

***Pseudomonas* sp.가 생산하는 Inulinase에 관한 연구**  
- 효소의 정제와 성질 -

이태경<sup>1</sup>·최용진<sup>2</sup>·양한철<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>고려대학교 농과대학 식품공학과 <sup>2</sup>유전공학과

**Purification and Properties of Extracellular Inulinase of  
*Pseudomonas* sp.**

**Lee, Tae-Kyung<sup>1</sup>, Young-Jin Choi<sup>2</sup> and Han-Chul Yang<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Department of Food Technology, <sup>2</sup>Department of Genetic Engineering,  
College of Agriculture, Korea University, Seoul 136-701, Korea.

Two forms of extracellular inulinase, designated as PI and PII were detected in the crude enzyme preparation from a species of *Pseudomonas* isolated from soil. PI and PII were purified to homogeneity by ammonium sulfate fractionation, DEAE Sephadex A-50 chromatography, Sephadex G-100 and Sephadex G-200 gel filtration. Both isoenzymes catalyzed specifically and endowise the cleavage of the  $\beta$ -2,1-fructofranoside linkage of inulin, and displayed no action upon sucrose, raffinose and levan. The optimal pH values for the PI and PII enzyme were pH 5.5 and 6.0, respectively and the highest activity of the two enzymes was observed at 55°C. The  $K_m$  values of PI and PII were calculated to be  $2 \times 10^{-3}M$  and  $5 \times 10^{-3}M$ , respectively.

Inulin을 분해, 중요 감미료인 fructose를 대량 생산할 수 있는 효율적인 inulin의 생물학적 분해 개발을 위한 기초연구로서 저자 등은 전보(1)에 보고한 바와 같이 inulin을 유일 탄소원으로 이용하여 다량의 균체의 inulinase(EC 3.2.1.7;  $\beta$ -fructan fructanohydrolase)를 유도 생산하는 미생물 균주를 토양으로부터 분리하였다. 분리균의 형태적 내지는 생리적 특성을 조사한 결과 *Pseudomonas*속의 균주로 동정하였으며 동시에 inulinase 생산을 위한 최적 배양조건도 검토하여 그 결과를 보고하였다.

본보에서는 상기 토양 분리균인 *Pseudomonas* sp. No. 65 균주에 의해 생산된 inulinase를 정제하여 효소의 일반성질을 검토, 그 결과를 보고한다.

**재료 및 방법**

**사용균주 및 시약**

본 연구에 사용한 inulinase 생산균주는 *Pseudomonas*속으로 동정된 No. 65 토양 분리균이었

으며 초기 pH가 6.8이고 inulin 0.5%, peptone 0.2%,  $NH_4 H_2PO_4$  0.8%,  $(NH_4)_2HPO_4$  0.4%, KCl 0.05%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.05%,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.001% 및 Agar 1.5%로 구성된 한천 slant에 접종 배양하여 4°C에서 보관하였다. 사용 시약중 inulin, melezitose, levan, raffinose, bovine serum albumin, DEAE Sephadex A-50, Sephadex G-100 및 Sephadex G-200 등의 시약은 Sigma 제품, 기타 일반시약은 시판 1급 이상의 분석용 시약을 사용하였으며 inulin의 효소 가수분해물 분석용 표준물질로 사용한 inulo-oligosaccharides는 Nakamura 등의 방법(2)에 따라 inulin 10g을 0.01 N-HCl에 용해 100 mL로 定容하고 70°C에서 30분간 가수분해 시킨 직후에 5%  $Na_2CO_3$ 용액을 가해 중화시킨 다음 감압 농축하여 조제하였다.

**조효소액 조제**

Inulin 1.0%,  $(NH_4)_2HPO_4$  0.8%, corn steep liquor 1.5%, KCl 0.05%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.05%

**Key words:** Inulinase, purification & property, *Pseudomonas* sp.

\*Corresponding author;

및 FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.003%(pH 7.0)의 조성을 지닌 효소 생산용 배지에 종균(기초배지에서 15시간 배양한 배양액)을 3% 접종(생균수 약 10<sup>7</sup>/ml), 45°C에서 60시간 회전진탕배양(140 rpm)하여 얻은 배양액을 10,000 rpm(12,000g)에서 30분간(4°C) 원심분리, 균체를 제거한 상등액을 inulinase 조효소액으로 사용하였다.

**효소활성 측정**

효소활성은 전보(1)에서 기술한 방법으로 1분간에 1 μmole의 환원당을 생산하는 효소량을 1단위로 정하였으며, 비활성은 효소 단백질 mg당, 효소 활성 단위로 표시하였다.

**단백질 측정**

Bovine serum albumin을 표준단백질로 하여 Lowry법(3)에 따라 효소용액 중의 단백질량을 측정하였다.

**효소분해 생성물의 분석**

Inulin의 효소분해는 2% inulin [0.025 M acetate 완충용액(pH 5.5)로]용액 100 ml에 30 U/ml의 PI 효소액 2 ml를 첨가하고, 50°C로 유지반응을 계속시키면서 경시적으로 시료를 취하여 5분간 가열하여 반응을 정지시켰다. 그리고 분해생성물은 Collins와 Chandorkar 등의 paper chromatography법(4)으로 분석하였다. 즉 Whatman paper No.3와 1-propanol : ethylacetate : water (2 : 2 : 1, v/v)용액(5)을 사용, 3중 전개시킨 후 80°C에서 건조하고 urea spray reagent(6)로 발색시켰다.

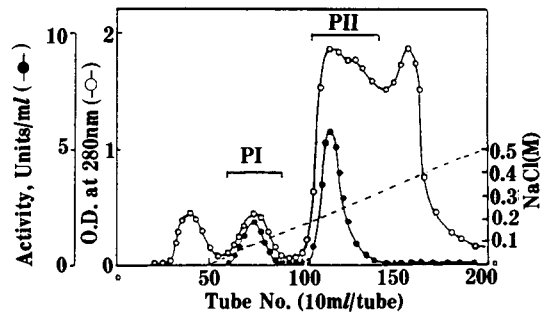
Fructose 1% 표준용액은 benzoic acid 포화용액에, sucrose 표준용액은 1% 수용액을 사용하였다.

**결과 및 고찰**

**효소정제**

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 분획 : 총 효소활성이 2,300 units인 693 ml의 조효소액을 ammonium sulfate 분획을 실시 효소활성이 높았던 40-70% 분획을 취하여 0.01 M acetate buffer(pH 5.5)에 용해하여 19 ml의 효소용액을 얻고 동일 완충용액 중에서 12시간 투석시켰다. 투석이 끝난 효소액의 비활성은 8.8 units/mg으로써 조효소액에 비해 약 3.6배 증가되었으며 효소 회수율은 60%이었다(Table 1 참조).

DEAE-Sephadex A-50 chromatography : 硫酸분획에서 얻은 효소액은 polyethyleneglycol(PEG) 6,000을 사용 농축시킨 다음 Sephadex A-50 column (2×45 cm)에 흡착시키고 0.05 M Tris buffer(pH 7.5)로 세척하였다. 세척후 동완충액 중에 NaCl을 0.5 M까지 직선적으로 gradient elution을 실시(유속



**Fig. 1. Chromatography of inulinases on DEAE Sephadex A-50.**

DEAE Sephadex A-50 was equilibrated with 0.05M Tris buffer (pH7.5). The column was eluted with a linear gradient of 0.5M NaCl with 0.05M Tris buffer at a flow rate of 16 ml/hr.

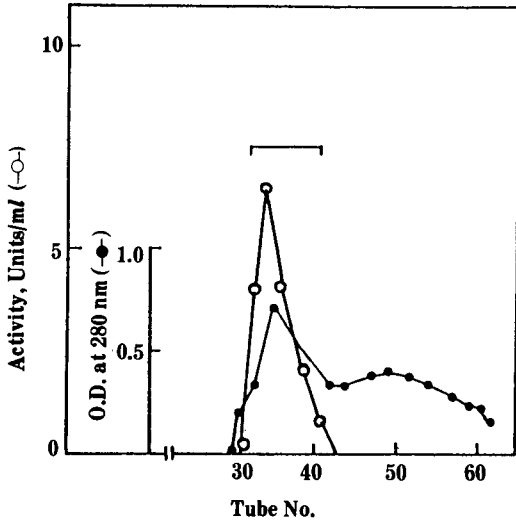
**Table 1. Summary of purification of inulinase from *Pseudomonas* sp. No. 65.**

Step	Volume (ml)	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Crude extract	693	2,260	915	2.47	100	1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 40-70%	19	1,356	154	8.80	60	3.56
DEAE-Sephadex A-50	130	232	27.0	8.62	10.26	3.48
P-II	230	442	73.3	6.03	19.56	2.54
Sephadex G-100						
P-I	30	206.4	10.3	19.96	9.13	8.08
P-II	40	391.3	15.7	24.86	17.32	10.06
Sephadex G-200						
P-I	20	161.5	2.9	55.70	7.25	22.55
P-II	22	346.5	8.5	40.76	15.33	16.50

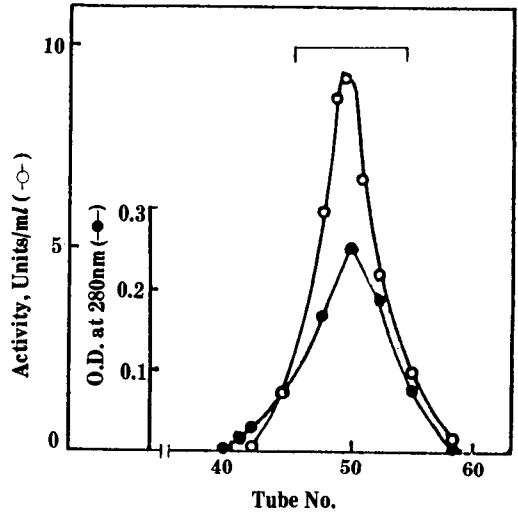
16 ml/hr)하여 10 ml씩 분취하였다. Fig. 1에 표시되어 있는 바와 같이 공시균주인 *Pseudomonas*속 토양 분리균은 두종의 서로 다른 inulinase를 생산하여 0.1 M 부근의 NaCl농도에서 용출되는 inulinase를 P I, 0.24 M NaCl농도에서 용출되는 것을 P II라고 구분하여 명명하였으며, P I의 총 활성은 232 units이었고 P II는 442 units로써 P I에 비해 약 배에 가까운

수치를 나타내었다.

**Sephadex G-100 및 G-200 filtration:** P I과 P II 효소용액을 각각 한외여과기 XM100(Amycon製)과 PEG 6,000을 이용 농축, 투석시킨 다음 Sephadex G-100 column(2×90 cm)에 흡착, 0.01 M-acetate buffer(pH 5.5)로 용출, Fig. 2와 3의 결과를 얻었다. 두 inulinase는 다같이 Gel여과 함으로

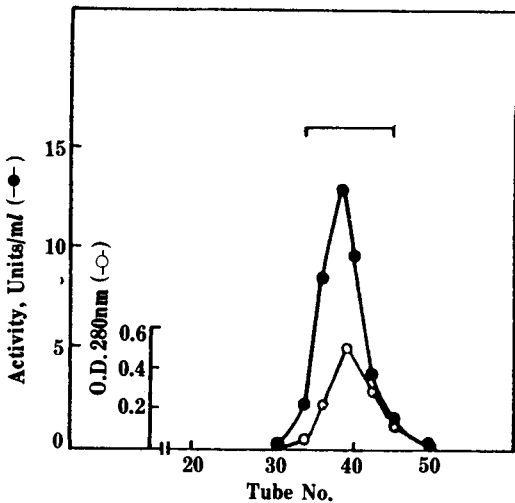


**Fig. 2. Gel Filtration of Peak-I on Sephadex G-100.** A column of Sephadex G-100 (2×90cm) was equilibrated with 0.01M acetate buffer (pH 5.5). Elution was performed with the same buffer at a flow rate of 7.5ml/hr. Fractions 34-42 (3.5ml/tube) were combined.

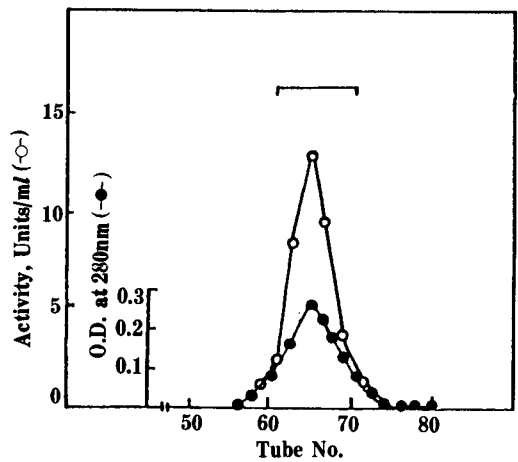


**Fig. 4. Second gel filtration of Peak I on Sephadex G-200.**

A column of Sephadex G-200 (1.7×81cm) was equilibrated with 0.01M acetate buffer (pH 5.5). Elution was performed with the same buffer at a flow rate of 8ml/hr. Fractions 45-54 (2ml/tube) were combined.



**Fig. 3. Gel Filtration of Peak-II on Sephadex G-100.** A column of Sephadex G-100 (2.0×90cm) was equilibrated with 0.01M acetate buffer (pH 5.5). Elution was performed with the same buffer at a flow rate of 7.5ml/hr. Fractions 34-45 (3.5ml/tube) were combined.



**Fig. 5. Second Gel filtration of P-II on Sephadex G-200.**

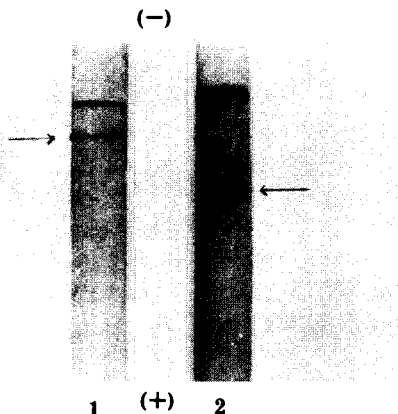
A column of Sephadex G-200 (1.7×81cm) was equilibrated with 0.01M acetate buffer (pH 5.5). Elution was performed with the same buffer at a flow rate of 8ml/hr. Fractions 61-71 (2.0 ml/tube) were combined.

써 효소 손실도 극히 적었을 뿐만 아니라 P I과 P II의 비활성이 각각 약 20, 25 units/mg으로써 조효소액에 비해 약 8배내지 10배 정도 정제되었다. Gel 여과가 끝난 효소액은 PEG 농축을 거친 다음 Sephadex G-200 column(1.7×81 cm)을 사용 재차 여과 정제하였다. Fig.4와 Fig.5에서와 같이 단백질과 효소활성을 나타내는 곡선이 거의 일치되고 있어 높은 정제도를 보이며 P I과 P II의 비활성이 각각 55.7과 40.8 units/mg으로써 실제 정제도가 약 22.6 배와 17배 이었으며 최종적으로 P I 2.9 mg, P II 8.5 mg의 정제효소단백질을 얻었다.

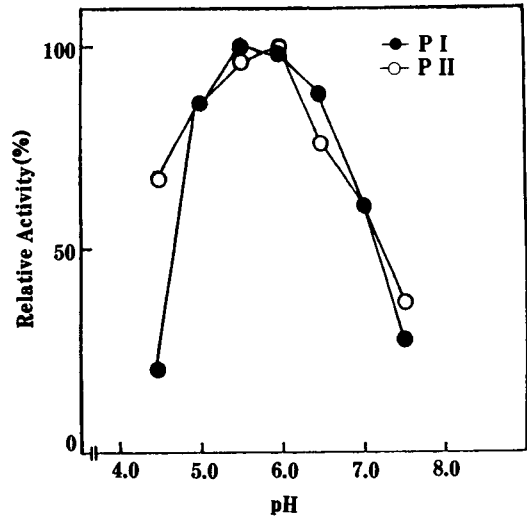
정제효소는 7.6% polyacrylamide gel을 이용, disc gel 전기영동(7)을 실시, 최종 정제도를 확인한 결과 Fig.6과 같이 P I, P II 두 효소가 다같이 단일 band로 나타났으므로 두 정제효소액이 단일 단백질로 구성되어 있음을 확인하였다.

**효소의 일반적 성질**

**최적 pH:** pH 4.5-7.5범위에서 pH를 0.5간격으로 조정 조제한 0.1 M McIlvane buffer를 사용하여 조제한 1% inulin용액 0.5ml에 동일 원충용액으로 희석조제한 효소액 0.5ml을 가하고 40°C에서 30분간 반응시켜 Fig.7에서와 같이 P I은 pH 5.5, P II는 pH 6.0에서 가장 높은 효소활성을 나타내었으며 두 효소가 다같이 매우 좁은 범위의 최적 pH를 가지고 있었다. 대부분의 곰팡이(2, 8-10)와 효모(11-13) inulinase는 P I과 P II보다 약간 낮은 pH 5.0 전후의 최적 pH를 가지고 있는데 비해 *Arthrobacter* (14)와 *Bacillus* (15) inulinase는 pH 6.0 전후의 최적 pH를 나타내고 있다고 보고되고 있어 본 효소와 더불어 세균 inulinase는 중성에 가까운 약산성에서 가장 높은 효소활성을 나타내는 것이 일반적이라고 생



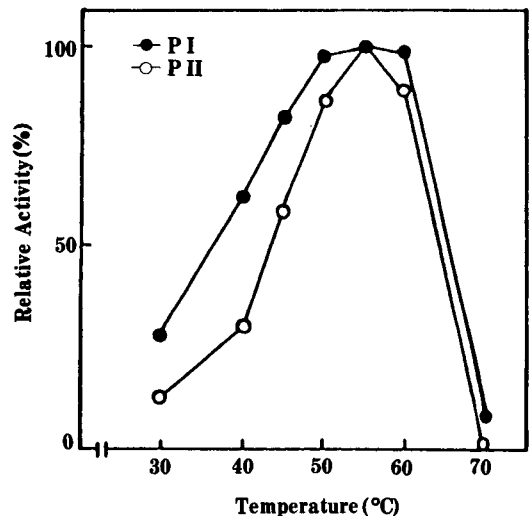
**Fig. 6. 7.5% Polyacrylamide Gel Electrophoresis of P I and P II. 1; Peak1 2: Peak-II**



**Fig. 7. Effect of pH on the activity of inulinase.** The reaction was carried out for 30 min at 40°C in McIlvane buffer of various pH values.

각된다.

**최적 온도:** 정제 P I, P II 효소활성의 최적온도를 조사한 결과 Fig.8과 같이 두 inulinase가 공히 55°C 부근에서 가장 높은 효소활성을 나타내었다. 이와같은 최적온도는 지금까지 보고되고 있는 대다수의 곰팡이(2, 9, 10), 효모(11-13) 및 세균(14, 15) 등의 미생물 inulinase의 최적온도(40~60°C)와



**Fig. 8. Effect of temperature on the activity of inulinase.** The reaction was carried out at various temperatures indicated in the figure for 30 min. in 0.1M acetate buffer (pH 5.5).

같은 경향의 온도인 동시에 오염방지와 기질인 inulin의 용해도 측면에서 가장 바람직하다고 평가되고 있는 inulin 가수분해 온도인 60°C에도 가까운 온도이다.

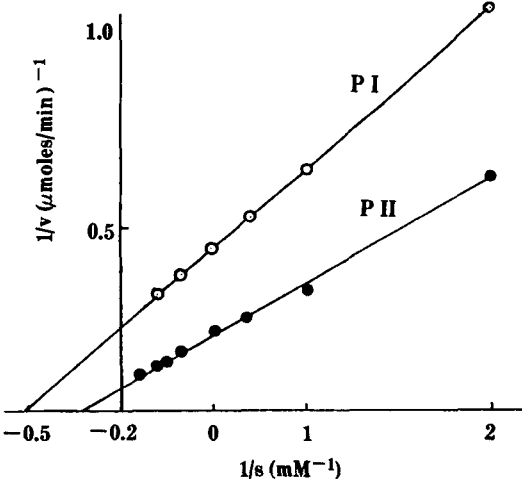
**기질특이성** : Inulin을 비롯하여 fructose를 구성성분으로 하고 있는 각종 탄수화물의 분해정도를 측정, P I, P II 효소의 기질 특이성을 조사한 결과 Table 2에서와 같이 P I과 P II효소는 inulin에만 특이적으로 작용하고 다른 기질에는 전혀 작용하지 않는 특성을 보였으며 특히 melezitose을 기질로 이용하지 않고 있어 본 PI, P II, 효소는 α-glucosidase 활성을 가지고 있지 않다는 것을 확인할 수 있었다.

이상의 기질 특이성은 Nakamura 등(9)이 분리 정

**Table 2. Substrate Specificity of Inulinases**

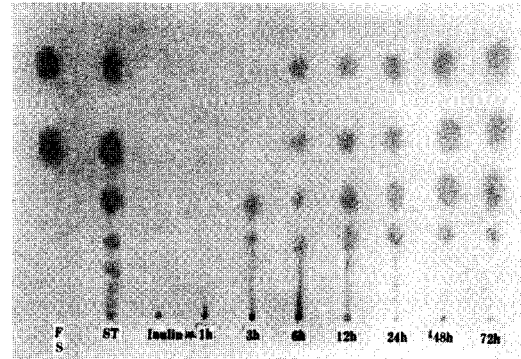
Substrate	Relative activity (%)	
	Crude enzyme P-I	P-II
Inulin(β-2,1 fructan)	100	100
Sucrose(6glc α 1-2β fructan)	0	0
Raffinose(galα1-6glc α 1-2β fru)	10	0
Levan(β-2,6 fructan)	0	0
Melezitose(glcα1-3fruβ 2-1 α glc)	0	0

The concentration of each substrate was 0.25%. The results were compared with the hydrolysis rate of inulin.



**Fig. 9. Lineweaver-Burk Plots of Inulinase Peak-I and Peak-II.**

Substrate concentration was calculated by assuming that the molecular weight of inulin was 5400. The reaction was carried out for 30 min with varying concentrations of substrate in 0.1M acetate buffer(pH 5.5) at 40°C.



**Fig. 10. Paper chromatogram of hydrolyzates of inulin with PI inulinase at various times.**

F: Fructose.

S: Sucrose

ST: Standard mixture of fructo-oligosaccharides

제한 *Aspergillus niger* 12균주의 P-III inulinase 특성과 일치되는 결과이다.

한편 inulin의 분자량을 5,400으로 추정했을 때 P I, P II효소의 inulin기질에 대한 Michaelis constant는 각각  $2 \times 10^{-3}$  M과  $5 \times 10^{-3}$  M로써 P I효소가 P II보다 약간 높은 기질 친화력을 보였다(Fig. 9 참조).

**Inulin의 효소분해**

P I, P II 효소의 inulin 분해기작을 살펴보기 위하여 2% inulin용액 100 ml에 60 units의 P I 효소를 첨가하고 50°C에서 72시간 반응시키면서 경시적으로 반응생성물을 paper chromatography로 분석, Fig. 10과 같은 결과를 얻었다.

반응개시 3시간 전후까지는 주로 중합도가 높은 oligosaccharides가 다량 생성되었으며 반응 6시간 이후부터는 분해가 더욱 진행되어 fructose와 sucrose가 검출됨과 동시에 3, 4, 5, 6의 중합도 순으로 각종 oligosaccharides가 검출되었다.

이상의 결과로 본 연구의 공시 균주인 *Pseudomonas* sp. No. 65가 생산하는 P I과 P II inulinase(자료제시는 하지 않았으나 P II 효소도 P I과 완전 일치되는 반응생성물 분석결과를 보였다)는 다같이 inulin 분자의 β-2,1결합을 무작위적으로 절단해 주는 Endo-type의 효소인 β-2,1-D-fructan-fructanohydrolase(EC 3, 2, 1, 7)라는 것을 알 수 있었다.

**요 약**

*Pseudomonas* sp.로 동정된 토양분리균의 inulinase를 ammonium sulfate 분획, DEAE

Sephadex A-50 Chromatography, Sephadex G 100 및 Sephadex G 200 gel여과 등의 과정을 거쳐 정제한 결과 inulinase P I 과 P II의 두 isoenzyme으로 분리되었으며 각각 약 24배와 17배 정제되어 단일단백질로 분리되었다.

P I, P II 두 isoenzyme은 다같이 sucrose, raffinose 및 levan은 분해하지 못하고 inulin만을 endo-type로 분해 절단하는  $\beta$ -2, 1-fructanfructanohydrolase (EC 3. 2. 1. 7)임이 밝혀졌다.

효소활성 최적온도는 두 효소가 같은데 비해 (55°C), 최적 pH는 P I이 pH 5.5, P II가 pH 6.0으로 약간의 차이를 보였다.

Inulin에 대한  $K_m$ 값은 P I ;  $2 \times 10^{-3}$  M, P II ;  $5 \times 10^{-3}$  M로써 P I 효소가 P II보다 약간 높은 친화력을 보였다.

## 사 사

본 연구는 한국과학재단의 연구비로 수행되었으며 이에 깊은 감사를 표하는 바입니다.

## 참고문헌

1. Lee, T.K., Sung, H.C., Choi, Y.J. and Yang, H.C.: Culture condition for inulinase production by *Pseudomonas* sp. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **15**, 176(1987).
2. Nakamura, T., Hoashi, S. and Nakatsu, S.: General properties of extracellular inulase from *Penicillium*: *Nippon Nogeikagaku kaishi*, **51**, 681 (1977).
3. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
4. Collins, F.W. and Chandorkar, K.R.: Thinlayer chromatography of fructo-oligosaccharides: *J.*

*Chromato.* **56**, 163 (1971).

5. Edelman, J. and Dikerson, A.G.: The metabolism of fructose polymers in plant: *Biochem. J.* **98**, 787 (1966).
6. Wise, C.S., Dimler, R.J., Davis, H.A. and Rist, C.E.: Determination of easily hydrolyzable fructose units in dextran preparations: *Anal. Chem.* **27**, 33(1955).
7. Weber, K. and Osborn, M.: The reliability of molecular weight determination: *J. Bio. Chem.* **244**, 4406 (1969).
8. Nakamura, T., Hoashi, S. and Nakatsu, S.: Culture conditions for inulase production by *Aspergillus*: *Nippon Nogeikagaku Kaishi* **52**, 105 (1977).
9. Nakamura, T., Kurokawa, T., Nakatsu, S. and Ueda, S.: Crystallization and general properties of an extracellular inulase from *Aspergillus* sp.: *Nippon Nogeikagaku kaishi*, **52**, 159 (1978).
10. Zittan, L.: Enzymatic hydrolysis of inulin-an alternative way to fructose production: *Starch*, **33**, 373 (1981).
11. Negoro, H. and Kito, E.: Beta-fructosidase from *Candida Kefyr*: *J. Ferment Technol.*, **51**, 96 (1973).
12. Guiraud, J.P., Viord-Gaudin, C. and Galzy, P.: Etude de L'inulinase de *Candida salticensis* van uden et Buckley *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 1245 (1980).
13. Nahm, B.H. and Byun, S.M.: Purification and characterization of inulase from *Kluyveromyces fragilis*: *Korean Biochem. J.*, **10**, 95 (1977).
14. Uchiyama, T.: Action of *Arthrobacter ureafaciens* inulase II on several oligofructans and bacterial levans: *Biochim. Biophys. Acta*, **397**, 153(1975).
15. Uhm, T.B., Hong, J.-S., Sohn, H.S. Park, M.K. and Byun, S.M.: A constitutive inulase from a *Bacillus*: *J. Kor. Agri. Chem. Soc.*, **28**, 131(1985).

(Received May 12, 1988)