

Bacillus sp.가 세포외로 생산하는 Inulinase의 정제 및 특성

김경남 · 최용진*

고려대학교 농과대학 유전공학과

Purification and Characterization of Extracellular Inulinase from *Bacillus* sp.

Kim, Kyung-Nam and Yong-Jin Choi*

Department of Genetic Engineering, College of Agriculture,
Korea University, Seoul 136-701, Korea

The extracellular inulinase from *Bacillus* spp. was purified to a single protein through a sequence of operations including ammonium sulfate fractionation, heat treatment, DEAE Sepharose Cl-6B ion exchange chromatography, Sephadex G-100 and Sephadex G-150 gel filtration. The purified enzyme was confirmed to be a β -D-fructofuranosidase (EC 3.2.1.26) which was much more active on sucrose than on inulin (I/S = 0.2). The maximal inulinase activity was observed at pH 6.0 and at the temperature of 50°C. The molecular weight of the enzyme was about 56,000. Tryptophan and histidine residues of the enzyme molecule were found to be essential for its catalytic activity.

Inulinase를 이용한 inulin의 효소학적 분해법의 효율화를 도모하여 중요 감미자원인 fructose를 경제적으로 대량생산하기 위한 기초연구의 일환으로 본 연구자 등은 강력한 endo-inulinase 생산균 분리, 효소생산 최적조건 및 효소특성 등에 관한 일련의 연구를 수행 그 결과를 이미 보고한 바 있다(1-3).

또한, exo-inulinase (EC 3.2.1.26)를 세포외로 분비하는 세균도 별도로 분리, *Bacillus* spp.로 동정함과 아울러 효소생산 최적조건을 검토하였으며(4) 본보에서는 상기 exo-inulinase를 정제, 효소특성을 조사하여 그 결과를 보고한다.

재료 및 방법

사용균주 및 시약

Bacillus spp.로 동정된 토양 분리균을 inulinase 생산균주로 사용하였으며 inulin (from *Dahlia Tubers*), su-

crose, alcohol dehydrogenase, bovine serum albumin 및 carbonic anhydrase 등은 Sigma Chemical Co. 제품, 기타 일반 시약은 1급 이상의 시판 분석용 시약을 사용하였다.

조효소액 조제

효소생산 최적배지(4)에서 45°C, 42시간 진탕배양(110rpm)한 배양액을 6,000rpm에서 50분간 원심분리한 후 상등액을 취해 inulinase 조효소액으로 사용하였다.

효소활성 측정

Inulinase 활성은 2.0% inulin 용액(0.1 M phosphate buffer, pH 6.5) 0.5 ml을 5분간 45°C에서 예열한 후 효소액 0.5 ml을 첨가하고 30분간 반응시킨 다음 DNS 방법(5)으로 생성 환원당량을 측정, 효소활성을 계산하였다.

효소활성은 1분간 1 μ mole의 환원당을 생성하는 효소량을 1 단위로 표시하였다.

Invertase 활성은 2.0% sucrose 인산 완충용액을 기

Key words: Extracellular Inulinase, Exo-inulinase purification, *Bacillus* sp.

*Corresponding author

질로 사용, inulinase 활성측정 경우와 동일한 방법에 따라 측정하였다. 단, invertase 활성은 1분간에 2 μ mole의 환원당을 생산하는 효소량을 1 단위로 표시하였다.

단백질 정량

Column 용출액의 단백질량은 자외선 흡광도법으로 기타 시료의 경우는 Bovine serum albumin 을 표준 단백질로 한 Lowry 법(6)으로 측정하였다.

효소정제

Ammonium sulfate 분획: 조효소액에 ammonium sulfate 를 가해 30-60% 포화농도에서 침전 분리된 효소 단백질을 소량의 0.1 M phosphate buffer(pH 6.5)에 용해하고 4°C에서 0.05 M phosphate buffer(pH 7.0)로 12 시간 투석하였다.

열처리: Ammonium sulfate 분획을 하여 얻은 효소액을 50°C에서 60 분간 가열한 후 원심분리(10,000 rpm, 20 분)하여 침전 단백질을 제거한 상등액을 다음 정제 단계를 위한 시료로 사용하였다.

Ion exchange chromatography: 열처리 과정을 거친 효소액을 미리 0.05 M phosphate buffer(pH 7.0)로 평형시킨 DEAE Sepharose Cl-6B column 에 흡착시키고 동일한 완충용액을 사용, 세척하였다.

용출은 0.5 M NaCl 용액을 사용한 gradient 염용액으로 실시하였으며 용출속도는 20 ml/hr, 분취량은 5 ml/tube 이었다.

Gel filtration: Ion exchange chromatography 를 거쳐 부분 정제된 효소는 다시 Sephadex G-100(superfine) column(1.5×88 cm)과 Sephadex G-150(superfine) column(1.5×94 cm)을 이용한 두 차례의 gel 여과를 실시 정제하였다.

분자량 측정: 효소 단백질의 분자량은 Sepharose

Cl-6B column(1.2×97 cm)과 0.05 M phosphate buffer (pH 7.0)를 사용한 gel 여과법을(7) 이용 측정하였다. 용출속도는 6 ml/hr 이었고 사용한 표준단백질은 alcohol dehydrogenase, bovine serum albumin 및 carbonic anhydrase 이었다.

또한 void volume(V_0)은 blue dextran 을 이용, 계산하였다.

효소반응생성물의 분석

적당량의 효소액을 2.0% inulin 기질용액에 가한 후 최적조건에서 반응시키면서 일정시간 간격으로 약 10 μ l 씩의 시료를 채취, Whatman paper(No.1)에 점적하고 1-propanol : ethylacetate : water(2 : 2 : 1, v/v)의 전개용매를(8) 이용, 상온에서 2 시간씩 3 중 전개한 다음 건조시켰다.

분해산물의 발색은 urea-metaphosphoric acid 용액(9)을 사용하였으며 표준물질로는 benzoic acid 포화용액으로 만든 1% fructose 용액과 증류수에 녹인 1% sucrose 용액 및 1% glucose 용액을 사용하였다.

효소활성에 관여하는 필수 아미노산 잔기 결정

일정량의 효소액에 특정 아미노산 수식 시약(modification reagent)를 농도별로 첨가하고 20°C에서 60 분 반응시킨 후 잔존 역가를 측정, 효소활성에 관여하는 필수 아미노산 잔기를 결정하였다(10-15).

결과 및 고찰

효소 정제

플라스크 진탕배양하여 얻은 1,500 ml 의 조효소액을 Table 1 에 표시되어 있는 5 단계의 정제과정을 거쳐 최종적으로 약 138 배 정제된 inulinase 를 얻었다.

Table 1. Summary of inulinase purification.

Step	Volume (ml)	Protein (mg)	Total activity (u)	Specific activity (u/mg)	Yield (%)	I/S*	Purity (fold)
Culture broth	1,500	4,091	450	0.11	100	0.31	1
(NH ₄) ₂ SO ₄ , 30-60%	47	617	266	0.43	59	0.30	3.9
Heat treatment 50°C, 60 min.	45	564	265	0.47	59	0.30	4.3
DEAE-Sepharose Cl-6B	9	26.9	104	3.87	23	0.31	35.2
Sephadex G-100 (superfine)	6	4.3	54	12.67	12	0.31	115.2
Sephadex G-150 (superfine)	2.5	2.2	33	15.13	7.3	0.31	137.5

*I/S = Inulinase activity per invertase activity

이 때 효소단백질의 회수율은 7.3%이었으며 7.5% polyacrylamide gel을 이용한 disc gel 전기영동에서 단일 단백질임을 확인하였다(결과 사진은 제공하지 않았음).

효소의 일반성질

최적의 pH와 온도 : 정제효소는 반응액의 수소 이온 농도가 각각 pH6.0과 pH6.5에서 inulin과 sucrose 기질에 대해 가장 높은 활성을 나타내었으며, 반응액의 pH 변동에 대해서도 비교적 민감한 반응을 보였다.

이와 같은 최적 pH는 *Arthrobacter ureafaciens* (16), *Streptomyces chibaensis* (17) 등과 같은 다른 세균 inulinase에서도 비슷한 값을 보이고 있으나, 보통 pH 4.5-5.0 사이의 최적 pH를 가지는 곰팡이와 효모 inulinase에 비해서는 다소 높은 수치라고 하겠다.

또한 상기 최적 pH값은 본 연구실에서 분리한 *Pseudomonas* spp.(1)가 생산하는 endo-inulinase의 최적 pH와 일치되고 있어 두 종의 효소를 동시에 이용할 수 있는 효율적인 inulin 가수분해 공정개발에 이점이 될 것이라고 생각된다.

또한 구체적인 자료 제공은 하지 않았지만 본 효소는 반응온도에도 큰 영향을 받아 50°C-55°C에서 현저히 높은 효소활성을 나타내고 있다. 이 점 역시 endo-inulinase와 혼합 사용하는 inulin 분해공정의 효율화에 크게

도움이 되리라 믿어진다.

pH 및 열안정성 : McIlvane buffer를 이용, 각각 다른 pH로 조정된 정제 효소액을 40°C에서 24시간 방치 후 잔존 효소활성을 측정, pH에 대한 효소안정성을 검토하여 Fig.1과 같은 결과를 얻었다. Inulinase 활성은 pH6.0-7.5, invertase 활성은 pH6.5-8.0 사이에서 매우 안정하였으며 이 범위를 벗어난 수소 이온 농도에서는 현저한 활성 저하 현상을 보였다.

한편 본 효소는 Fig.2에 표시되어 있는 바와 같이 50°C에서 120분 가열하여도 효소활성에 전혀 변화를 보이지 않았는데 이것은 *Arthrobacter ureafaciens* (16)와 *Pseudomonas* spp.(2)가 생산하는 inulinase의 열안정성에는 미치지 못하나 곰팡이 inulinase보다는 훨씬 높은 열안정성을 나타내는 것으로 inulin 가수분해에 효과적으로 이용될 수 있는 특성이라고 하겠다.

금속이온의 영향 : Table 2에 표시한 각종 금속이온을 1mM 농도로 효소액에 첨가, 30°C에서 60분 방치한 다음 잔존 효소활성을 측정, 금속이온이 효소활성에 미치는 영향을 조사하였다. Mn²⁺과 Co²⁺는 inulinase와 invertase 활성을 다같이 현저히 증가시켰으나 반대로 Hg²⁺와 Ag²⁺는 100%의 저해효과를 보였다. 기타 금속이온은 효소활성에 뚜렷한 영향을 주지 않는 것으로 판명되었다.

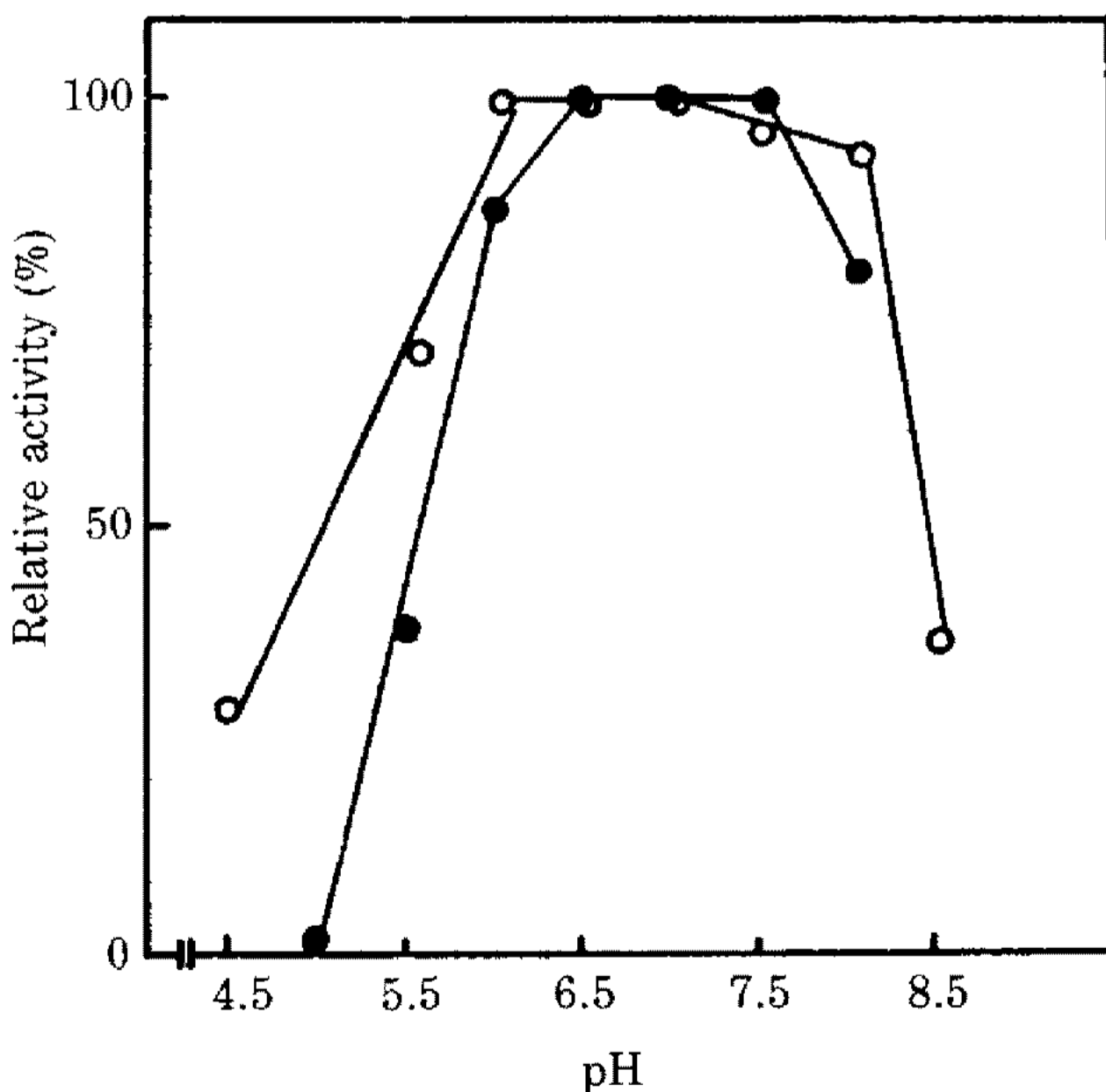


Fig. 1. pH stability of inulinase and invertase activity. The reaction was carried out for 30 min at 50°C after 24 hrs preincubation at 4°C in various pHs. Enzyme was diluted with McIlvane buffer. ○-○: Inulinase activity, ●-●: Invertase activity.

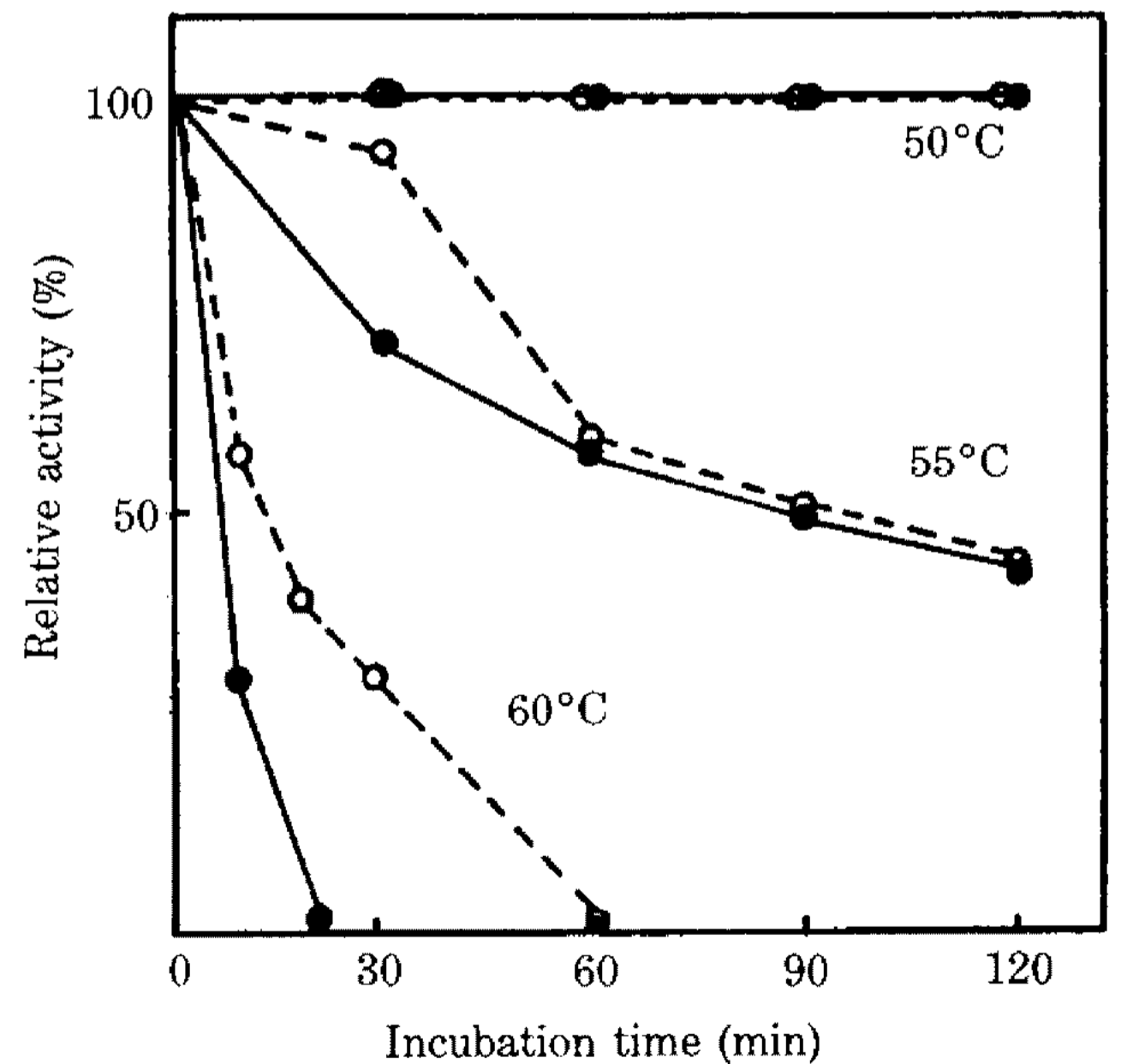


Fig. 2. Thermal stabilities of inulinase and invertase activity. The reaction was carried out for 30 min at 50°C after preincubation at different temperatures. ○-○: Inulinase activity, ●-●: Invertase activity.

Table 2. Effect of metal ions on enzyme activity.

Metal ion	Relative activity (%)	
	Inulinase	Invertase
None	100	100
Ca ²⁺	114	98
Fe ²⁺	112	98
K ⁺	106	97
Na ⁺	106	96
Mg ²⁺	104	104
Co ²⁺	163	139
Mn ²⁺	147	145
Zn ²⁺	95	110
Hg ²⁺	0	0
Ag ²⁺	0	0

The enzyme solutions were preincubated with each metal ion (1 mM) for 1 hr at 30°C and then the enzyme activity was measured.

분자량 측정

Sepharose Cl-6B gel 여과법을 이용하여 측정된 inulinase의 분자량은 약 56,000으로 계산되었다(Fig. 3 참조).

Pseudomonas spp. endo-inulinase인 PI, PII 효소의 분자량이 각각 210,000, 170,000인 것으로 측정된(2) 것에 비하면 본 효소는 매우 작은 분자로서 *Aspergillus niger* inulinase(18, 19)와 거의 같은 크기라고 생각된다.

효소활성에 관여하는 아미노산 잔기 결정

특정 아미노산 수식 시약으로 처리한 정제효소의 inulinase 및 invertase 활성을 측정된 결과(Fig. 4 참조), cysteine, cystine, arginine 및 lysine modification에 의해서는 전혀 효소활성에 변화가 없었으나 tryptophan과 histidine 잔기의 구조변화는 효소활성에 현저한 저해효과를 나타내고 있었다. 따라서 상기 두 아미노산 잔기가 본 효소의 촉매 기능에 매우 중요한 역할을 하고 있음을 알 수 있었다.

이와 같은 결과는 tryptophan만이 효소활성 필수 아미노산 잔기인 것으로 보고되고 있는 *Pseudomonas* endo-inulinase와는 분명한 차이점의 하나라고 생각된다.

기질 특이성

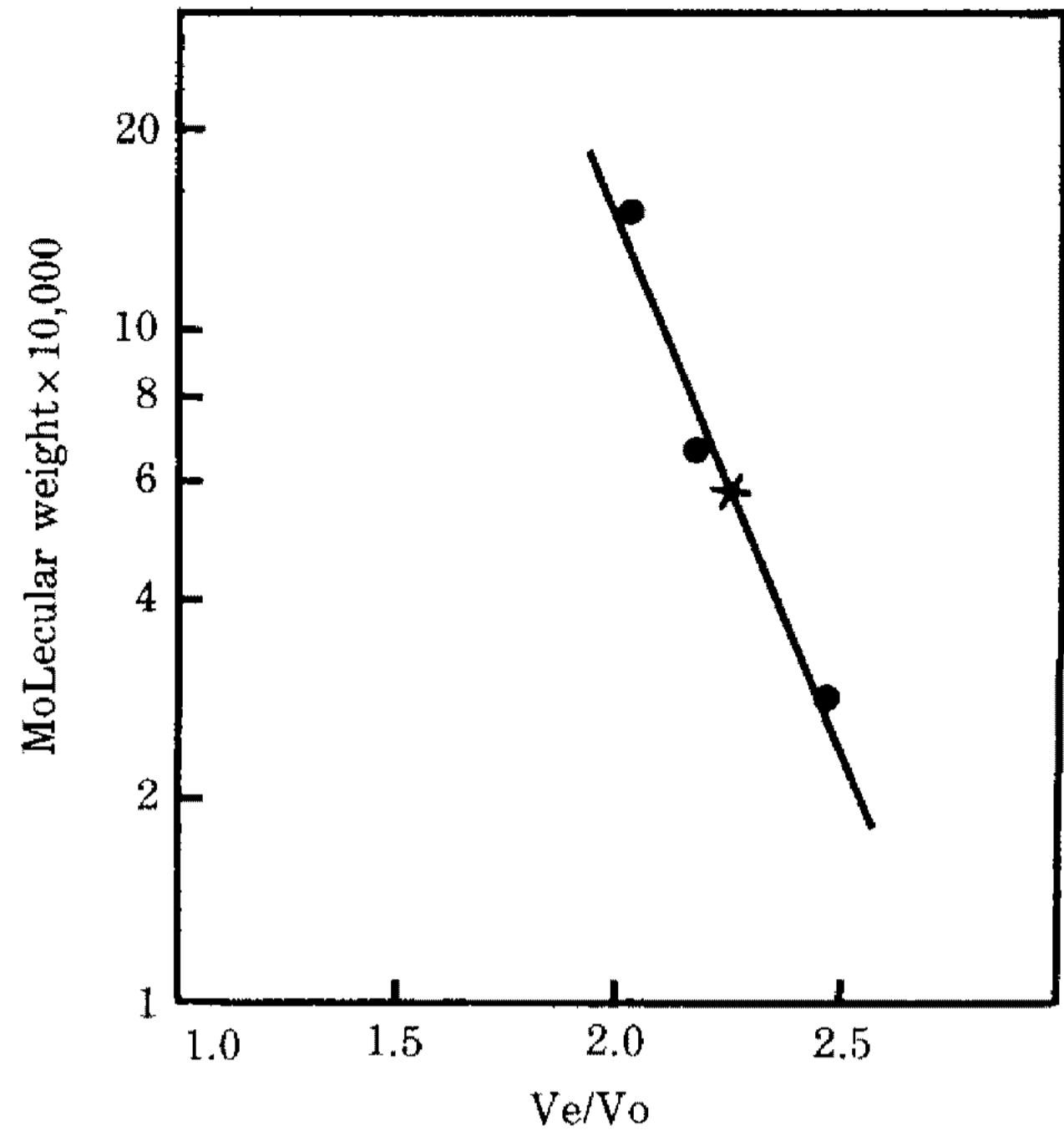


Fig. 3. Estimation of molecular weight by gel filtration on Sepharose Cl-6B (1.2 x 97 cm).

Elution was carried out by 0.05 M sodium phosphate buffer. The flow rate was 6 ml/hr.

- 1: Alcohol dehydrogenase from yeast (MW 150,000)
- 2: Albumin from bovine serum (MW 66,000)
- 3: Carbonic anhydratase from bovine erythrocyte (MW 29,000)

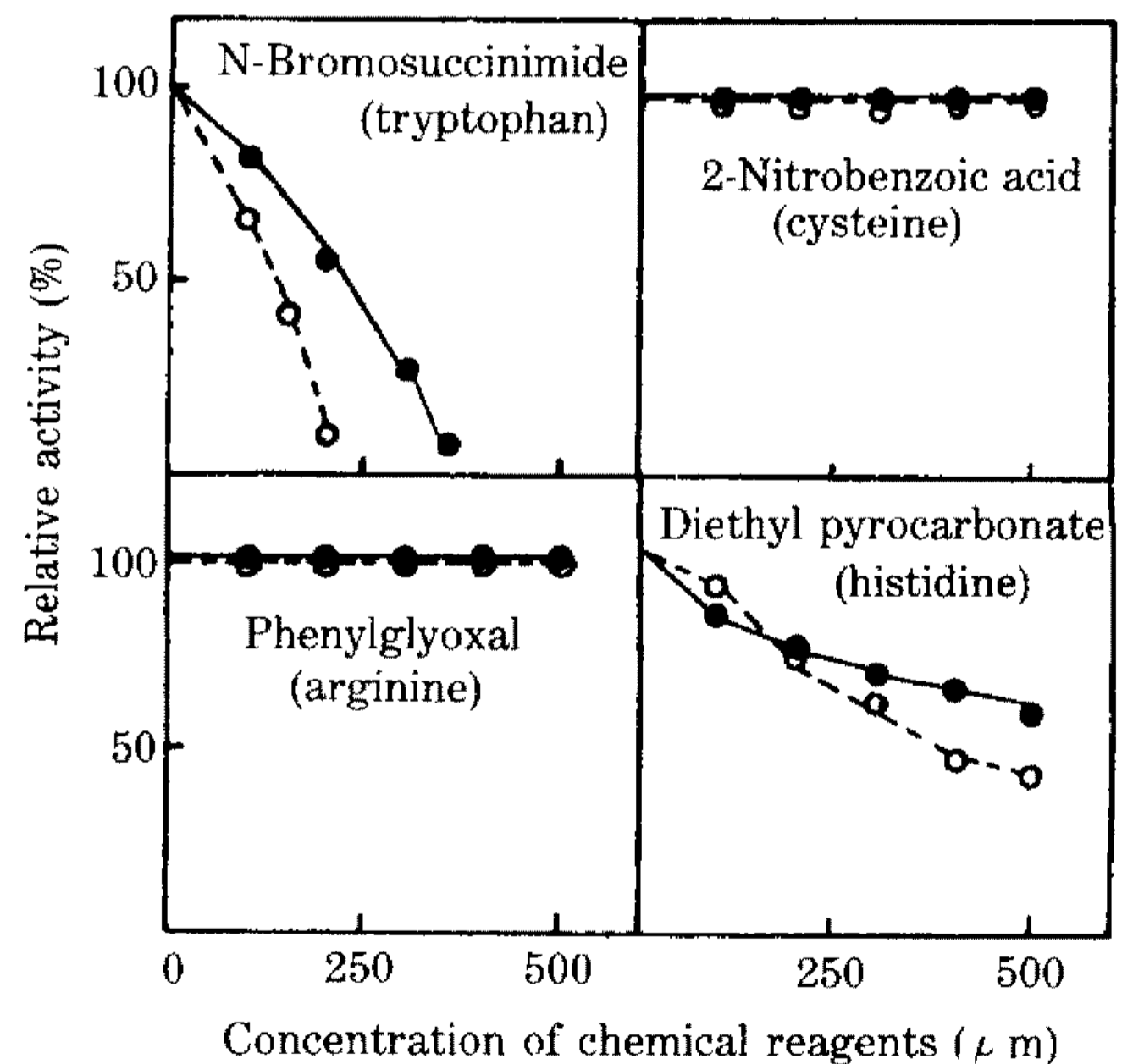


Fig. 4. The reaction of inulinase with various modification reagents as a function of the reagent concentration.

The enzyme was incubated for 60 min. at 20°C in 0.5 ml of 0.1 M phosphate buffer (pH 6.0) supplemented with the indicated concentrations of modification reagents.

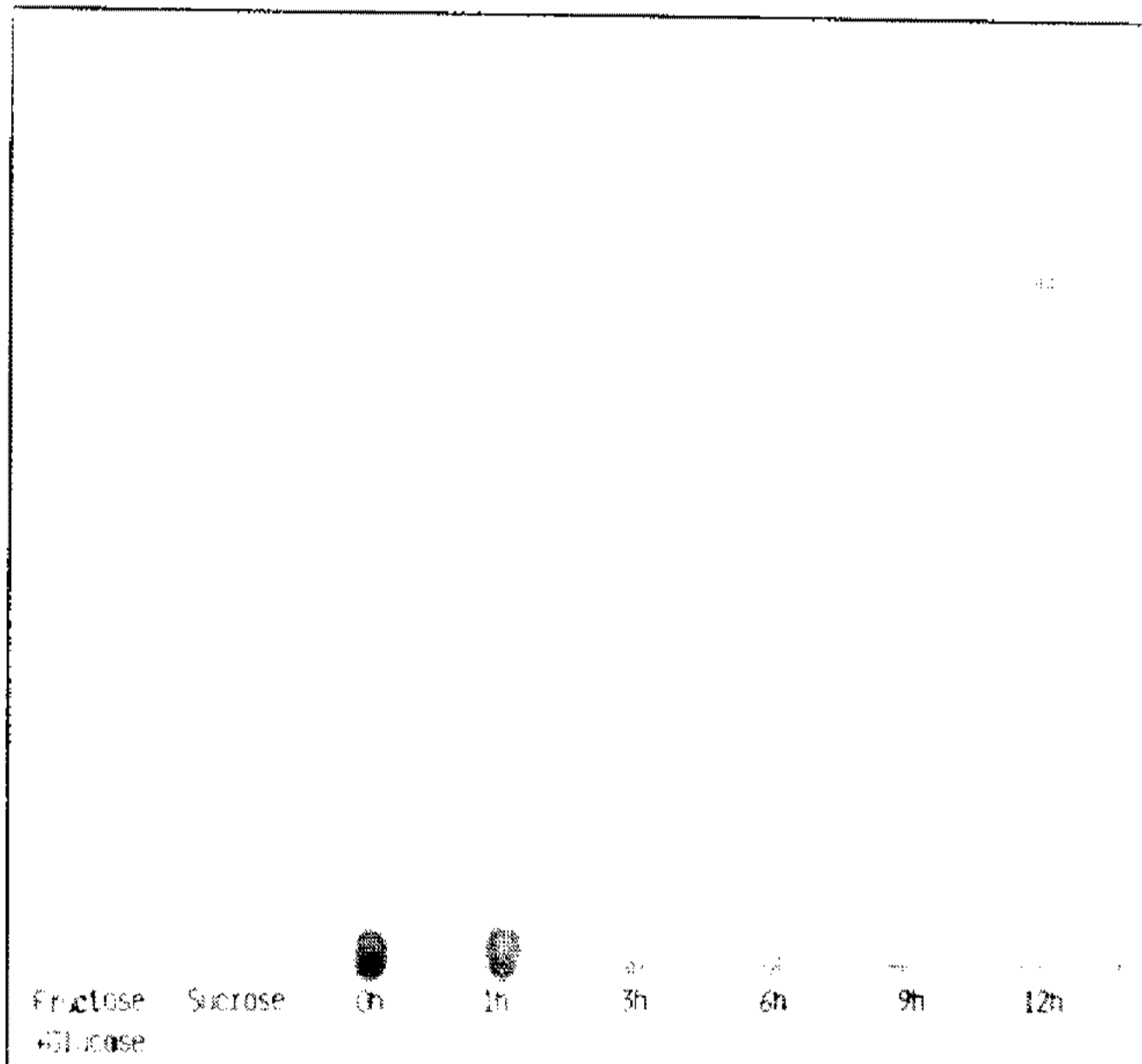
○---○: Inulinase activity, ●---●: Invertase activity

Table 3. Substrate specificity of exo-Inulinase.

Substrate	Relative Activity (%)
Inulin(β -2,1 fructan)	100
Sucrose(6 glc α 1-2 β fructan)	500
Raffinose(gal α 1-6 glc α 1-2 β fru)	192
Levan(β -2,6 fructan)	0
Melezitose(glc α 1-3 fru β 2-1 α glc)	0

The concentration of each substrate in the reaction mixture was 1%.

Each result was compared with the hydrolysis rate of inulin.

**Fig. 5. Paper chromatogram of the hydrolysates of inulin with inulinase.**

Whatman No. 1 filter paper was used.

The developing solvent was composed of 1-Propanol: Ethylacetate: Water (2:2:1, v/v)

Fructose를 구성성분으로 하고 있는 몇 가지 탄수화물에 대한 본 효소의 기질 특이성을 조사한 결과 Table 3과 같았다.

본 효소는 inulinase 활성은 물론이고 높은 invertase 활성도 가지고 있는(I/S=0.2) 것이 확인됨으로써 non-specific β -fructofuranosidase(EC 3.2.1.26)로 분류할 수 있었다. 또한 sucrose 가수분해 반응은 전형적인 Michaelis-Menten kinetics를 나타내었으며 K_m 값은 $1.0 \times 10^{-2} M$ 로 산출되었다.

반면 inulinase 가수분해 반응은 non-hyperbolic

kinetics를 나타냄으로 Lineweaver-Burk 작도법으로 정확한 K_m 값을 구할 수는 없었으나 대략의 K_m 값을 산출해본 결과 약 $2.0 \times 10^{-3} M$ 의 값을 얻을 수 있었다.

효소 반응 생성물 분석

본 연구의 공시균인 *Bacillus* spp.이 생산하는 inulinase를 이용, inulin을 가수분해하여 일정시간 간격으로 분해산물을 분석, 가수분해 반응의 특성을 조사, Fig. 5와 같은 결과를 얻을 수 있었다.

그림에서 보듯이 반응 초기에도 어떤 종류의 중간분해산물도 탐지할 수 없었으며 단지 최종 산물인 fructose와 glucose만을 검출할 수 있었다. 이와 같은 결과는 본 효소가 single chain mechanism(20)에 의해서 inulin을 순간적으로 가수분해하는 exo-inulinase일 것이라는 것을 뒷받침 해준다고 생각된다.

요 약

토양 분리균인 *Bacillus* spp.가 생산하는 inulinase를 ammonium sulfate 분획, 열처리, DEAE Sephadex Cl-6B ion exchange chromatography, Sephadex G-100 및 Sephadex G-150 gel 여과 등의 과정을 거쳐 단일 단백질로 분리 정제하였다. 정제 inulinase는 분자량이 약 56,000인 효소로서 pH 6.0, 50°C에서 최대 활성을 나타내었으며 Co^{2+} 와 Mn^{2+} 에 의해서 현저한 활성화 효과를 보였다. 또한 본 효소는 sucrose와 raffinose에 대해서도 높은 활성을 나타내므로 β -D-fructofuranosidase(EC 3.2.1.26)로 분류되는 exo-inulinase인 것으로 확인되었다. 한편 효소활성에 필수적인 아미노산 잔기는 tryptophan과 histidine인 것으로 분석되었으며 inulin과 sucrose에 대한 K_m 값은 각각 $2.0 \times 10^{-3} M$, $1.0 \times 10^{-2} M$ 로 산출되었다.

참고문헌

1. Lee, T.K., Y.J. Choi and H.C. Yang: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **16**, 259 (1988).
2. Lee, T.K., H.C. Shin, Y.J. Choi and H.C. Yang: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **16**, 484 (1988).
3. Lee, T.K., H.J. Sung, Y.J. Choi and H.C. Yang: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **15**, 176 (1987).
4. Park, S.J., K.N. Kim and Y.J. Choi: *Res. Rpt. Col. of Arg. & Forest. Korea Univ.* **28**, 201 (1988).
5. Miller, G.L.: *Anal. Chem.* **31**, 426 (1959).
6. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall.: *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).

7. Andrew, P.: *Biochim. J.* **96**, 595 (1965).
8. Edelman, J. and A.G. Dickerson: *Biochem. J.* **98**, 787 (1966).
9. Wise, C.S., R.J. Dimler, H.A. Davis and C.E. Rist: *Anal. Chem.* **27**, 33 (1955).
10. Lundblad, R.L. and C.M. Noyes: Chemical modification of tryptophan in chemical reagents for protein modification, Vol. II, p. 47, CRC Press, Florida.
11. Habeeb, A.F.S.A.: *Method in Enzymology*. Academic Press, New York, Vol. 25, p. 457 (19).
12. Cleland, W.W.: *Biochemistry.* **3**, 480 (1964).
13. Schnackerz, K.O. and E.A. Noltman.: *Biochemistry.* **10**, 4837 (1971).
14. Pathy, L. and E.L. Smith: *J. Biol. Chem.* **250**, 557 (1975).
15. Berrocol, F. and J. Carreras.: *Comp. Biochem. Physiol.* **76B**, 9 (1983).
16. Uchiyamaa, T., S. Niwa and K. Tanaka: *Biochem. Biophys. Acta.* **315**, 412 (1973).
17. Chung, K.Y., K.H. Park and K.H. Lee: *Kor. J. Food Sci. Technol.* **sd13**, 67 (1981).
18. Nakamura, T., T. Kurokawa, S. Nakatsu and S. Ueda: *J. Agri. Chem. Soc. Jpn.* **52**, 159 (1978).
19. Nakamura, T., S. Hoashi and S. Nakatsu: *J. Agri. Chem. Soc. Jpn.* **52**, 581 (1978).
20. Byun, S.M. and N.H. Nahn: *Kor. Biochem. J.* **10**, 95 (1977).

(Received August 7, 1990)