

# *Kluyveromyces marxianus* 가 생산하는 Intracellular 및 Extracellular Inulase 의 정제 및 특성비교

金 秀 一 · 文 允 植

서울대학교 농과대학 농화학과  
(1987년 3월 18일 수리)

## Purification and Characterization of Intracellular and Extracellular Inulase from *Kluyveromyces marxianus*

Su-Il Kim and Hang-Sik Moon

Department of Agricultural Chemistry, Seoul National University, Suwon, Korea

### Abstract

The extracellular and intracellular inulases from *Kluyveromyces marxianus* were purified and characterized. The maximum production of both inulases was achieved at stationary phase in a pH-controlled medium at pH 5 with yeast nitrogen base as organic nitrogen source. Each enzyme was concentrated by tannic acid precipitation and separated into two fractions by DEAE-cellulose chromatography. Electrophoretic analysis showed that the four fractions had three glycoprotein bands each. Only main glycoprotein band, however, had both inulase and invertase activities. There were no significant differences between two enzymes in the optimum pH and temperature. But the intracellular inulases had higher heat stability and less affinity toward inulin than the extracellular enzymes do. All the purified enzymes were considered to be exo-inulases using hydrolyzate analysis with TLC.

### 서 론

Inulin의 분해 효소인 inulase ( $\beta$ -D-fructofuranosidase)는 fungi<sup>1-7)</sup>와 yeast<sup>8-10)</sup>등의 여러 미생물에서 검출되었는데 이들은 주로 inulin을 탄소원으로 이용할 때 생산이 크게 증가되는 inducible enzyme으로 대표적으로는 *Streptomyces chibaensis*<sup>11)</sup> 및 *Candida salmanticensis*<sup>12)</sup>, *Pichia polymorpha*<sup>13)</sup>, *Debaryomyces phaffii*<sup>10)</sup> 등으로부터 얻어졌다. 그러나 Grootwassink 등<sup>14)</sup>은 *Kluyveromyces fragilis*의 연속배양에서 탄소원의 종류에 관계없이 높은 inulase 활성을 나타내는 돌연변이체를 선발하여 constitutive inulase도 생산하고 있다.

미생물로부터 inulase를 생산하기 위한 조건으로

탄소원 및 질소원, 초기 pH, 배양온도, 금속이온 및 미량원소, aeration의 영향 등에 대하여 연구되었는데<sup>15)</sup> 이 중 유기 질소원으로는 corn steep liquor<sup>1,5,11)</sup>가 무기 질소원으로는  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  또는  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 가 효소생산을 증가시킨다는 보고가 있고 배양온도는 대부분 30°C 내외였으며, 배지의 초기 pH는 사용 균주에 따라 다양하였으나 대체로 pH 4.5~5.5였다<sup>1,5,16)</sup>.

미생물 inulase는 extracellular enzyme과 intracellular enzyme의 두 종류가 있는데 intracellular inulase는 대부분 cell wall에 존재한다고 보고되었으며<sup>10,12,13)</sup> Chautard 등<sup>13)</sup>은 효소가 cell wall에서 합성된다고 추정하였다.

이들 enzyme을 정제하기 위해서는 ion exchange 및 gel filtration chromatography가 사용되었으며 Nahm 등<sup>17)</sup>과 Nakamura 등<sup>4)</sup>은 sepharose 6B와

DEAE-sephadex A-50, sephadex G-200을 사용하여 정제한 효소가 전기영동상에서 하나의 band로 나타나 그 순수성을 확인한 바 있다.

미생물 inulase는 구성성분으로 단백질 뿐만 아니라 당을 함유하는 glycoprotein으로 보고되었으며<sup>17-20)</sup> inulase activity만을 보유하는 식물체의 inulase와는<sup>21,22)</sup> 달리 invertase activity도 보유하고 있다<sup>10,12,16-19)</sup>.

Inulase는 작용 특이성에 따라 endo-type과 exo-type으로 구분할 수 있으며 효소의 생성원에 따라 다소 차이는 있지만 대개 최적 pH는 4~5이며 최적 온도는 40~55°C라고 보고되었다<sup>15)</sup>. 이와 같은 inulase의 일반적 성질은 intracellular와 extracellular enzyme 간에 뚜렷한 차이를 보이지 않았고 다만 Negoro<sup>20)</sup> 등이 *Candida kefyr*<sup>18,19)</sup> 및 *Kluyveromyces fragilis*의 두 inulase에서 열 안정성과 inhibitor에 대한 저해정도가 다소 차이가 있음을 보고하였을 뿐이다.

본 연구에서는 *Kluyveromyces marxianus*로부터 inulase 생산에 적합한 조건들을 찾아보고 intracellular와 extracellular inulase 간에 어떠한 차이점이 있는지, 그 차이는 어떤 원인에 근거하는지를 규명해 보기 위해 각 enzyme을 분리, 정제하여 최적 pH, 최적 온도, 열 안정성, Km 및 Vmax value, 반응 특이성 등 일반 성질을 조사하고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 재료

균주는 서울대학교 농화학과 생화학실에서 보유 중인 *Kluyveromyces marxianus*를 이용하였으며, 효소 생성을 위한 inulin-YNB 배지와 질소원을 달리한 inulin-yeast extract 배지의 조성은 각각 Table 1과 2에 나타내었다.

#### 효소 activity의 측정

Inulase activity는 효소에 의해 inulin이 분해되어 생성되는 환원당의 양을 DNS법<sup>23)</sup>으로 측정함으로써 결정하였다. 즉, 2% inulin 0.4ml에 효소액과 0.1M sodium acetate buffer(pH 5.0)를 총 반응물의 부피가 1ml가 되게 첨가하여 40°C의 water bath에서 10~20분간 반응시킨 후 DNS 시약 1ml를 첨가하거나 100°C의 끓는 물에서 5분간 가열하여 반응을 중지시켰다. 효소 단위는 위 조

Table 1. Composition of inulin-YNB medium for the enzyme production

Inulin	0.5 % (w/v)
Yeast nitrogen base	0.7 % (w/v)
0.1M Sodium phosphate buffer (pH 5.5)	20.0 % (v/v)

Table 2. Composition of inulin-yeast extract medium

Inulin	0.50 %
Yeast extract	0.67 %
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.05 %
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.015 %
NH <sub>4</sub> Cl	0.1 M

Initial pH 5.5

건에서 효소액 1ml가 1분간에 1 μmole의 환원당을 생성하는 것을 1 unit로 하였다.

Invertase activity는 기질로서 2.5% sucrose 0.1ml를 사용하고 반응온도가 50°C인 것 이외에는 inulase의 경우와 동일한 방법으로 측정하였다. 단, 효소 단위는 효소액 1ml가 1분간에 1 μmole의 sucrose를 분해시키는 것을 1 unit로 하였다.

#### 효소의 생산

Inulin-YNB 배지에 균주 1백금니를 접종하여 30°C shaking incubator에서 진탕배양하면서 시간에 따른 균수 증가와 효소의 생산 경향을 조사하였으며 유기 질소원으로 yeast extract를 이용하였을 때와 두개의 배지에서 배양 중 1N NaOH를 첨가하여 배양액의 pH를 4~5로 유지시켰을 때의 효소 생산능을 각각 검토하였다. 이 때 균체수는 hematometer를 사용하여 측정하였다.

#### 조효소의 제조

배양액을 2,500×g, 2°C에서 15분간 원심분리하여 그 상등액을 extracellular enzyme 용액으로 사용하였으며 intracellular enzyme은 증류수로 2~3회 세척한 cells로부터 Negoro 등<sup>24)</sup>의 방법에 따라 toluene을 사용하여 추출하였다. 각 효소액으로부터 조효소를 회수하기 위해서는 Negoro<sup>19)</sup>의 방법에 따라 tannic acid 침전법을 사용하였다.

#### 효소의 정제

조효소 약 100 mg을 0.1M sodium acetate buffer

(pH 5.0)에 녹여 상법에 따라 준비한 DEAE-cellulose column(2×32cm)에 흡착시키고 동일 buffer로 NaCl 농도가 0~1 M이 되도록 linear gradient 방법으로 25ml/hr의 속도로 용출시켜 5ml씩 받아 280nm에서의 흡광도와 효소 활성을 측정하였다. Inulase activity를 기준으로 한 각 분획은 서로 모아 증류수에서 투석 후 냉동 건조하여 효소의 특성 연구에 이용하였다.

**Polyacrylamide gel 전기영동**

전기영동은 acrylamide의 농도를 10%로 하고 vertical type의 slab gel(16×17×0.2cm)을 사용하여 Roberts 등<sup>25)</sup>의 방법에 따라 행하였으며 glycoprotein을 검정하기 위해서는 Segrest 등<sup>26)</sup>의 방법에 의해 periodic-schiff 시약으로 발색하였다. 전기영동 후 나타난 각 band의 enzyme activity는 gel을 2mm씩 잘라서 0.1M sodium acetate buffer (pH 5.0) 1ml가 든 시험관에 넣고 마쇄한 후 4°C에서 4시간 이상 방치하여 gel 속에 있는 단백질을 추출하고 추출액의 inulase 및 invertase activity를 측정하여 검정하였다.

**효소의 일반적 성질**

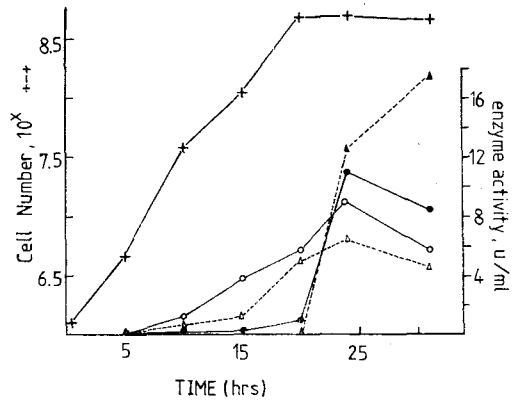
최적 pH는 pH 3~7(0.1M citrate-phosphate buffer)의 범위로 50°C 항온수조에서 효소 activity를 측정하여 구하였으며 최적 온도는 30~70°C의 온도 범위에서 0.1M sodium acetate buffer(pH 5.0)를 이용하여 inulase는 20분, invertase는 10분간 반응시킴으로써 구하였다. 열 안정성은 효소액을 45~65°C 사이에서 일정시간 열처리하고 ice bath에서 급냉시킨 후 잔류 activity를 측정하여 조사하였으며 이때 inulase는 40°C에서 20분간, invertase는 50°C에서 10분간 반응시켜 측정하였다. Km, Vmax 값의 측정시는 inulin과 sucrose에 대한 효소의 activity가 30분까지는 반응 시간에 비례하므로 초기속도 대신 inulase는 10분, invertase는 5분에서의 상대적인 activity를 사용하였고 이때 inulin의 평균 분자량은 5,000으로 계산하였다. 반응 특이성은 시간별로 반응시킨 반응물을 Collins 등<sup>27)</sup>의 방법에 따라 TLC에 의해 검정하므로써 조사하였다. 즉, 각 시료 2.5μl를 20×20×0.5cm의 plate에 spotting하여 1-propanol : ethyl acetate : H<sub>2</sub>O (2 : 2 : 1)의 용매계로 전개시킨 후 urea-metaphosphoric acid로<sup>28)</sup> 발색하여 검정하였다.

**결과 및 고찰**

**효소의 생산**

배양 시간에 따른 세포 증식과 효소 생산과의 관계는 Fig. 1에 나타내었다.

Extracellular inulase는 세포 증식의 초기인 5시간째부터 생산이 시작되어 세포수 증가에 따라 비례적으로 증가하다가 stationary phase인 24시간 경에 최고에 달하였으며 그 이후에는 감소되었다. Intracellular inulase의 생산은 extracellular inulase 보다는 늦게 나타나서 15시간까지는 미약했으나 20시간 이후 급격히 증가하기 시작하여 역시 24시간 경에 최고에 달하였다.



**Fig. 1.** Enzyme production during *Kluyveromyces marxianus* culture on inulin-YNB medium

- : Extracellular inulase ×40
- : Intracellular inulase ×4
- △—△ : Extracellular invertase
- ▲—▲ : Intracellular invertase

배양액의 pH 조절과 유기 질소원에 따른 효소생산 정도는 Table 3에 나타내었다. 유기 질소원으로 YNB를 사용하여 배양할 경우 배양액의 pH는 점차 감소하여 초기 pH 5.5에서 22시간 배양 후에는 2.68로 낮아졌다. Inulase의 생산량은 배양 중 배양액의 pH를 4~5로 계속 조절함으로써 증가시킬 수 있었다. Extracellular inulase의 경우 pH를 조절하지 않았을 때는 조절했을 때에 비해 73.85%로 생산량이 낮았고 intracellular inulase는 그 경향이 더욱 뚜렷하여 49.47% 밖에 되지 않아 유기 질소원으로 YNB를 사용할 경우에는 배양액의 pH를 4~5로 유지시키는 것이 inulase 생산에 필요

**Table 3.** Effects of organic nitrogen source and pH control on enzyme production

Org. nitrogen source	pH after culture	(Unit : units/ml/min)			
		Inulase activity		Invertase activity	
		Extra	Intra	Extra	Intra
YNB normal	2.7	0.33(0.75)	0.42(0.49)	6.72(0.87)	15.9(0.64)
	pH control	4.9	0.44(1)	0.85(1)	7.73(1)
Yeast extract	5.4	0.32(0.73)	0.08(0.09)	7.25(0.94)	3.5(0.14)

Initial pH : 5.5

YNB : Yeast nitrogen base

한 조건이었다.

Invertase의 경우에도 pH 변화에 따른 효소생산 정도가 inulase와 비슷한 양상이었다.

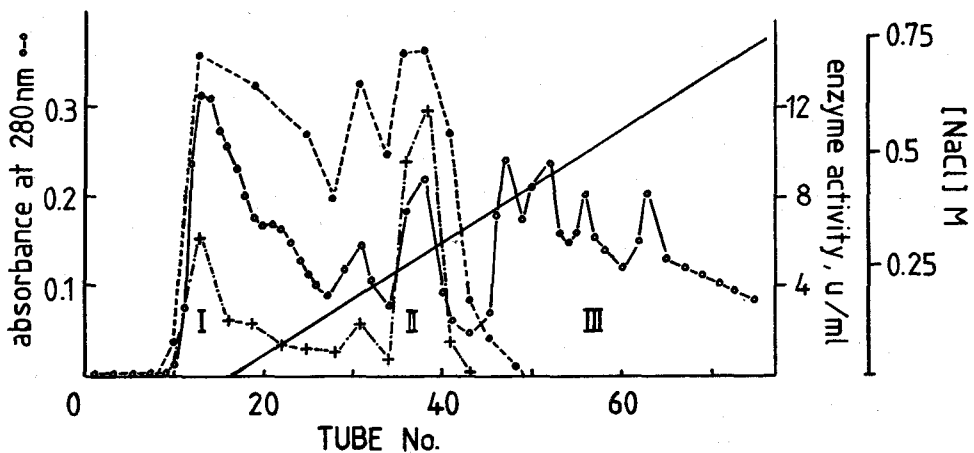
한편, 유기 질소원으로 yeast extract를 사용할 경우에는 배양액의 pH가 초기 pH 5.5에서 22시간 배양 후에도 pH 5.36으로 거의 변함이 없었다. 효소의 생산량은 질소원을 YNB로 하고 배양액의 pH를 조절한 것에 비해 extracellular inulase는 73.1%, intracellular inulase는 9.89%에 미치지 못하였다. Invertase에서도 inulase와 마찬가지로 나타나 효소 생산에는 yeast extract 보다 YNB가 더 좋은 유기 질소원임을 알 수 있었고 이와같은 결과는 김의 보고<sup>29)</sup>와 일치하였다.

**효소의 정제**

Intracellular 및 extracellular 조효소를 DEAE-cellulose에 의해 분리한 결과는 각각 Fig. 2와 3에 나타내었다.

Intracellular enzyme은 inulase activity로 볼 때 두개의 fraction으로 나누어졌는데 fraction I은 DEAE-cellulose에 완전히 흡착되지 않고 NaCl gradient를 실시하기 이전부터 용출되기 시작하였으며 fraction II는 NaCl 농도가 약 0.25M일 때 용출되었다 (Fig. 2). 이들은 모두 invertase activity도 보유하고 있었고 280nm에서의 흡광도로 분리한 peak와도 동일하였다. 이와 같은 결과는 extracellular enzyme에서도 비슷한 양상으로 나타났다 (Fig. 3).

이처럼 조효소는 intracellular enzyme과 extracellular enzyme에서 모두 두 종류로 분류되었고 이 4가지 inulase는 모두 invertase activity도 보유하고 있다. 또한 DEAE-cellulose chromatogram에서 inulase activity가 없는 fraction에서도 invertase activity가 발견되는 것으로 보아 조효소 내에는 inulase 효소 외에 invertase activity만을 보유하는 효소가 존재한다고 추정된다.



**Fig. 2.** DEAE-cellulose chormatograms of intracellular enzyme

+-----+ : Inulase activity ×2, ●-----● : Invertase activity

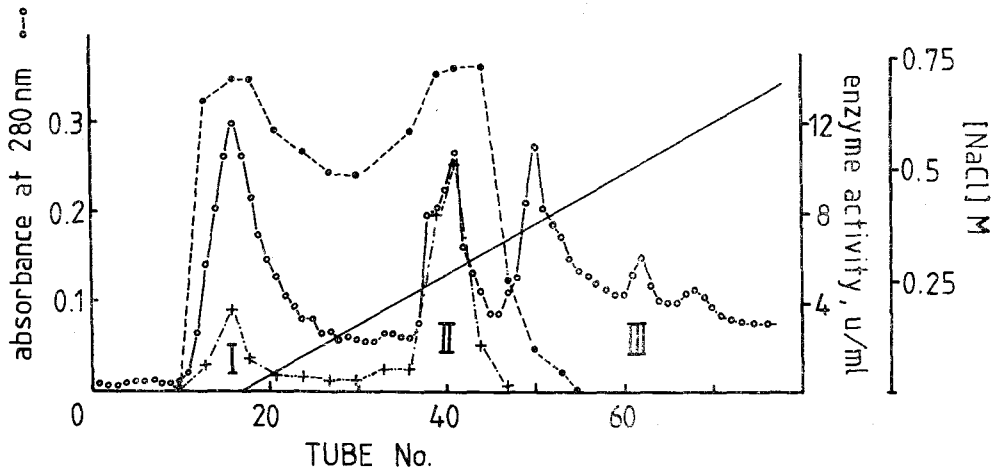


Fig. 3. DEAE-cellulose chromatograms of extracellular enzyme  
 +-----+ : Inulase activity  $\times 2$ , ●-----● : Invertase activity

DEAE-cellulose로 분리한 각 fraction을 전기영동한 결과 각 fraction은 조효소와 정제 후의 것을 비교해 볼 때 이동속도가 빠른 부분의 band만이 제거되었고 extracellular enzyme은 4개, intracellular enzyme은 3개의 band로 나타났다 (Fig. 4). 3~4개의 band 중 어떤 band가 inulase인지 알기 위해 gel을 잘라서 activity를 측정한 결과 가장 이동 속도가 늦은 band에서만 inulase activity가 검출되었으며 또한 이 band는 invertase activity도 보유하고 있다 (Fig. 4 ← activity).

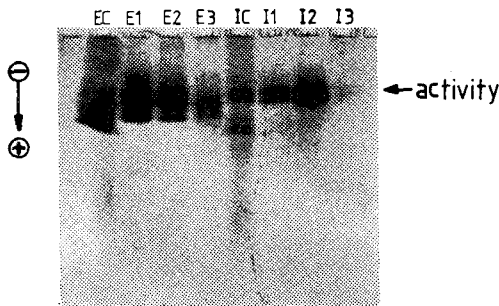


Fig. 4. 10% Polyacrylamide gel electrophoresis of DEAE-cellulose fractions of extracellular and intracellular enzyme.  
 EC : Crude extracellular enzyme  
 IC : Crude intracellular enzyme  
 E1~E3, I1~I3 : DEAE-cellulose fraction I~III of extracellular enzyme and intracellular enzyme, respectively.

동일 조건으로 전기영동한 후 periodic-schiff 시약으로 glycoprotein을 발색하여 coomassie brilliant blue로 발색한 것과 비교한 결과 intracellular 및 extracellular inulase는 모두 glycoprotein이었으며 DEAE-cellulose로 정제한 fraction에는 inulase 외에 두개의 glycoprotein이 불순물로 존재함을 알 수 있었다 (Fig. 5).

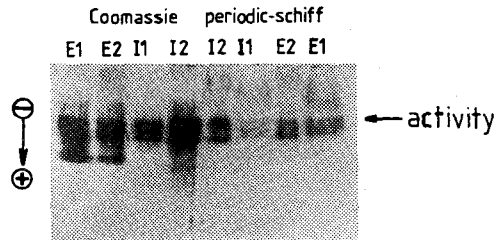
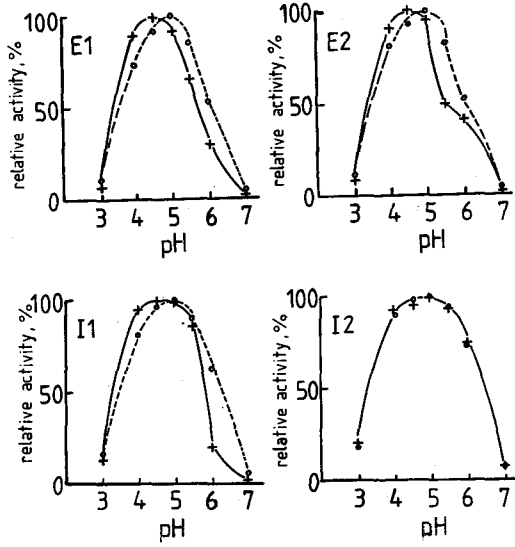


Fig. 5. Electrophoretic patterns of intra and extracellular enzymes on 10% polyacrylamide gel  
 Coomassie : stained with Coomassie Brilliant Blue R-250  
 Periodic-schiff : stained with periodic-schiff reagent

효소의 일반적 성질

최적 pH : 모든 fraction이 inulase는 pH 5.0에서, invertase는 pH 4.5에서 최대 활성을 보여 intracellular inulase가 extracellular inulase에 비해 다소 넓은 범위의 pH에서 높은 활성을 나타내는 것 외에 4가지 효소의 최적 pH에는 차이를 볼 수

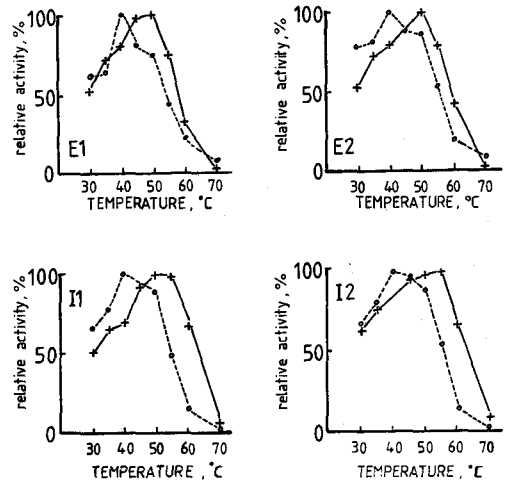


**Fig. 6.** Effect of pH on inulase and invertase activity  
 ○--○ : Inulase activity  
 +--+ : Invertase activity  
 E1 : DEAE-cellulose fraction I of extracellular enzyme  
 E2 : DEAE-cellulose fraction II of extracellular enzyme  
 I1 : DEAE-cellulose fraction I of intracellular enzyme  
 I2 : DEAE-cellulose fraction II of intracellular enzyme

없었으나 단, intracellular enzyme fraction II인 I2의 invertase만이 다른 fraction과는 달리 pH 5.0에서 최대 활성을 보였다 (Fig. 6).

최적 온도 : Extracellular fraction I은 40°C에서 가장 높은 inulase 활성을, 45~50°C에서 높은 invertase 활성을 나타내었고 (Fig. 7, E1), extracellular fraction II의 경우는 40°C와 50°C에서 각각 inulase 및 invertase의 최대 활성을 나타내었다 (Fig. 7, E2). 한편 intracellular enzyme의 경우 fraction I의 inulase activity는 40°C에서, invertase activity는 50~55°C에서 최고를 이루었으며 (Fig. 7, I1) fraction II에서는 40~45°C와 50~55°C에서 각각 최대의 inulase 및 invertase activity를 나타내었다 (Fig. 7, I2).

모든 fractions의 inulase activity는 40°C에서 최대 활성을 보여 extracellular와 intracellular inulase 간에 차이를 보이지 않았으나 invertase의 경우 extracellular enzyme은 45~50°C에서, intracellular enzyme은 50~55°C에서 최대 활성을 나



**Fig. 7.** Effect of temperature on inulase and invertase activity  
 ○--○ : Inulase activity  
 +--+ : Invertase activity  
 E1, E2, I1, I2 : Refer to Fig. 6

타내어 intracellular invertase가 5~10°C 더 높은 온도에서 최대 활성을 보임을 알 수 있었다. 또한 inulase와 invertase 모두 대체로 intracellular inulase가 extracellular inulase에 비해 다소 넓은 범위의 온도에서 높은 활성을 나타내었다 (Fig. 7).

열 안정성 : 각 fraction을 45~65°C 사이에서 시간별로 열처리한 후 잔류 활성을 측정할 결과 intracellular inulase는 45°C에서 1시간 처리 후에 82~95%의 활성을 유지한 반면 (Fig. 8, I1, I2) extracellular inulase는 58~73%의 활성을 유지하였고 (Fig. 8, E1, E2) 50°C에서는 1시간 경과 후 intracellular는 58~70%, extracellular는 35~39%의 활성을 유지하므로써 intra가 extracellular inulase에 비해 열에 대한 안정성이 높음을 알 수 있었고 (Fig. 8) 이와 같은 양상은 invertase에서도 비슷하게 나타났다 (Fig. 9).

Km, Vmax : 각 fraction의 inulin과 sucrose에 대한 Michaelis 상수 (Km)와 Vmax 값을 Lineweaver Burk plot을 이용하여 구한 결과는 Table 4에 나타내었다.

Inulin에 대한 Km값이 extracellular inulase가 9.41~11.54 mM로서 15.93~18.99 mM인 intracellular inulase에 비해 낮은 값을 나타냄으로서 inulin에 대한 친화력은 extra가 intracellular inulase보다 더 높음을 알 수 있었다.

Sucrose에 대한 Km값은 12.09~14.73 mM로서

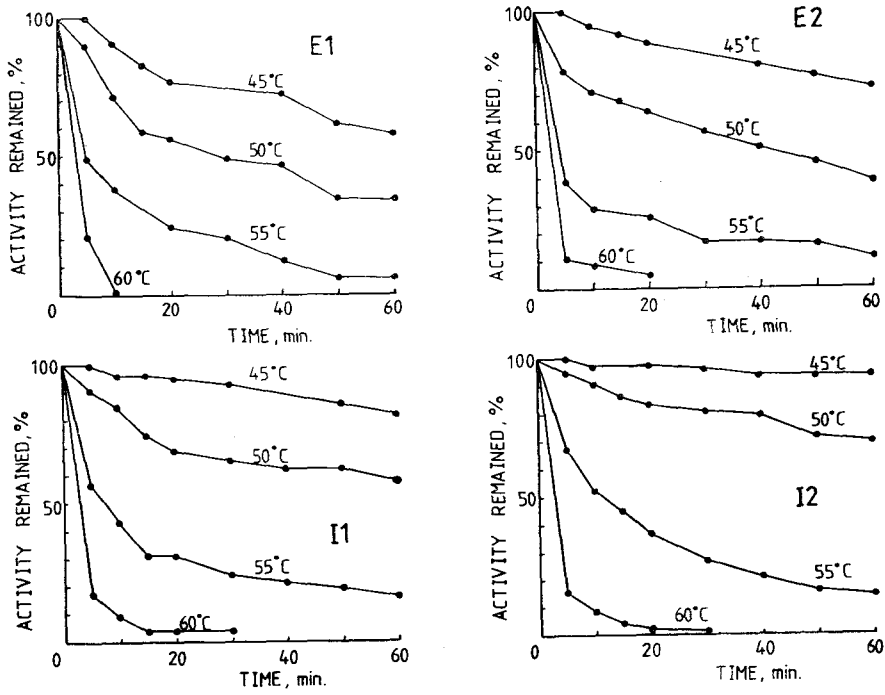


Fig. 8. Heat stability of intra and extracellular inulase with preincubation time  
E1, E2, I1, I2: Refer to Fig. 6

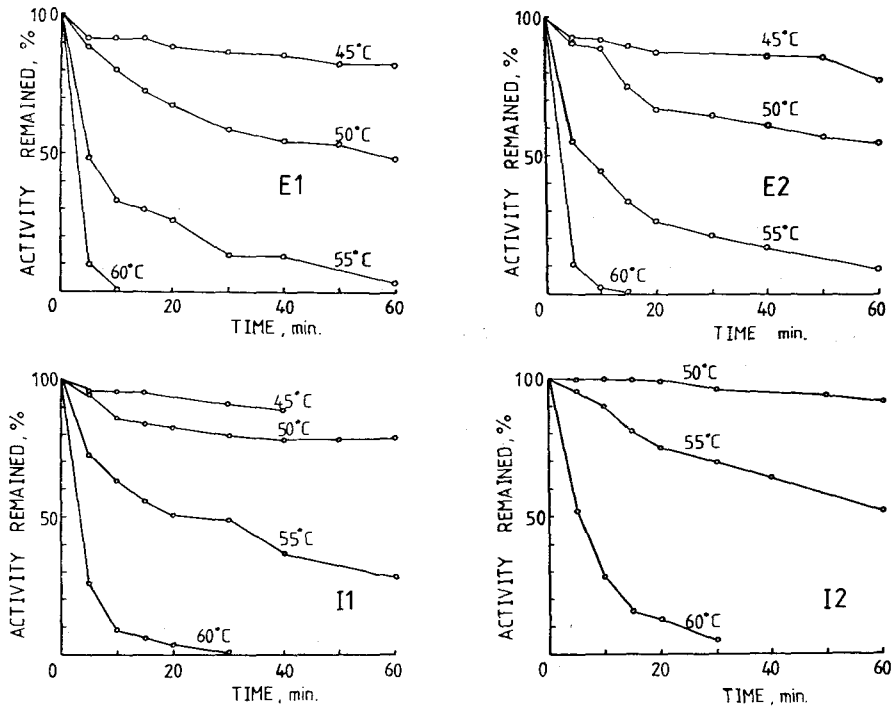


Fig. 9. Heat stability of intra and extracellular invertase with preincubation time  
E1, E2, I1, I2: Refer to Fig. 6

**Table 4.** Michaelis constants (Km) and Vmax values for inulin and sucrose

	Inulin				Sucrose			
	I 1	I 2	E 1	E 2	I 1	I 2	E 1	E 2
Km, mM	18.99	15.39	11.54	9.41	12.8	14.3	12.09	14.73
Vmax, $\mu$ moles/min	20.34	19.66	9.05	18.72	8.46	9.36	4.9	13.58

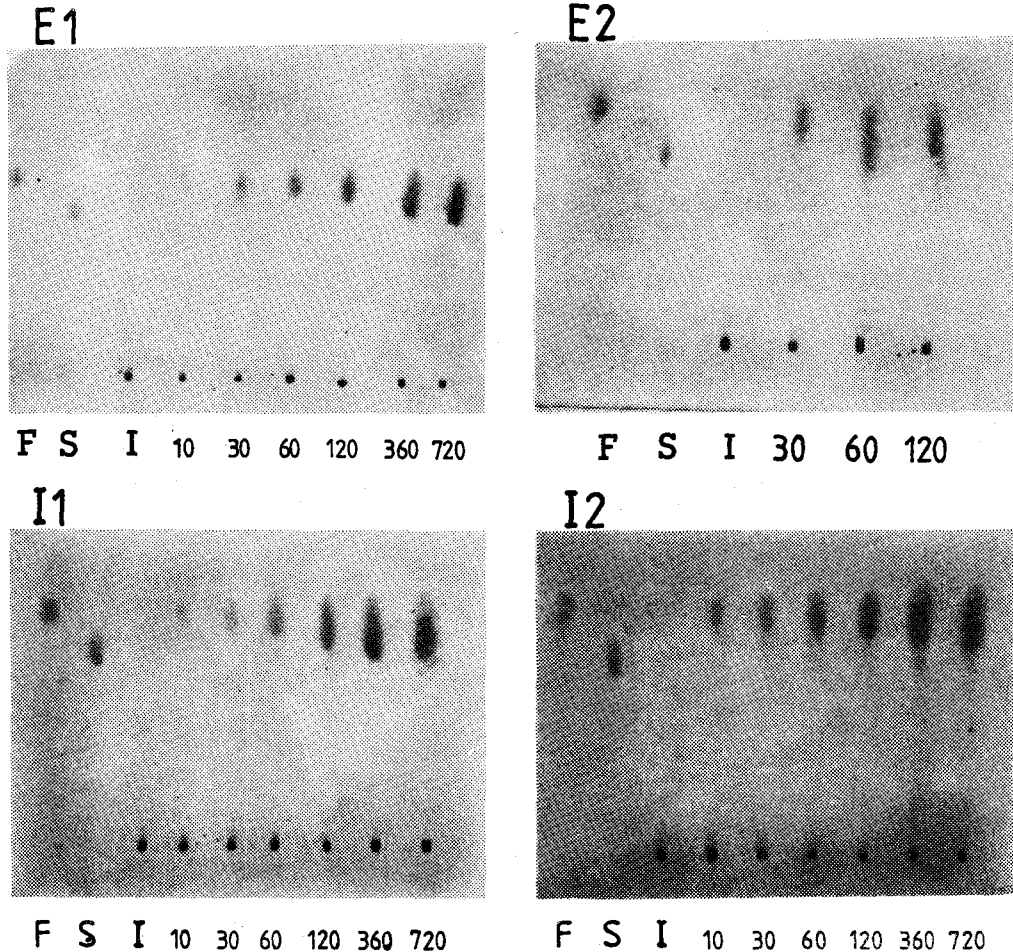
I1, I2, E1, E2 : Refer to Fig. 6

inulin과는 달리 extra 및 intracellular enzyme 간에, 또는 각 fraction간에 뚜렷한 차이가 없었다.

Inulin에 대한 Vmax값은 extracellular enzyme fraction I(E1)이 9.05  $\mu$ moles/min로 낮았으나 다른 세 fractions는 18.72~20.34  $\mu$ moles/min 로서 비슷한 값을 보였다. 그러나 sucrose에 대한 Vmax값은 4개의 fractions이 4.9~13.58  $\mu$ moles/min로

서 fraction간에 차이를 보이고 있었다.

반응 특이성의 검정 : Intra 및 extracellular enzyme의 각 fraction을 inulin과 12시간까지 반응시킨 후 생성된 분해산물을 TLC에 의해 검정한 결과 모든 fraction에서 시간이 경과함에 따라 중합도가 큰 oligosaccharide는 발견할 수 없었으나 inulin으로부터 분해된 fructose의 양이 증가된 것으로



**Fig. 10.** Thin-layer chromatograms of hydrolysates of inulin at various reaction time.

F : Fructose, S : Sucrose, I : Inulin, Numbers : Reaction times(min.)

E1, E2, I1, I2 : Refer to Fig. 6



로 나타났다 (Fig. 10). 이는 각 enzyme이 inulin으로부터 terminal D-fructosyl unit를 가수분해하는 전형적인 exo-type이라는 것을 말해주고 있다.

이상의 결과로 볼 때 intracellular와 extracellular enzyme은 대체로 그 특성이 비슷하였으나 몇가지 상이한 점이 발견되었다. 즉, intra가 extracellular enzyme에 비해 다소 넓은 범위의 pH와 온도에서 높은 활성을 보였으며 invertase가 최대 활성을 나타내는 온도는 intra가 extracellular enzyme에 비해 5~10°C 더 높았다. 또한 intra가 extracellular enzyme에 비해 높은 열 안정성을 나타내었으나 inulin에 대한 친화력은 extracellular inulase가 더 높았다. *Candida kefyr*<sup>19)</sup>와 *Kluyveromyces fragilis*<sup>20)</sup>에서도 pH 안정성, 열 안정성, inhibitor에 대한 저해 정도에서 intracellular inulase와 extracellular inulase 간에 차이가 발견되었는데 두 enzyme은 polysaccharide 함량에서 차이를 보였다. 그러므로 본 연구에서 intra와 extracellular inulase 간에 차이를 보이는 것이 각 enzyme에 함유된 당 때문인지의 여부와 DEAE-cellulose에 의해 분리된 두 fraction 사이에는 어떤 차이가 있는지 알아보기 위해서는 rechromatography 등에 의해 순수분리하여 각 enzyme의 분자량 및 당 함량, 당 조성 등에 대하여 앞으로 계속 연구해야 할 것이다.

초 록

*Kluyveromyces marxianus*로부터 inulase를 생산하고 정제하여 intra 및 extracellular inulase의 성질을 조사하였다.

본 균주는 stationary phase인 24시간째 intra 및 extracellular enzyme의 생산이 최고에 달했으며 유기 질소원으로 YNB를 사용하고 배양 중 pH를 조절해 줌으로써 효소 생산을 향상시킬 수 있었다.

조효소는 DEAE-cellulose에 의해 intra 및 extracellular inulase 모두 2개의 fraction으로 분리되었고 각 fraction의 전기영동 양상은 비슷하여 주 band를 비롯 모두 3개의 glycoprotein band가 관찰되었으며 이중 주 band만 inulase 및 invertase activity를 보유하고 있었다.

정제 효소의 inulase 및 invertase의 최적 pH는 각각 5.0과 4.5였고 intra가 extracellular enzyme에 비해 다소 넓은 범위의 pH에서 높은 활성을

나타내었다. 모든 fraction의 최적 온도는 inulase가 40°C, invertase가 50°C였으며 intracellular enzyme이 더 넓은 범위의 온도에서 안정하였고 열에 대한 안정성도 intracellular inulase가 extracellular inulase보다 높게 나타났다. Km value는 intra가 16~19mM, extracellular inulase가 9~11 mM로써 extracellular inulase가 inulin에 대한 친화력이 더 높았으나 모두 exo-type의 inulase로 판명되었다.

참 고 문 헌

1. Kim, K.C.: J. Korean Agr. Chem. Soc., 18: 42(1975)
2. Kim, K.C.: J. Korean Agr. Chem. Soc., 18: 177(1975)
3. Nakamura, T. and Hoashi, S.: J. Agr. Chem. Soc. Japan, 43 : 599(1969)
4. Nakamura, T. and Nakatsu, S.: J. Agr. Chem. Soc. Japan, 51 : 681(1977)
5. Nakamura, T., Hoashi, S. and Nakatsu, S.: J. Agr. Chem. Soc. Japan, 52 : 105(1978)
6. Nakamura, T., Kurokawa, T., Nakatsu, S. and Ueda, S.: J. Agr. Chem. Soc. Japan, 52 : 159(1978)
7. Nakamura, T., Maruki, S., Nakatsu, S. and Ueda, S.: J. Agr. Chem. Soc. Japan, 52 : 581 (1978)
8. Guiraud, J.P., Deville-Duc, T. and Galzy, P.: Folia Microbiol., 26 : 147(1981)
9. Guiraud, J.P., Daurelles, J. and Galzy, P.: Biotechnol. Bioeng., 23 : 1461(1981)
10. Demeulle, S., Guiraud, J.P. and Galzy, P.: Z. Allg. Mikrobiol., 21 : 181(1981)
11. Chung, K.Y., Park, S.O. and Lee, K.H.: J. Korean Agr. Chem. Soc., 23 : 211(1980)
12. Guiraud, J.P., Viard-Gaudin, C. and Galzy, P.: Agr. Biol. Chem., 44 : 1245(1980)
13. Chautard, P., Guiraud, J.P. and Galzy, P.: Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung., 28 : 245 (1981)
14. Grootwassink, J.W.D. and Hewitt, G.M.: J. Gen. Microbiol., 129 : 31(1983)
15. Vandamme, E.J. and Derycke, D.G.: Adv. Appl. Microbiol., 29 : 139(1983)

16. Ryu, Y.W., Ghim, S.J. and Kim, S.I.: J. Korean Agr. Chem. Soc., 27 : 45(1984)
17. Nahm, B.H. and Byun, S.M.: Korean Biochem. J., 10 : 95(1977)
18. Negoro, H. and Kito, E.: J. Ferment. Technol., 51 : 103(1973)
19. Negoro, H.: J. Ferment Technol., 51 : 879 (1973)
20. Negoro, H.: J. Ferment Technol., 56 : 102 (1978)
21. Edelman, J. and Jefford, T.G.: Biochem. J., 93 : 148(1964)
22. Rutherford, P.P. and Deacon, A.C.: Biochem. J., 126 : 569(1972)
23. Melius, P.: J. Chem. Educ., 48 : 765(1971)
24. Negoro, H. and Kito, E.: J. Ferment. Technol., 51 : 96(1973)
25. Roberts, C.A., Jones, C., Spencer, E.J., Bowman, G.C. and Blackman, D.: J. Chem. Educ., 53 : 62(1976)
26. Segrest, J.P. and Jackson, R.L.: Methods in Enzymol., 28 : 54(1972)
27. Collins, F.W. and Chandorkar, K.R.: J. Chromatogr., 56 : 163(1971)
28. Wise, C.S. Dimler, R.J., Davis, H.A. and Rist, C.E.: Anal. Chem., 27 : 33(1955)
29. 김신제 : 석사학위 논문, 아주대학교 대학원 (1983)