

Aspergillus ficuum 조효소액으로부터 Endoinulinase의 정제 및 특성

한상배¹ · 유항숙² · 노민환³ · 이태규³ · 손희숙⁴ · 우순자⁴ · 엄태봉^{1*}

¹전북대학교 식품공학과, ²가정교육과,

³전주우석대학교 식품공학과, ⁴고려대학교 식품공학과

Purification and Properties of *Aspergillus ficuum* Endoinulinase

Han, Sang-Bae¹, Hyang-Suk Ryu², Min-Whan Rho³, Tae-Kyoo Lee³
Hee-Suk Sohn⁴, Soon-Ja Woo⁴ and Tai-Boong Uhm^{1*}

¹Department of Food Science and Technology, and

²Department of Home Economics, Chonbuk National University, Chonju 560-756, Korea

³Department of Food Science and Technology, Chonju Woosuk University, Samrye-Eub 565-800, Korea

⁴Department of Food Technology, Korea University, Seoul 136-701, Korea

Abstract — Endoinulinase was purified from a commercial inulin preparation produced by *Aspergillus ficuum* using ion exchange chromatography on CM-Sephadex C-50 and DEAE-Sephadex 6B, HPLC gel filtration on a Protein Pak 125 Column and HPLC ion exchange chromatography on a TSK DEAE-5pw Column. The endoinulinase had a molecular weight of $72,000 \pm 1,000$ and was glycoprotein with 23 to 25% w/w sugar content. The enzyme was much more active on inulin with random cleavage mode than on sucrose and on palatinose: The ratio of activity on inulin and sucrose (I/S ratio) was 10~14.

이눌린은 설탕의 fructosyl 위치에 과당이 10~30개 정도 β -2,1-결합을 통해 연결되어 있는 탄수화물의 일종이다.

돼지감자나 다알리아, 치커리에 주된 저장당으로 들어있는 이 탄수화물은 과당시럽이나 올리고프락토당 생산의 잠재적인 주요 원료로서 고려되어 왔다(1-3).

이눌린의 분해산물인 과당을 얻기 위하여 산가수 분해법과 효소분해법이 있으나, 품질이나 수율에서 효소분해법이 훨씬 뛰어나기 때문에(4) 많은 연구자들은 이눌린을 분해할 수 있는 미생물들을 검색하였고, 그 결과 지금까지 가장 상업적인 가능성이 높은 미생물 균주로서 *Aspergillus* 균속이 선택되었다(5) *Aspergillus*의 inulinase는 높은 효소 역가를 가지고 있을 뿐 아니라 상업적 생산공정에서 가장 중요한 요소인 높은 열안정성을(5) 가지고 있고, 또한 endo-

inulinase와 exoinulinase를 함께 가짐으로서 inulin 분해율을 거의 10배까지 증가시키는 것으로 알려져 있다(6).

이에 우리는 *Aspergillus ficuum*이 생산하는 endoinulinase를 순수하게 분리하여 이 endoinulinase의 분자 구조적 특성 및 그 작용 기작을 규명하였다.

재료 및 방법

재료

*Aspergillus ficuum*이 생산한 조효소액은 덴마크 Novo A/S의 Dr. S. Perderson으로부터 얻었는데, 이 효소액은 endo 및 exoinulinase, protease, cellulase, fructosyltransferase의 효소 등을 함유하고 있었다.

이 실험에서 사용한 모든 시약은 상업적으로 이용할 수 있는 특급이었다.

Key words: Inulinase, inulin, *Aspergillus ficuum*

*Corresponding author

효소활성의 측정 및 단백질량 분석

효소활성은 50°C에서 5% 이눌린을 5분간 반응시킨 뒤 생성되는 환원당을 Dinitrosalicylic acid 방법(7)을 이용하여 측정하였다. 자세한 활성측정방법은 Uhm 등(8)의 방법에 준하였다. Inulinase에 대한 1 unit는 1분당 위 조건하에서 환원당 1 μmol 을 생성할 수 있는 효소의 양으로서 정하였다. Invertase 활성은 50°C에서 5% sucrose를 30분간 반응시킨 뒤 생성되는 환원당을 측정하였다. Invertase에 대한 1 unit는 1분당 위 조건하에서 sucrose 1 μmol 을 분해할 수 있는 효소의 양으로 정하였다. 단백질은 Bradford method(9)에 준하여 그 양을 결정하였다.

효소정제

*Aspergillus ficuum*의 조효소액은 많은 염을 포함하고 있었기 때문에 1 cc씩 5번 Sephadex G-25(1.5 \times 5 cm) column을 통해 desalting을 하였다. Fraction의 앞부분만을 모은 뒤 미리 0.05 M Na-acetate, pH 4.1로 평형화시킨 CM Sephadex C-50(2.5 \times 12 cm) column에 주입하였다. 이 buffer를 이용하여 분당 2 ml의 유속으로 100 ml를 씻어 준 후에 0.7 M NaCl을 이용 linear gradient를 걸어주었다. Gradient를 걸기 전에 나온 endoinulinase의 활성 peak를 모아 Amicon concentrator에서 ultrafiltration(M.W. cut-off 30,000)을 하면서 완충액 교환 및 농축을 하였다. 그 후 10 mM phosphate buffer, pH 7.0으로 미리 평형화시켜 놓은 DEAE Sepharose 6B column(2.5 \times 12 cm)에 윗 농축액을 주입한 뒤 0.5 M KCl을 이용하여 분당 2 ml의 유속으로 linear gradient를 걸어주었다. 여기서 분리된 한 활성 peak를 모아 다시 완충액 교환과 탈염 농축을 위해 ultrafiltration(M.W. cut-off 30,000)을 하였다. 여기서 얻은 농축액은 Protein Pak 125sw (Waters, 0.8 \times 30 cm) column을 이용 HPLC gel filtration을 하였다. 이 때 elution buffer는 10 mM phosphate buffer, pH 7.0에 0.1 M NaCl이 함유되어 있었으며 유속은 0.5 ml/min이었다. 활성 peak는 Centricon(M.W. cut-off 30,000)에서 농축 및 완충액 교환을 한 뒤 TSK DEAE-5pw column(Toyo Soda, 0.8 \times 10 cm)에서 HPLC ion exchange chromatography를 행하였다. 이 때 elution buffer는 10 mM-phosphate buffer, pH 7.0을 사용하였으며 유속은 0.5 ml/min이었다. 1 M NaCl을 사용한 salt gradient는 linear하게 25분까지 50%까지 올린 뒤 26분부터 30분

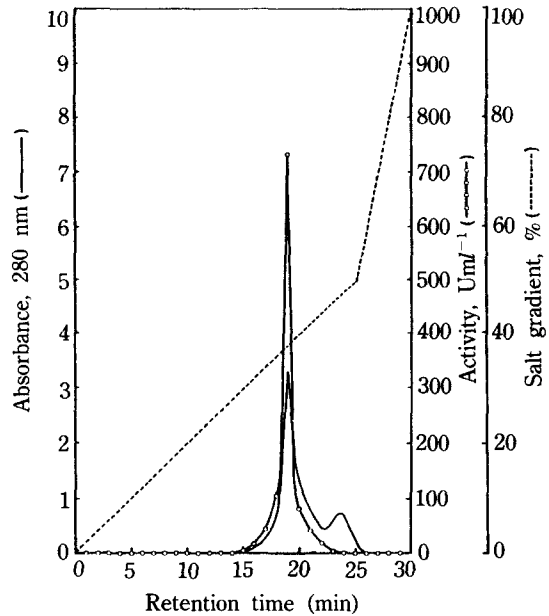


Fig. 1. HPLC DEAE ion-exchange chromatography of *Aspergillus ficuum* endoinulinase.

The partially purified enzyme (860 μg) by HPLC gel filtration was applied to a TSK DEAE 5pw column (0.8 \times 10 cm). The HPLC conditions are described under "Materials and Methods".

까지 100%가 되게 하였다(Fig. 1). 여기서 단지 한 개의 활성 peak가 얻어졌으며 이 활성 peaks는 4°C 냉장고에서 다음 실험을 위해 보관되었다.

전기영동

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)는 Laemmli method(10)에 준하여 행하였다. SDS-PAGE에 의한 endoinulinase의 분자량은 표준 단백질(Bio-Rad)의 그것과 비교함으로써 결정되었다.

Gel filtration에 의한 분자량 결정

Native 상태의 endoinulinase 분자량은 Protein Pak 300sw(Waters, 0.8 \times 30 cm) column을 이용 HPLC gel filtration을 행하였다. 이 때 elution buffer는 0.01 M phosphate buffer, pH 7.0에 0.1 M NaCl이 함유되어 있었으며 유속은 1 ml/min, 표준 단백질로는 ferritin(M.W. 440,000), aldolase(M.W. 158,000), bovine serum albumin(M.W. 67,000) 및 ovalbumin(M.W. 45,000)이 사용되었다.

Endoinulinase의 당 정량

Endoinulinase에 존재하는 당의 정량은 Phenol-sulphuric acid method(11)에 준하여 행하였다.

Endoinulinase로부터 당의 제거

Endoinulinase에 존재하는 당을 분리하기 위하여 protease가 없는 endoglycosidase F/N-glycosidase F (Boehringer Mannheim)가 사용되었다. 즉, 정제된 endoinulinase(150 µg) 1 ml와 0.9 U endoglycosidase 18 µl를 혼합하여 37°C에서 27시간 반응시킨 후 이 반응액을 Protein Pak 125sw column(0.8×30 cm)을 이용, 상기 gel filtration 조건으로 deglycosylation된 endoinulinase만을 분리하였다.

Endoinulinase의 작용 기작

정제된 endoinulinase 20 µg을 1% inulin 450 µl에 넣어 50°C에서 반응시킨 뒤 5, 10, 15분 간격으로 20 µl를 뽑아 Waters Carbohydrate analysis column (0.39×30 cm)에 주입하였다. 이 때 flow rate는 2 ml/min이었으며 elution은 80% acetonitrile과 20% 증류수가 사용되었다. 비교실험으로서, *Aspergillus ficuum*으로부터 정제된 exoinulinase(20 µg)가 위와 동일한 조건하에서 사용되었다. 이 조건하에서 glucose, fructose, sucrose의 retention time은 각각 6.4 ± 0.2, 5.5 ± 0.1, 11.5 ± 0.1분이었다.

결과 및 고찰

효소의 정제

*Aspergillus ficuum*이 생산하는 두 종류의 (endo- 및 exoinulinase) inulinase 중 endoinulinase가 conventional 및 HPLC를 통해 정제되었다(Table 1).

이 효소는 단백질 mg당 약 460 ± 40 U의 specific activity를 보였고 SDS-PAGE상에서 거의 순수하게 단일밴드임을 나타내었다(Fig. 2(b)). 효소의 정제 pattern은 반복된 실험 동안 언제나 거의 비슷함을 보여주었지만, 정제 중 다른 pore size를 가지는 ultrafilter의 사용은 HPLC DEAE에서 활성 pattern의 변화를 야기시켰다. 즉, M.W. cut-off 30,000의 ultrafilter를 사용하여 얻은 농축액을 HPLC DEAE column에 걸으면 한 개의 활성 peak가 나타났지만 M.W. cut-off 5,000인 것을 사용하면(이 때, 농축시간은

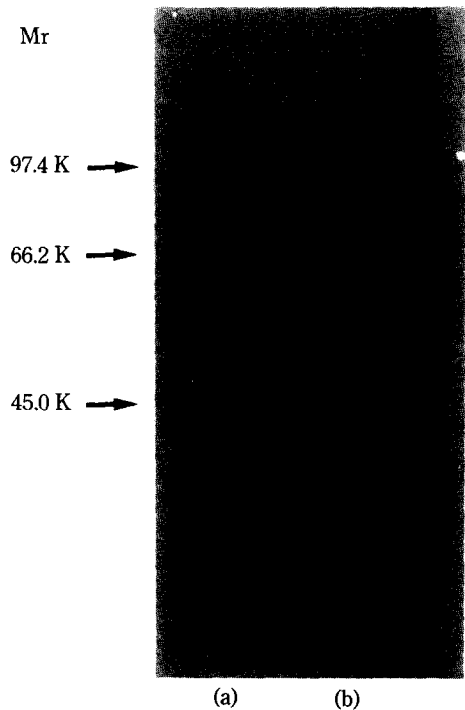


Fig. 2. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the deglycosylated (a) and the native endoinulinase (b) in 12.6% polyacrylamide gel.

Table 1. Summary of a typical purification of endoinulinase from *Aspergillus ficuum*

Step	Volume (ml)	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg proteein)	Yield (%)
Crude extract	10	7,900	35	226	a
CM sephadex	62	1,860	9.3	200	100
DEAE sephadex	31	1,262	3.41	370	68
HPLC Gel column	7.7	1,203	3.0	401	58
HPLC DEAE column	3.8	278	0.55	505	15

a: We did not count the yield of endoinulinase because the extract contained both exo- and endoinulinase.

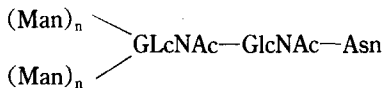
4배 이상 길어졌음) HPLC DEAE column에서는 세 종류의 다른 활성 peaks가 나타났다. 이러한 결과는 조효소 중에 존재할 수 있는 protease나 glycosidase가 농축 동안에 작용하여 세 종류 효소로 나누어 졌을 가능성을 보여준다.

분자량 측정

SDS-PAGE로부터 측정된 subunit의 분자량은 $73,000 \pm 1,000$ 이었으며(Fig. 2(b) 참조) HPLC Protein Pak-300 gel filtration에 의한 native 상태의 효소 분자량은 $72,000 \pm 1,000$ 이었다. 이러한 결과는 이 효소가 단량체로 이루어져 있음을 나타낸다. *Aspergillus niger* ATCC 66295가 생산하는 한 exoinulinase는 native 상태에서 약 320,000의 분자량을 가지며 4개의 subunits를 가지는 것으로 보고되어 있다(8). 같은 *Aspergillus*속이지만 대단히 다른 크기의 inulinase를 가지는 것으로 보아 exoinulinase와 endoinulinase는 다른 유전자로부터 기인된 것으로 추정된다.

효소의 당 잔기의 양 및 구성

효소에 존재하는 당의 함량이 phenol-sulphuric acid method에 의해 조사되었다. 포도당을 표준 물질로 사용했을 때 효소의 단백질 mg당 0.23~0.25 mg의 당이 검출되어 당 단백질임을 확인할 수 있었다. 이것은 endoglycosidase F/N-glycosidase F를 endoinulinase에 처리함으로써 다시 확인되었다. 2개의 N-acetylglucosamine 잔기 사이와, N-acetylglucosamine-Asparagine 잔기 사이를 끊는 이 효소들의 처리에 의해 endoinulinase는 SDS-PAGE상에서 그 분자량이 $68,000 \pm 1,000$ 으로 감소(Fig. 2(a))되었다. 이러한 결과는 endoglycosidase F/N-glycosidase F가 다음과 같이 specific하게 반응할 수 있는 N-glycosidic 결합 및 mannosyl unit를 이 효소가 가지고 있다는 것을 의미한다.



홍미롭게도, SDS-PAGE의 gel을 Schiff-periodic acid method(12)로 처리했을 때도(결과는 보이지 않았음), native 및 deglycosylated 효소 모두 당을 함유하고 있었다. 이것은 endoglycosidase F/N-glycosidase가 작용할 수 없는 O-glycosidic linkage나 이

들이 접근하기 어려운 구조가 이 endoinulinase에 존재한다는 것을 의미한다.

효소의 작용 mode

이 효소의 작용 mode가 반응시간에 따라 그 생성물의 양 및 종류로 추정되었다. 비교실험으로서 *Aspergillus ficuum*으로부터 정제된 exoinulinase가 같은 조건에서 조사되었다. 이 exoinulinase는 fructosyl transferase와 levansucrase, endoinulinase activity를 함유하고 있지 않았다. 1.8 Unit의 inulinase 활성을 가진 exoinulinase와 같은 inulinase 활성을 가진 endoinulinase가 동일한 실험조건하에서 1.7% inulin을 가수분해하는데 사용되었다. Kinetic study에서 exoinulinase는 시간에 따라 fructose의 양이 직선적으로 증가하는 반면 endoinulinase는 반응 초기에는 fructose 생산이 거의 없다가 시간이 증가함에 따라 완만한 curve를 그리며 증가하였다. 즉, inulin의 분해

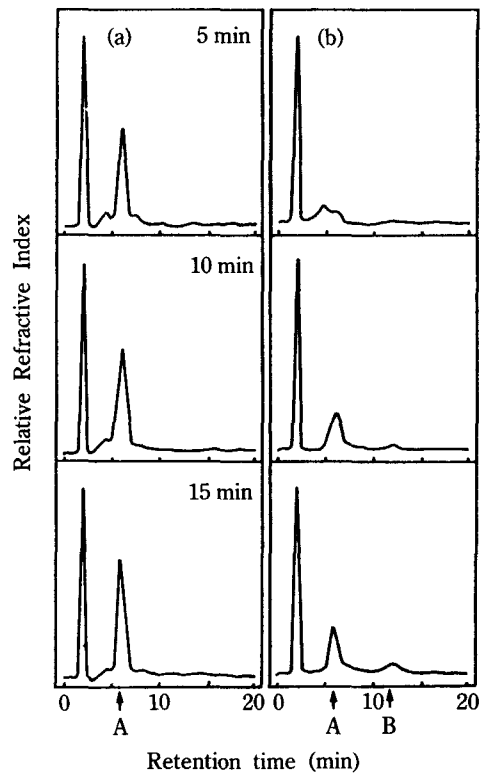


Fig. 3. Liberation of hydrolysates from inulin by *Aspergillus* exoinulinase (a) and endoinulinase (b). Detailed procedures are described in the text. (A) Fructose (5.5 ± 0.1 min), (B) Sucrose (11.5 ± 0.1 min).

산물인 fructose의 증가율은 같은 inulinase의 활성을 가지는 두 inulinase에 있어서 시간에 따라 현격한 차이가 있음을 보여주었다(Fig. 3). 또한, 이러한 결과는 endoinulinase가 미약하나마 invertase activity를 가지고 있는 것을 나타내준다(Fig. 3 참조). 실제로 endoinulinase의 I/S ratio 결과는 10~14의 값을 나타내었다. 이것은 endoinulinase의 결합부위는 β -2,1-fructosyl unit에 높은 친화력을 나타내지만 β -2,1-glucosyl unit에서도 약한 친화력(약 1/10)을 가진다고 추정할 수 있다.

효소의 기질특이성

Endoinulinase(EC 3.2.1.7)는 inulin을 random하게 자를 뿐 아니라 sucrose, palatinose, stachyose에도 그 분해능력을 나타내었다(Table 2). 특히 6-O- α -D-D-glucopyrosyl-D-fructofuranose의 구조를 가진 palatinose가 1-O- α -D-glucopyranosyl-D-fructofuranose 구조의 sucrose와 비슷하게 분해되는 것으로 보아 이 효소의 결합부위는 fructosyl group을 그 입체적 배향과는 관계없이 인식할 수 있음을 보여주고 있다. 보통 inulinase(EC 3.2.1.7)는 이눌린에 특이적으로 작용하는 것으로 알려져 있지만 절대적인 이눌린 분해특성을 보이지 않는다. 즉, 여기서 정제된 *Aspergillus*의 endoinulinase는 inulinase 활성 뿐 아니라 invertase 활성도 함께 가지는 비특이적 β -fructofuranosidase(EC 3.2.1.80)의 특징을 보여주는 것 같다. *As-*

Table 2. Substrate specificity of *Aspergillus ficuum* endoinulinase

Substrate (50 mM)	Linkage	Specific activity (U/mg)
Sucrose	β -2,1	23.3
Raffinose	β -2,1	0
Stachyose	β -2,1	5.8
Palatinose	α -6,1	28.3
Turanose	α -3,1	0
Lactulose	β -4,1	0
Melezitose	a	0
Inulin (1.7%)	β -2,1	360
Levan (1%)	b	0

a; (O- α -D-glucopyranosyl-[1-3]-O- β -D-fructofuranosyl [2-1]- α -D-glucopyranoside

b; Main chain: β -2,6-fructosidic linkage, Side chain: β -2,1-fructosidic linkage

*pergillus ficuum*의 endoinulinase가 이눌린 뿐 아니라 그와 비슷한 구조를 가지는 당을 분해할 수 있다는 것은 진화적인 관점에서 이 미생물의 생존에 중요한 잇점을 제공해 주었으리라 생각된다.

요 약

*Aspergillus ficuum*이 생산하는 endoglycosidase가 conventional CM, DEAE 및 HPLC DEAE, gel chromatography에 의해 단백질 mg당 460 \pm 40 U의 specific activity로 정제되었다. 이 효소는 약 72,000분자량을 가지는 단량체로 이루어져 있었으며 당을 함유하고 있었다. 분해산물의 조사에 의한 작용기작은 전형적 endo cleavage mode를 보여주었으며 특이하게도 sucrose와 palatinose를 분해할 수 있었다.

감사의 말

이 연구는 미원 부설 한국음식문화연구원원의 지원에 의해 이루어졌습니다.

References

- Edelman, J. and T.G. Jefford: *Biochem. J.*, **93**, 148 (1964)
- Flood, A.E., P.P. Rutherford and E.W. Weston: *Nature*, **214**, 1049 (1967)
- Rutherford, P.P. and A.C. Deacon: *Biochem. J.*, **126**, 569 (1972)
- Fleming, S.E. and J.W.D. GrootWassink: *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **12**, 1 (1979)
- Uhm, T.B., S.M. Byun, Y.J. Kwon, S.B. Han and K.S. Ryu: *Biotechnol. Lett.*, **9**, 287 (1987)
- Ettalibi, M. and J. Baratti: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **26**, 13 (1987)
- Miller, G.L.: *Anal. Chem.*, **31**, 426 (1959)
- Uhm, T.B., D.Y. Jeon, S.M. Byun, J.S. Hong and J.W.D Grootwassink: *Biochim. Biophys. Acta.*, **926**, 119 (1987)
- Bradford, M.: *Anal. Biochem.*, **72**, 248 (1976)
- Laemmli UK: *Nature*, **227**, 680 (1970)
- Dubios, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers and F. Smith: *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1956)
- Mathieu, J.M. and R.H. Quarles: *Anal. Biochem.*, **55**, 313 (1973)

(Received March 13, 1991)