

돼지감자중의 Inulin 분해효소에 관한 연구

전덕영 · 김명희*

전남대학교 자연과학대학 식품영양학과

*목포전문대학 식품영양과

Studies on Inulase from Jerusalem artichoke

Deok-Young Jhon and Myung-Hee Kim*

Dept. Food Science & Nutrition, Chonnam National University, Kwangju, 500-757, Korea

Dept. Food & Nutrition, Mokpo Junior College, Mokpo. 530-360, Korea

Abstract

The inulase(EC 3.2.1.7) was isolated from the tuber of Jerusalem artichoke by conventional purification methods including ammonium sulfate fractionation, Sephadex G-100 filtration, and DEAE-cellulose column chromatography. The enzyme was purified 6,470 fold with 42% recovery. The enzyme was consisted of a polypeptide of Mw 57,000. The optimum temperature and the optimum pH for the enzyme action was 33°C and pH 5.0, respectively. The enzyme was highly specific for inulin as a substrate. The km for inulin was 20mM. The inulase was not a metalloenzyme and was inhibited completely by 10mM Mg²⁺, Ca²⁺ or Hg²⁺.

서론

Inulin은 fructose 분자들이 β -2,1결합으로 연결되어 있는 직선모양의 다당류로서 중합도는 2에서 35정도이며 한쪽 끝에는 glucose가 α -1,2결합으로 붙어있다.¹⁾ Inulin은 돼지감자를 비롯해서 다알리아, 치커리 등 식물의 괴경에 함유되어 있으며 이것을 가수분해하면 fructose를 얻을 수 있으므로 식물 및 발효산업에서 그 이용에 많은 관심을 갖고 있다.²⁾ 특히 돼지감자는 척박한 토양에서도 잘 생육할 뿐만 아니라 inulin의 함량도 건조 무게로서 62%나 되므로³⁾ 가장 좋은 inulin 자원으로 이용되고 있다. inulin의 분해는 효소인 inulase를 이용한다. inulase는 *Saccharomyces(Kluyveromyces) fragilis*⁵⁾, *Candida kefir*¹⁶⁾, 등의 효모와 *Aepergillus niger*^{4,10)}, *Fusarium roseum*¹⁷⁾, *Penicillium* 속¹⁸⁾ 등의 곰팡이 그리고 세균인 *Bacillus subtilis*¹¹⁾ 등의 미생물에 의해서 생산되

며 돼지감자의 괴경에도 함유되어 있다. 따라서 돼지감자로부터 fructose를 생산할 때 자체내의 효소를 부분적으로 활용할 수 있을 것이다. 그러나 이 효소에 대한 연구는 거의 없는 실정이다.^{6,7)} 따라서 본 연구에서는 돼지감자에서 inulase를 정제하고 그 효소특성을 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료

돼지감자는 시중 종묘상의 종자로서 1986년 겨울에 수확된것을 -40°C에 냉동시켜두며 사용하였다. inulin, stachyose, raffinose, sucrose, lactulose는 sigma 제품을 사용하였고 Sephadex G-100은 pharmacia, DEAE-cellulose는 whatman, soium diethyl dithiocarbamate 는 junsei 제품을 사용하였다.

Inulase 활성도의 측정

효소의 활성도는 Miller의 환원당 정량법⁸⁾을 수정하여 사용하였다. 효소 용액 0.1 ml에 기질 용액(5% inulin / 100 ml 초산 완충액, pH 5.0) 0.1 ml을 넣고 30°C에서 3시간동안 반응시킨 다음 dinitrosalicylic 산 용액 0.3 ml을 더하여 정확히 5분동안 끓였다. 이것을 증류수 1 ml를 넣어 희석한 다음 540nm에서 흡광도를 측정하였다. Fructose를 사용하여 같은 방법으로 실험하여 표준곡선을 작성하였으며 효소활성도의 단위는 fructose를 시간당 1 μ mole 생산하는 능력을 1unit(U)로 하였다.

단백질의 정량

Coomassie brilliant blue G-250 50 mg을 95% 에탄올 25 ml에 용해하고 85%의 인산 용액 50 ml을 더한 다음 증류수로 500 ml이 되게 희석하였다.⁹⁾ 이 용액 1 ml에 단백질용액 50 μ l를 넣어 595nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준단백질로는 bovine serum albumin을 사용하였다.

Inulase의 정제

효소의 정제는 약 4°C의 저온에서 실시하였다. 돼지감자 300 g을 수도물로 씻으면서 껍질을 벗겼다. 이것을 작게 자른 다음 cystein과 sodium diethyldithiocarbamate 가 각각 0.1M과 0.05M이 함유된 인산완충액(0.02M, pH 7.2)을 넣고 waring blender를 사용하여 1분간 마쇄한 다음 4겹의 거즈를 사용하여 여과하였다. 이 용액을 황산암모늄을 사용하여

20% 포화를 시킨 다음 10,000 \times g에서 10분간 원심 분리하여 상등액만을 얻고 여기에 다시 황산암모늄을 50%까지 포화시킨 다음 원심분리하여 침전물을 소량의 인산완충액에 용해하였다. 그리고 이 용액을 0.02M인산 완충액(pH 7.5)에 대하여 투석한 다음 이 단백질 32.1mg을 Sephadex G-100 투과크로마토그래피겔(2x56 cm)에 주입하여 5 ml / hr의 속도로 유출시켰다. 유출용액으로는 0.02M인산 완충액(pH 7.5)을 사용하였다. 겔투과크로마토그래피 유출액중 효소활성도가 큰 분획만을 모아서 DEAE-cellulose 컬럼(1 \times 11 cm)을 이용하여 이온교환 크로마토그래피를 실시하였다. 사용된 효소의 양은 3.7 mg, 유출 속도는 15 ml / hr이었으며 유출액은 1.2 ml씩 모았다.

SDS-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동(SDS-PAGE)

Laemmli의 방법¹⁰⁾에 따라 7%의 아크릴아마이드 겔을 사용하여 전기영동을 실시하였으며 nondenaturing PAGE인 경우에는 sodium dodecyl sulfats(SDS)만을 제외하였다. 단백질 띠는 coomassie brilliant blue R로 염색하였으며 탈색은 7.5%의 초산을 함유한 5%메탄올 용액을 사용하였다. 분자량 측정용 표준단백질은 Bio. Rad제품으로서 myosin(Mr 200,000), β -galactosidase(Mr 116,250), phosphorylase b(Mr 93,500), bovine serum albumin(Mr 66,200), ovalbumin (Mr 45,000)을 사용하였다.

Table 1. Purification of inulase from Jerusalem artichoke

Purification step	Protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U / mg)	Purification ratio (fold)	Recovery (%)
Crude extract	906	30.8	0.034	-	100
Ammonium sulfate precipitation (20-50%)	186	21.0	0.113	3.3	66
Sephadex G-100 gel filtration	56	19.5	0.348	10.2	62
DEAE-cellulose chromatography	0.06	13.2	220	6470	42

결과 및 고찰

Inulase의 정제

추출된 효소를 황산암모늄 침전, Sephadex G-100 겔 투과크로마토그래피와 DEAE-cellulose 컬럼으로 정제한 결과 최종적으로 6,470배가 정제되었으며 이 때 수율은 42.3% 였다(Table 1). 정제과정중 황산암모늄 침전단계에서 수율이 가장 크게 감소되었으며 DEAE-cellulose이온교환 단계에서는 634배가 정제되어 가장 효과적이었다. 조효소는 갈색을 띠고 있었으며 그 단백질농도는 2.3-mg / ml이었다. 황산암모늄 50%침전농축액은 점도가 컸으며 소량의 완충액에는 용해되지 않았다. 그러나 20% 농도에 침전되는 부분을 제거한 다음에는 정제도가 3.3배로서 상당량의 단백질 뿐만 아니라 점질물도 크게 감소시킬 수 있었다. 그러나 회수율은 66%로서 이 과정에서 효소가 상당히 감소되었다.

Fig. 1은 inulase가 Sephadex G-100을 통과하는 겔 투과 크로마토그래피로서 inulase는 주된 단백질 peak에서 용출되었는데 peak의 뒷부분에서 용출되는 것으로 보아 이 효소의 분자량은 Sephadex G-100에 의하여 분리되어지는 범위일 것으로 생각된다. 미생물이 분비하는 inulin분해 효소는 대부분 sucrose도 분해할 수 있는데¹¹⁾ 이 실험에서 invertase의 활성은 겔 투과 크로마토그래피의 용출액에 있어서 inulase보다 앞서서 발견되었다. 따라서 inulase는 invertase 보다 분자량이 더 작으며 invertase와는

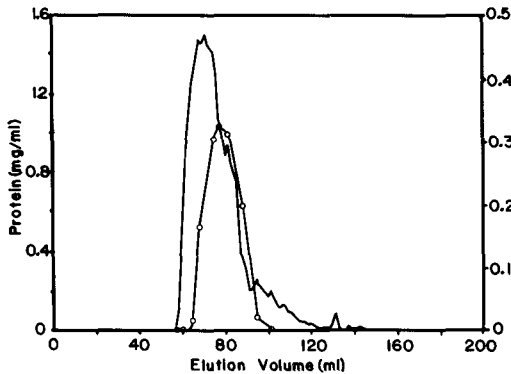


Fig. 1. Elution profile of inulase on a Sephadex G-100 column (2×56cm).

The sample was eluted with 20 mM phosphate buffer, pH 7.5 in 3ml fractions at a flow rate of 5ml/hr.

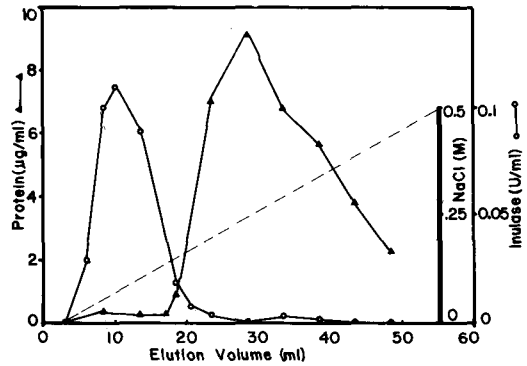


Fig. 2. DEAE-cellulose chromatography of inulase from jerusalem artichoke.

The sample applied on the column (1×11cm) was eluted with 20mM phosphate buffer, pH 7.5 in 1.2ml fractions at a flow rate of 15ml/hr. The bound protein was eluted by applying a gradient of NaCl(0-0.5M) in the buffer.

일단 다른 단백질임을 알 수 있다.

Sephadex 컬럼유출액중 효소활성이 큰 분획만을 모아 DEAE-cellulose컬럼 크로마토그래피를 한 결

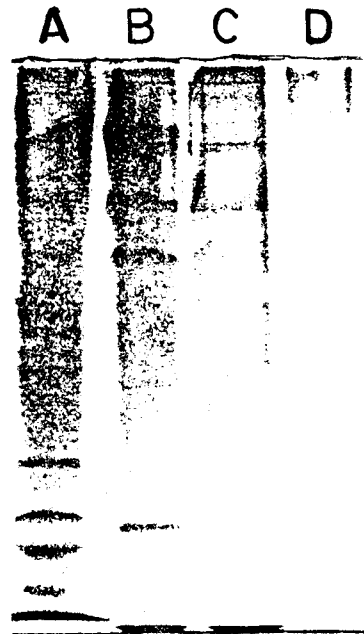


Fig. 3 Non-denaturing PAGE of inulase from Jerusalem artichoke.

Samples were applied to a 70% PAGE. Lane A, crude extract (110µg protein); Lane B, Ammonium sulfate precipitate (180µg protein); Lane C, Sephadex G-100 fraction (74µg protein); Lane D, DEAE-cellulose fraction (2µg protein).

과는 Fig.2에서 보는 바와 같다. Inulase는 일찍 유출되었으며 NaCl 농도가 0.1M일때 peak를 나타내었다. Inulase 활성은 0.3M NaCl에서도 발견되었지만 그 활성도는 대단히 낮았다. 이러한 두가지 유형의 inulase는 Edelman들⁶⁾의 보고와 일치한다. 이중 inulase활성이 큰 peak만 정제하였는데 이 부분에서는 단백질이 거의 용출되지 않아 정제도가 크게 증가하였으며 invertase의 활성을 측정한 결과 inulase의 활성 부위와는 다른 부분인 주된 단백질 peak에서 발견되었다. 따라서 DEAE-cellulose 컬럼으로 주된 inulase와 invertase를 분리할 수 있었다.

정제도를 확인하기 위하여 전기영동한 결과 조효소와 황산암모늄 침전효소 그리고 겔 투과크로마토 그래피 분석에는 여러 종류의 단백질이 함유된 것을 알 수 있다(Fig. 3). 그러나 DEAE-cellulose 컬럼을 통하여 정제된 효소는 단일한 띠를 보여주었다.

분자량

Fig. 4는 inulase의 정제과정중 각 단계에서 얻어진 단백질에 대한 SDS-전기영동이다. DEAE-cellulose

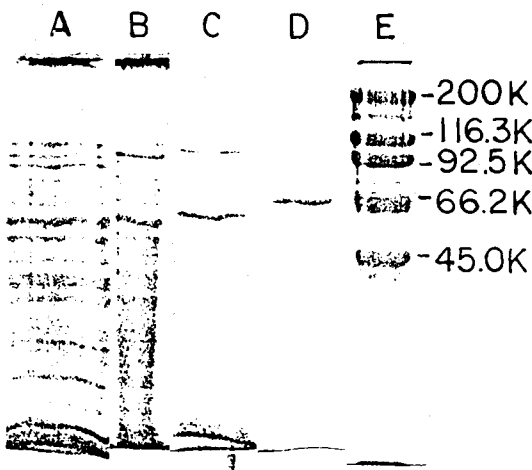


Fig. 4. SDS-PAGE of inulase from Jerusalem artichoke

Samples were applied to a 7% SDS-PAGE. Lane A, crude extract (90 μ g) : Lane B, Ammonium sulfate precipitate (60 μ g) : Lane C, Sephadex G-100 fraction (47 μ g) : Lane D, DEAE-cellulose fraction (3 μ g) : Lane E, Molecular weight marker protein (100 μ g).

를 통하여 최종적으로 얻어진 효소는 단일한 띠를 나타냈으며 이것은 이 효소가 단일한 종류의 단백질로 이루어져 있음을 보여준다. 이 폴리펩티드의 분자량은 57,000으로서 Sephadex G-100컬럼에서 분자량이 더 큰 것으로 나타난 invertase의 분자량이 86,000인 것을 고려할 때¹⁵⁾ 이 효소는 분자량이 57,000인 하나의 폴리펩티드로 구성되어 있다고 생각된다.

최적 pH와 최적온도

Fig. 5와 Fig. 6에서 보는 바와 같이 돼지감자 inulase의 최적 pH와 최적 온도는 pH5.0과 33 $^{\circ}$ C였다. 일반적으로 inulase의 최적 pH는 세균인 *Arthrobacter*

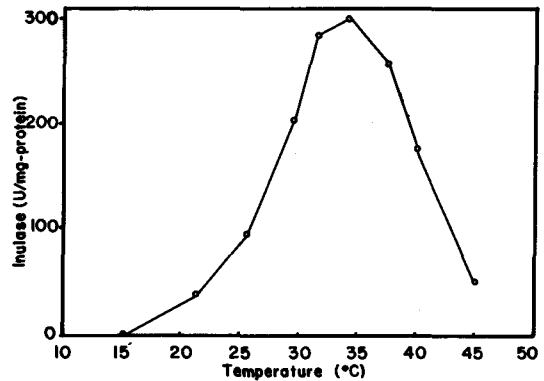


Fig. 5. Effect of temperature on the inulase activity from Jerusalem artichoke.

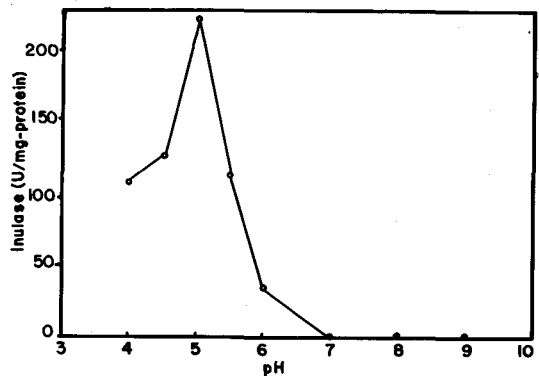


Fig. 6. pH-activity curve of inulase from Jerusalem artichoke. Enzyme activity was assayed by the standard assay method except for the pH of substrate. The buffers used were acetate buffers from pH 4 to pH 6, phosphate buffers from pH 6 to pH 8, and borate buffer at pH 9.

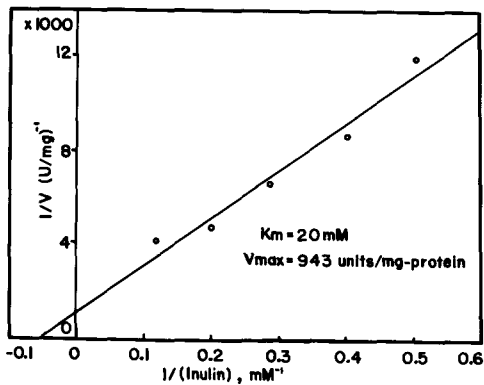


Fig. 7. Effect of inulin concentration on the rate of fructose formation by inulase from Jerusalem artichoke.

Molecular weight of Inulin was assumed to be 5,000.

ureafaciens 의 pH 6.0¹⁴⁾을 제외하고 pH 4.5 -5.0으로 산성쪽으로서 돼지감자 inulase도 같은 속성을 가짐을 알 수 있다. 최적온도는 곰팡이 효소의 45~50°C와 효모나 세균의 50~55°C에 비해 훨씬 낮았다.¹²⁻¹⁴⁾

Km

Inulin의 농도를 증가함에 따라 이 효소의 반응속도는 증가하여 hyperbolic한 곡선을 보였다. 이것을 double reciprocal plot을 하여 구한 이 효소의 Km 값은 20mM이었다(Fig. 7). 이 값은 inulin의 분자량을 5,000으로 가정한 값으로서 Edelman등⁶⁾의 결과인 33mM과 큰 차이가 없었다. 그런데 곰팡이나 효모들이 분비하는 inulase는 0.2 -20mM 정도로서¹¹⁾ 이들과 비교해볼 때 돼지감자의 경우엔 상대적으로 큰 값을 보임을 알 수 있다. 또한 이 효소의 Vmax 값은 943unit / mg-단백질이었다. 이 값은 미생물효

Table 2. Action of inulase on some substrates.

Substrate	Concentration (mM)	Linkage	Specific activity (U / mg-protein)
Inulin	8.5*	β-2,1	244.7
Stachyose	100	β-2,1	0.2
Raffinose	100	β-2,1	1.2
Sucrose	100	β-2,1	0
Lactulose	100	β-4,1	0

* : Molecular weight of inulin was assumed to be 5,000

Table 3. Effect of different effectors on the activity of inulase from Jerusalem artichoke

Effector	Activity(%)
control	100
EDTA	100
HgCl ₂	0
CuCl ₂	0
MgCl ₂	0
MnCl ₂	15
ZnCl ₂	40
CaCl ₂	30

Measurements were carried in the standard assay mixture after 5 min preincubation with effectors. Final concentrations of effectors were 10mM. Activities were compared in % to control experiment.

소와 비교할 때 훨씬 작은 것으로서 *Aspergillus niger*의 inulase는 5,000 -9,000이다.⁴⁾

기질 특이성

Inulase의 기질특이성은 Table 2에서 보는 바와 같다. 이 효소는 sucrose를 전혀 분해하지 않았으며 이는 inulin의 분해율에 비할때 2.9%의 분해율을 갖는다는 Edelman등⁶⁾의 결과와는 다른 것이다. 또한 sucrose분자의glucose 쪽에 glucose가 1개 또는 2개가 결합되어 있는 raffinose와 stachyose에도 거의 작용하지 않았다. Lactulose는 fructose와 glucose가 β-4,1으로 연결된 화합물인데 여기에도 이 효소는 전혀 작용하지 않았다. 따라서 이 효소는 fructose 분자끼리 β-2,1으로 결합된 결합에만 작용하며 endoacting 효소일것으로 생각된다.

금속이온의 영향

몇 종류의 금속이온들이 이 효소의 활성도에 미치는 영향을 Table 3에 나타냈다. chelating agent인 EDTA를 10mM의 농도로 처리했을 때 효소활성도에는 변화가 없었다. 따라서 이 효소는 금속 이온을 촉매 작용에 요구하는 metalloenzyme은 아니라고 생각된다. Mn²⁺, Zn²⁺, Ca²⁺들에 의해서 효소활성이 크게 저해되었으며 Mg²⁺는 Hg²⁺, Cu²⁺와 함께 이 효소의 작용을 완전히 저해하였다. 미생물이 생산하는 inulase가운데는 Mn²⁺에 의해서 활성도가 증

가되는 것들이 있는데^{11,12)} 이 효소는 오히려 Mn^{2+} 에 의해서 효소활성이 저해된 점이 독특하였다.

요 약

돼지감자로부터 inulase를 분리한 다음 황산 암모늄침전, Sephadex G-100 겔 투과 및 DEAE-cellulose 크로마토그래피를 통하여 정제하여 최종적으로 회수율 42%의 6,470배 정제된 효소를 얻었다. 이 효소의 분자량은 57,000으로서 하나의 폴리펩티드로 구성되어 있었다. 이 효소의 최적 pH와 최적온도는 pH5.0과 33°C이었으며 몇 가지의 기질중 inulin에 대해서만 특이적으로 작용하였고 이에 대한 Km값은 20mM, Vmax는 943unit/mg-단백질이었다. 또한 이 효소는 metalloenzyme이 아니며 Hg^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} 등의 금속 이온에 의해 그 작용이 완전히 저해되었다.

(이 논문은 1986년도 문교부 자유과제학술연구 조성비에 의하여 연구되었음.)

문 헌

- Edelman, J. and Jefford, T.G. : The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in *Helianthus tuberosus*. *New Phytol.*, **67**, 517(1968)
- Fleming, S.E. and GrootWassink, J.W.D. : Preparation of high-fructose syrup from the tubers of the Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). *CRC Critical Rev. Food Sci. Nutr.*, **12**, 1 (1979)
- 김기철 : 미생물 inulase에 의한 돼지감자중의 inulin 분해에 관한 연구, *한국농화학학회지*, **18**, 177(1975)
- Uhm, T.B., Jhon, D.Y., Byun, S.M., Hong, J. S. and GrootWassink, J.W.D. : Purification and properties of β -fructofuranosidase from *Aspergillus niger*. *Biochim. Biophys. Acta*, **926**, 119 (1987)
- Snyder, H.E. and Phaff, H.J. : Studies on a β -fructosidase (inulinase) produced by *Saccharomyces fragilis*, *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.*, **26**, 433(1960)
- Edelman, J. and Jefford, T.G. : The metabolism of fructose polymers in plants, 4. β -Fructofuranosidases of tubers of *Helianthus tuberosus* L., *Biochem. J.*, **93**, 148(1964)
- Avigad, G. and Bauer, S. : *Fructan hydrolases*, In "Methods Enzymol.", Academic Press, New York, **8**, 621(1966)
- Miller, G.L. : Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, **31**, 426(1959)
- Bradford, M.M. : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*, **72**, 248(1976)
- Laemmli, U.K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680(1970)
- 엄태봉 : 미생물 이눌라이제에 관한 연구. 한국과학기술원 박사학위 논문. 서울, 1987.
- Nakamura, T., Mariki, S., Nakatsu, S. and Veda, S. : General properties of an extracellular inulase (P-II) from *Aspergillus niger*. *Nippon Nogei-gaku Kaishi*, **52**, 581(1978)
- Byun, S.M. and Nahm, B.H. : Purification and characterization of inulnase from *Kluyveromyces fragilis*. *Korean Biochem. J.*, **10**, 95(1977)
- Uchiyama, T., Niwa, S. Tanaka, K. : Purification and properties of *Arthrobacter ureafaciens* inulase. *Biochim. Biophys. Acta*, **315**, 412(1973)
- 김명희, 전덕영 : 돼지감자로부터 invertase의 정제 및 특성연구, *한국생화학학회지*, **21**, 게재중(1988)
- Negro, H. and Kito, E. : β -Fructofuranosidases from *Candida kefir*. *J. Fermt. Technol.*, **51**, 96 (1973)
- Inagaki, S. and Honjo, A.A. : Preparation of fructose from Jerusalem artichoke : *J. Pharm. Soc. Jpn.* **69**, 418(1949)
- Nakamura, T. and Hoashi, S. : Microbial inulase (inulin hydrolase). I. Cultural conditions for inulase production by *Penicillium*. *Nippon Nogei-gakaku Kaishi*, **43**, 599(1969).

(Received June 20, 1988)