

## *Kluyveromyces marxianus*가 분비하는 inulase에 대한 연구

柳然禹 · 金信悌 · \*金秀一

亞洲大學校 工科大學 生物工學科

\*서울大學校 農科大學 農化學科

(1984년 2월 10일 수리)

### Study of Inulase from *Kluyveromyces marxianus*

Yeon-Woo Ryu, Shin-Je Ghim and \*Su-Il Kim

Dept. of Biotechnology, Ajou University, Suwon, Korea.

\*Dept. of Agricultural Chemistry, S.N.U., Suwon, Korea.

#### Abstract

*Kluyveromyces marxianus* LG contains an inulase activity which is inducible by growth on inulin. The highest enzyme activity obtained at the initial stage of stationary phase of growth curve.

The partially purified inulase hydrolyzed inulin, sucrose and raffinose. This enzyme showed the maximal activity at pH 4.0 and temperature of 55°C for inulin and sucrose. It was also markedly inhibited by Hg<sup>++</sup> and Ag<sup>+</sup> but not EDTA. This inulase was characterized as a endo-type which contains invertase activity and Km values for inulin and sucrose were 1.2×10<sup>-2</sup>M and 1.3×10<sup>-4</sup>M, respectively.

#### 서 론

Inulase(EC3, 2, 1, 7; 2, 1-β-D-Fructan furanohydrolase)는 inulin의 β-D-fructoside 결합을 가수분해할 수 있는 효소로서<sup>1)</sup> 1887년 Green이 발아중인 돼지감자(*Helianthus tuberosus* L.)의 glycerol 추출물로부터 그 존재를 확인한 이래, inulin을 저장 탄소로 하는 식물<sup>2~4)</sup>과, 세균<sup>5,6)</sup>, 효모<sup>7~14)</sup>, 곰팡이<sup>15~18)</sup> 등의 미생물에 널리 존재함이 밝혀졌다.

이중 미생물 inulase의 생성은 inulin을 탄소원으로 이용할 경우 다른 탄소원일 때보다 생성이 훨씬 증가되는 inducible enzyme<sup>7, 11~13, 17)</sup>으로서 세포외와 세포내의 두 종류가 있으나 두 효소의

특성이 거의 동일하며,<sup>9)</sup> 세포내 효소는 cell wall에 존재함이 보고 되었다.<sup>11~14)</sup>

분리 정제된 inulase의 일반적인 특성에서 식물에 존재하는 inulase<sup>2~4)</sup> 및 *Streptomyces chibensis* inulase<sup>6)</sup>의 기질특성은 inulin에 대해서만 활성이 크고 sucrose나 raffinose에 대해서 활성이 거의 없으며, 이들의 작용특이성은 *Arthrobacter ureafaciens*<sup>5)</sup>와 같이 endo-type로서 inulin 분해 산물은 여러 종류의 inulo-oligosaccharides 들이 생성됨이 보고 되었다. 반면 거의 모든 효모<sup>7~14)</sup>와 일부 곰팡이<sup>15, 18)</sup> inulase는 inulin 뿐만 아니라 sucrose raffinose 등도 가수분해 하며, 각 기질에 대한 활성비는 균주에 따라 다르게 나타난다. 특히 효모 inulase의 일반적인 특성중에서 열에 대한 안정성,<sup>10)</sup> 최적 pH,<sup>13)</sup> 최적온도.<sup>12, 13)</sup> 억제제<sup>10)</sup>

및 활성제<sup>13)</sup> 등의 영향이 기질을 inulin이나 sucrose로 하였을 때 거의 동일한 뿐만 아니라 분리 정제의 각 과정에서 두 기질에 대한 활성비가 항상 일정하며, 전기영동에 의하여 순수분리 하였을 때 단일 band로 나타났음을 보여 주었다.<sup>8)</sup> 또한 이들의 작용특이성은 exo-type로서 inulin의 비환원성 말단부터 fructosyl unit로 가수분해 하여 fructose가 생성 된다고 보고하였다.<sup>8, 12-14)</sup>

이에 본 연구는 돼지감자 괴경<sup>15)</sup> 등에 풍부하게 존재하는 inulin으로부터 감미물질중의 하나인 과당 생산을 위하여 *Kluyveromyces marxianus*의 inulase 생성조건을 검토하고, 이 효소를 부분 정제하여 그 특성을 연구 하였다.

### 실험재료 및 방법

#### 실험재료

시약 : Inulin은 Merck, Fructose, Bovine Serum Albumin은 Sigma, Yeast Nitrogen Base (YNB)는 Difco, Sucrose는 Hayashi, Raffinose는 Serva 재를 사용하였으며, 기타 다른 일반시약은 시약용 등급 또는 일급을 사용하였다.

균주 : 11 종의 효모를 검토하여 가장 강력한 inulase를 분비하는 *Kluyveromyces marxianus* LG를 사용하였다.

배지 : 효소 생성용 Inulin-YNB 배지는 500ml 진탕 삼각 플라스크에 50ml의 증류수와 0.1M phosphate buffer (pH 5.5) 20ml을 넣고 121°C에서 15분간 가압 멸균한 후 여기에 미리 0.45μm pore의 membrane filter (Toyo Rochi 사)를 사용하여 여과 멸균한 2.5ml inulin 용액 20ml와 7% YNB 용액 10ml을 첨가하여 제조하였다.

#### 효소의 활성도 측정

Inulin 분해력 : 2.5% inulin 용액 0.2ml에 증류수 1.4ml와 pH 4.0인 0.1M acetate buffer 0.2ml를 넣고 30°C 항온수조에서 정온시킨 후 효소액 0.2ml을 첨가하여 10분간 진탕하면서 반응시킨 다음 즉시 Somogyi 시약을 첨가하여 반응을 중단시키고 유리된 fructose를 Somogyi-Nelson 법<sup>20)</sup>으로 측정하였다. 효소의 단위는 30°C에서 1 μmole의 환원당(fructose)을 1분간에 생성하는 것을 1 unit로 하였고 효소의 활성도는 효소액 1 ml 당의 효소단위로 정의하였다.

Sucrose 분해력 : 0.7 ml 증류수에 2.5% suc-

rose 용액 0.1 ml와 pH 4.0인 0.1M acetate buffer 0.1 ml를 가하여 30°C 항온조에서 정온시킨 뒤 효소액 0.1 ml를 첨가하여 10분간 진탕 반응시킨 후 즉시 100°C 수조에서 5분간 가열하여 반응을 중단시키고 유리된 환원당을 DNS법<sup>21)</sup>으로 측정하였다. 효소의 활성도는 1분간에 2 μmole의 환원당을 생성하는 것을 1 unit로 하여 효소액 1ml 당의 효소단위로 정의하였다.

#### 단백질 농도 측정

Bovine Serum Albumin을 표준치로 하여 Lowry et al<sup>22)</sup> 방법에 의하여 측정하였다. 또한 크로마토그래피의 분획들은 상대적인 단백질의 양을 UV Spectrophotometer (Hitachi 사)로 280nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 효소의 생성

배양 시간에 따른 효소의 생성은 Inulin-YNB 배지에 균을 1% (v/v) 접종하여 30°C에서 110 rpm으로 진탕 배양하면서 배양시간 경과에 따른 균수의 증가와 효소의 생성 경향을 조사하였다. 또한 여러가지 탄소원에 따른 inulase의 생성에 미치는 영향은 Inulin-YNB 배지에 inulin 대신 각각의 탄소원을 1%가 되도록 가하여 24시간 배양한 후 효소의 생성을 검토하였다. 이때 균수는 Hematometric count 법에 의하여 측정하였으며 이를 표준값에 의하여 균체량으로 환산하였다.

#### 효소의 정제

24시간 배양시킨 배양액을 2,000×g로 15분간 냉동 원심분리하여 얻은 상등액을 조효소로 사용하였다. 이 조효소액에 영하 30°C의 에탄올을 병동기에서 천천히 교반하면서 최종 에탄올 농도가 70%가 되도록 가하여 24시간 정지시킨 후 상등액을 버리고 남은액을 10,000×g에서 10분간 냉동 원심분리(-20°C)시킨 후 침전물을 소량의 증류수로 녹여 0.01M acetate buffer (pH 4.0)로 4°C에서 24시간 투석시켰다.

투석시킨 효소액을 DEAE-cellulose column에 흡착시키고, 100ml 이상의 0.01M acetate buffer (pH 4.0)을 통과시켜 흡착되지 않은 물질을 세척한 다음, 동일 완충용액과 1N NaCl의 gradient로 20ml/hr 유속으로 용출시켜 5ml씩 받아 각 분획마다 inulin과 sucrose에 대한 효소활성 및 단백질량을 측정하였다.

효소의 일반적인 특성

최적 pH, 최적온도, 60분간 열처리했을 때의 열에 대한 안정성, 10<sup>-6</sup>M의 금속이온 첨가에 대한 영향, 기질특이성 등은 상법에 따라 검토하였다. 반응특이성은 시간별로 반응시킨 반응물을 박층크로마토그래피 판(20×20cm)에 5μ씩 점을 찍은 후 chloroform과 methanol을 6:4로 하여 5시간 전개하였다. 이를 상온에서 건조시킨 뒤 Thymol 발색시약 (5ml Conc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>+0.5g thymol in 95ml ethanol)을 분무한 다음 120°C에서 20분간 정치하여 분홍색으로 발색시켰다.

결과 및 고찰

효소의 생성

배양 시간에 따른 세포 성장과 inulase 생성에서 세포 성장의 초기부터 inulase가 생성되기 시작하여 균체량이 증가됨에 따라 비례하여 생성되다가 세포 성장의 정지기가 시작되는 배양 시간에서 최대인 0.12unit/ml의 활성도를 나타낸 후 감소하기 시작하였다(Fig. 1). 이는 *K. marxianus* inulase가 세포 성장과 동시에 생성되는 것으로 보아 *C. salmanticensis*<sup>11)</sup>나 *P. polymorpha*<sup>12)</sup> inulase와 같이 cell wall에 존재하면서 inulin이 탄소원일때 쉽게 배지로 분비됨을 알 수 있었으며, invertase의 생성은 inulase의 생성 곡선과 거의 비례적으로 동일하였다.

탄소원에 따른 효소의 생성을 보면 *K. marxianus*는 여러가지 탄소원 중에서 inulin을 탄소원

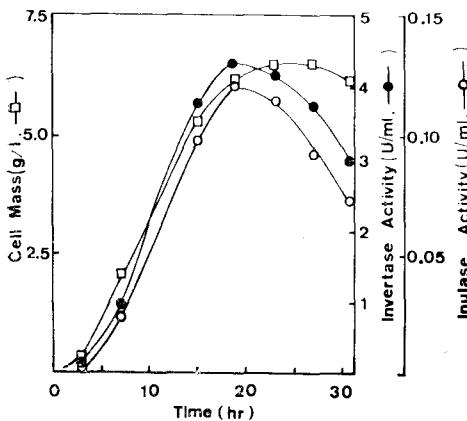


Fig. 1. Production of cell mass and inulase during *K. marxianus* culture on Inulin-YNB media.

Table 1. Effect of various carbon source on the production of inulase.

Various carbon source	Enzyme activity (unit/ml) on	
	Inulin	Sucrose
Inulin	0.121	5.46
Raffinose	0.067	1.25
Sucrose	0.043	0.82
Fructose	0.011	0.79
Dextrose	0.014	0.66
Raffinose+Inulin	0.099	5.67
Sucrose+Inulin	0.086	4.43
Fructose+Inulin	0.076	5.40
Dextrose+Inulin	0.081	4.15

으로 할때 inulase 생성이 최대값을 나타내었다 (Table 1). 이는 보고된 대부분 효모 inulase<sup>7,11-13)</sup>와 같이 *K. marxianus* inulase도 inulin에 의하여 생성이 증가되는 inducible enzyme임을 알 수 있었다. 또한 탄소원이 β-fructoside 결합을 가진 raffinose나 sucrose 일때는 inulin 일때보다 효소 생성이 적게 나타났는데, 이는 Snyder et al<sup>12)</sup>의 보고와 동일하였다. 반면 glucose나 fructose가 탄소원일 경우의 inulase 생성은 매우 적었으며, 이는 이들이 inulase 생성을 억제한다는 많은 보고<sup>11-13)</sup>와 동일하였다.

효소의 정제

조효소액에 에탄올을 첨가하여 침전된 효소를

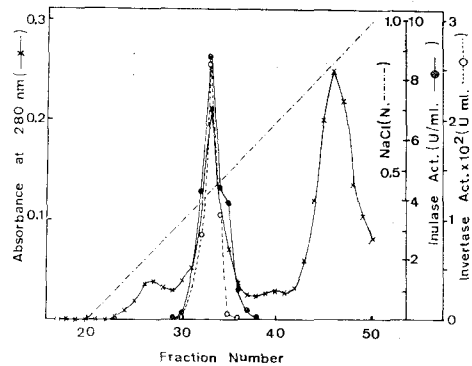


Fig. 2. Ion exchange chromatography of inulase from *K. marxianus* on DEAE-Cellulose.

Column size; 2.5×35cm, flow rate; 20ml/hr, fraction volume; 5ml, elution buffer; 0.01M acetate buffer (pH 5.0), salt gradient; 1N NaCl.

Table 2. Purification of inulase

Step	Volume (ml)	Protein ( $\mu\text{g/ml}$ )	Total activity (U) on		Specific activity (U/mg protein) on		Yield (%)	Purification fold
			Sucrose	Inulin	Sucrose	Inulin		
Culture broth	285	87	3,431	128	153	5.7	100	1.0
DEAE-Cellulose chromatography	15	263	2,264	85	612	22.6	66	4.0

투석시킨 후에 효소액을 DEAE-cellulose에 흡착시켜 염으로 용출시킨 결과는 Fig. 2와 같으며, inulin과 sucrose 기질에서 효소활성 peak가 같은 위치에서 나타났다. 이는 *K. fragilis*<sup>17)</sup>을 비롯한 많은 효소의 inulase가 분리과정에서 inulin과 sucrose에 대한 효소 활성 peak가 같은 위치에 존재한다는 보고와 같다. 따라서 *K. marxianus* inulase도 하나의 효소로 되어 있으면서 inulin과 sucrose에 대한 활성을 함께 가지고 있는 것으로 추정되며, 이는 또한 효소의 정제도(Table 2)가 inulin과 sucrose에 대하여 동일하고, 효소의 생성 곡선(Fig. 1)에서 역시 두 기질에 대한 효소 활성이 비례적으로 동일한 것으로도 알 수 있다.

부분 정제된 효소의 일반적인 특성

최적 pH: 기질 용액의 pH를 2.6~9.0으로 조절하여 inulin과 sucrose에 대한 효소의 활성도를 측정된 결과 Fig. 3과 같다. 결과에서 *K. marxianus* inulase는 pH 4.0에서 inulin과 sucrose에 대하여 똑같이 가장 높은 효소활성을 나타내었다. 이는 *D. cantavellii*<sup>11)</sup>, *D. phaffii*<sup>13)</sup>의 최적 pH가 4.0인 것과 inulin과 sucrose 기질에 대한 최적 pH가 동일하다는 것에도 일치하였다.

온도의 영향: *K. marxianus*가 분비하는 inulase의 각 온도에서의 효소 활성은 inulin과 sucrose에서 비슷하게 나타났다. 즉 20°C에서부터 온

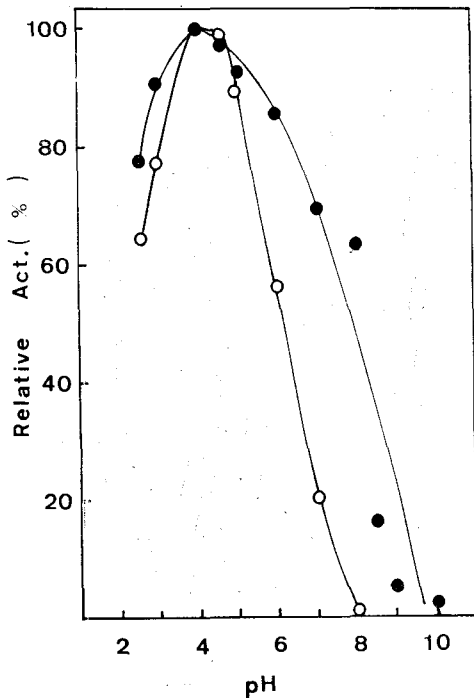


Fig. 3. Effect of pH on inulase activity; inulin (—○—), sucrose (—●—).

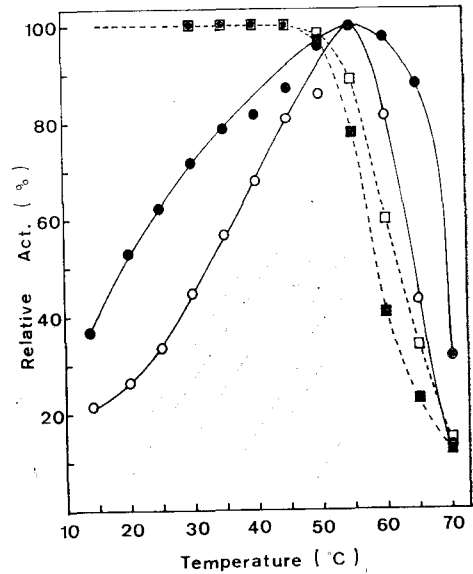


Fig. 4. Temperature-activity profile and heat stability of inulase. For heat stability experiments the enzyme was preincubated for 60min. at different temperature.

Temperature-activity profile: inulin (—○—), sucrose (—●—)  
Heat stability; inulin (---□---), sucrose (---■---).

도 증가에 따라 각 기질에 대한 효소활성이 50°C 까지 일정한 값으로 증가 하였으며, 이 사이에서 Arrhenius plotting에 의한 inulin과 sucrose 기질에 대한 활성화 에너지는 각각 8.2kcal/mole과 3.3kcal/mole 이었고, 두 기질에 대한 최적 활성 온도는 55°C로 동일하였다(Fig. 4). 이는 *K. fragilis* inulase의 최적 온도가 55°C인 것과 동일하였으나, 다른 효모 inulase<sup>10-14</sup>의 최적 온도가 45°C~50°C로 보고된 것보다 약간 높았다.

한편 열에 대한 안정성(Fig. 4)은 45°C 이하에서는 60분까지 매우 안정하였으며, 50°C 이상부터는 효소의 활성이 감소하였으나 70°C에서 60분간 처리하여도 완전히 불활성화 되지는 않았고, 대체로 inulin에 대한 활성이 sucrose에서 보다 열에 더 안정하였다.

금속이온의 영향 : 여러가지 금속이온에 대한 효소활성의 영향은 Table 3과 같다. 금속의 chelating agent인 EDTA는 효소의 활성에 거의 영향을 주지 못했으므로 이 효소는 금속이온을 활성제로 필요로하지 않음을 알 수 있었다. 반면 Hg<sup>++</sup> 이온은 inulin과 sucrose 두 기질에 대한 효소활성을 100% 억제시켰고, Ag<sup>+</sup> 이온은 70% 이상 억제시켰다. 이는 *S. chibaensis*<sup>6</sup>, *C. kefyr*<sup>9,10</sup>, *Penicillium* sp<sup>15</sup>, *Asp. niger*<sup>16</sup> 등의 미생물 inulase가 정도의 차이는 있으나 다같이 Hg<sup>++</sup>, Ag<sup>+</sup>에 의하여 효소활성이 크게 억제된다는 보고와 동일하였다. 그러나 그의 다른 금속이온은 다소의 차이가 있기는 하나 inulin과 sucrose의 분해에 대하여 별다른 영향을 주지 못했다.

Table 3. Effect of various metal ions on inulase activity

Metal ions	Relative activity (%) on	
	Inulin	Sucrose
None	100	100
*EDTA	105	98
Fe <sup>++</sup>	108	103
Co <sup>++</sup>	95	105
Mg <sup>++</sup>	106	105
Ca <sup>++</sup>	98	109
Zn <sup>++</sup>	90	103
Ag <sup>+</sup>	20	31
Hg <sup>++</sup>	0	0

\*EDTA; Ethylenediaminetetraacetate

Table 4. Substrate specificity of inulase

Substrate	Relative activity (%)
Sucrose	100
Raffinose	19.8
Inulin	4.3

기질특이성 : inulin, sucrose, raffinose를 기질로하여 효소반응을 시킨 결과 Table 4와 같으며, sucrose의 분해력을 100으로하여 상대적으로 표시하였다.

sucrose와 raffinose의 분해력이 inulin 분해력보다 매우 큰 것으로 보아 다른 효모 inulase<sup>8,11-14</sup>와 마찬가지로 *K. marxianus* inulase도 invertase ( $\beta$ -D-fructofuranoside fructohydrolase)의 활성도 동시에 가지고 있으며 I/S ratio는 0.042로서 *D. phaffii*<sup>13</sup>의 0.125 보다 낮은 값을 나타내었다.

반응특이성 : 400분까지 효소반응을 시킨 후 생성된 분해물을 박층크로마토그래피를 이용하여 검사한 결과 Fig. 5과 같으며, 반응 중간산물로 중합도가 낮은 di-, tri-, tetra-, 등의 oligosaccharide를 발견할 수 없었으나 중합도가 큰 polyfructosan은 적은 양 발견되었다.

이는 *K. marxianus* inulase가 invertase의 역할도 동시에 가지고 있으므로 생성된 저급 oligosaccharide들은 활성이 매우 큰 invertase의 작용특성에 의하여 즉시 fructose로 분해되지만 polyfructosan들은 분해가 느려 검출된 것으로 추측

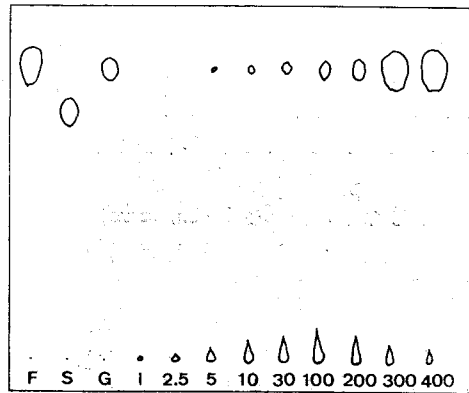
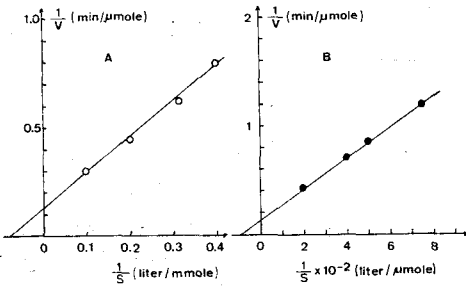


Fig 5. Thin layer chromatography of hydrolystate of inulin at various reaction time. F; fructose, S; sucrose, G: glucose, I; inulin, Numbers; reaction time(min.).



**Fig. 6.** Lineweaver-Burk plot for hydrolysis of inulin and sucrose.  
A: inulin, B: sucrose.

된다. 따라서 *K. marxianus* inulase는 일반적인 효모 inulase<sup>8,11-13</sup>가 exo-type인 것과는 달리 *S. chiabaensis*<sup>6</sup>, *Arthrobacter urefaciens*<sup>5</sup> inulase와 같이 endo-type로 추정된다.

기질농도와 반응속도: Lineweaver-Burk plot<sup>23</sup>에 의한 Km 값을 기질농도와 반응속도와의 관계로 계산한 결과 inulin에 대한 Km 값은  $1.2 \times 10^{-2}M$  이었고 sucrose에 대한 Km 값은  $1.3 \times 10^{-4}M$  이었다(Fig. 6).

이것은 *K. marxianus* inulase의 기질에 대한 친화력이 inulin 보다 sucrose에 대하여 더 큰 것을 알 수 있었다. 그러나 *K. fragilis*<sup>8</sup>, *D. phaffii*<sup>13</sup> 및 *C. salmanticensis*<sup>14</sup>은 Km 값이 sucrose 보다 inulin 기질에서 더 적은 값으로 보고 되었다.

**초 록**

*K. marxianus* inulase는 inulin 배지에서 생장이 증가되고, glucose나 fructose의 탄소원에 의하여 생장이 억제되는 유도효소로서 배양중 최대의 효소활성은 생장곡선의 정지기 초기에 나타났다.

부분 정제된 inulase는 inulin, sucrose, raffinose를 가수분해하며, 이 효소의 inulin과 sucrose에 대한 최적 pH와 최적온도는 동일하게 4.0과 55°C였으며, 두 기질에 대하여  $Hg^{++}$ 와  $Ag^+$  이온은 효소활성을 똑같이 크게 억제하는 반면, EDTA에 대해서는 영향이 없었다. 또한 이 효소의 특징은 invertase 활성도 동시에 가지고 있는 endo-type이며, inulin과 sucrose에 대한 Km 값은 각각  $1.2 \times 10^{-2}M$ 과  $1.3 \times 10^{-4}M$  이었다.

**사 의**

본 연구는 한국과학재단의 연구비 지원으로 행하여졌다.

**참 고 문 헌**

1. Dixon M. and E.C. Webb; Enzymes(3rd), Longman Press. London. pp.860(1979).
2. Edelman J. and T.G. Jefford; Biochem. J., 93 : 148(1964).
3. Rutherford P.P. and A.C. Deacon; Biochem J., 126 : 569(1972).
4. Floop A.E., P.P. Rutherford and E.W. Weston; Phytochem., 9 : 491(1970).
5. Tanaka K., T. Uchiyama and A. Ito; Biochem. Biophys. Acta., 284 : 248(1972).
6. 정구영, 박관화, 이계호; 한국 식품과학회지 13 : 67(1981).
7. Snyder H.E. and H.J. Phaff; Antonie van Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol., 26 : 433 (1960).
8. 남백희, 변시명; 한국 생화학회지, 10 : 95 (1977).
9. Negoro H.; J. Ferment. Technol., 51 : 879 (1973).
10. Negoro H. and E. Kito; J. Ferment. Technol., 51 : 803(1973).
11. Beluche I., J.P. Guiraud and P. Galzy; Folia Microbiol., 25 : 32(1980).
12. Chautard P., J.P. Guiraud and P. Galzy; Acta. Microbiol. Acad. Sci. hung., 28 : 245 (1981).
13. Demeull S., J.P. Guiraud and P. Galzy; Zeitschrift Allg. Mikrobiol., 21 : 181(1981).
14. Guiraud J.P., C. Viard-Gaudin and P. Galzy; Agric. Biol. Chem., 44 : 1245(1980).
15. Nakamura T. and S. Nakatsu; J. Agric. Chem. Soc. Japan, 51 : 681(1977).
16. Nakamura T., T. Kurokawa, S. Nakatsu and S. Ueda; J. Agric. Chem. Soc. Japan, 52 : 159(1978).
17. 김기철; 한국 농화학회지, 18 : 42(1975).
18. 권태종; 건대 학술지, 24 : 63(1980).
19. Pilnik W. and G.J. Vervelde; J.Agron.

- Crop Sci., 142 : 153(1976).
20. Somogyi M.,: J. Biol. Chem., 195 : 19(1952).
21. Miller G.L.,: Analytical Chem., 31 : 426 (1959).
22. Lowry O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall; J. Biol. Chem., 193 : 265 (1951).
23. Lineweaver H. and D. Burk; J. Amer. Chem. Soc., 56 : 658(1934).