37**:2527.

Zevenhuizen, L.P.T.M. (1968): Cell-bound exodextranase of *Bacillus* species. *Carbohyd. Res.* **6**:310.

〈Received February 20, 1983〉