

## *Streptomyces* sp. S34의 exoinulase 생산 및 성질

하영주 · 김수일

서울대학교 농업생명과학대학 농화학과, 농업생물신소재연구센터

**초록:** *Streptomyces* sp. S34가 분비하는 exoinulase의 생산조건을 검토하고 정제하였으며 이 효소의 성질을 조사하여 *Streptomyces* sp. S56이 생산하는 endoinulase와 비교하였다. 이 효소는 같은 속에서 분비되는 endoinulase와는 달리 탄소원으로 inulin이외에 glucose 및 soluble starch를 사용할 때도 효소가 생산되어 구성효소로 생각되었으며 유기질소원으로 대두박을 사용할 때 최대의 효소생산을 보였다. DEAE-cellulose에 이어 Sephadex G-200 chromatography로 정제한 효소의 최적 pH는 5.5~6.0이었고 최적온도 50 °C에서의 열안정성은 1시간 처리로 45%의 잔류활성이 있었다. 효소활성은  $Mn^{+2}$  이온에 의하여 증가되나  $Ag^+$ ,  $Hg^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$  이온들에 의하여는 80% 이상 감소되었으며 특히 EDTA, 8-hydroxyquinoline에 의해 저해되어 metalloenzyme으로 생각되었다. 본 효소는 inulase 활성 대 invertase 활성비가 0.52로 전형적인 exoinulase로서 inulin 및 sucrose에 대한 친화도는 거의 같으나 최대속도는 inulin이 기질일 경우 sucrose보다 약 10배 빨랐다. 같은 *Streptomyces* 속에서 분비되는 endoinulase와 비교하면 작용 pH 범위가 5~7로 더 좁고 열안정성도 낮으며 저해 금속이온도 상이하나 두 효소 모두 metalloenzyme으로 추정되었다(1992년 8월 19일 접수, 1992년 9월 14일 수리).

Inulin은 sucrose의 fructose말단에 fructose가  $\beta$ -2,1 결합으로 20~35개가 중합되어 있는 것으로 이 다당류의 분해효소로는 일반적으로 inulase가 거론되고 있다. Inulase는 처음 돼지감자 괴경<sup>1)</sup>에서 발견된 이래 주로 미생물에서 많이 생산되었고<sup>2)</sup> 키코리와 다알리아 뿌리 등의 고등식물체에서도 inulase의 존재가 발견되었으며<sup>3,4)</sup> 최근에 fungi일종인 *Basidiomycetes*에서도 mushroom inulase가 존재함이 보고되었다.<sup>5)</sup> Inulase는 중합도가 다른 기질에 대한 효소 활성의 차이나 효소작용의 차이에 따라 inulin말단으로부터  $\beta$ -2,1 결합을 fructose단위로 가수분해하는 exo형 inulase<sup>6-10)</sup>와 inulin내부의  $\beta$ -2,1 결합을 불규칙적으로 가수분해하는 endo형 inulase<sup>11-15)</sup>로 나뉘며 효모에서는 대부분 exoinulase를, 곰팡이에서는 exoinulase와 endoinulase를 한 균주가 동시에 분비하고 세균의 경우에는 exoinulase 생산균주와 endoinulase 생산균주가 다르게 보고되고 있다. Exoinulase와 endoinulase의 큰 차이점은 sucrose를 분해하는 invertase 활성의 보유여부와 inulase 활성에 대한 비로써 전자는 강한 invertase를 보유하고 있는 반면 후자는 invertase활성이 거의 없거나 inulase 활성의 20~50%만을 보유하는 것으로 나눌 수 있다. 본 연구실에서는 토양으로부터 분

리한 방선균들 중에서 inulin을 가수분해하여 fructose만을 생산하는 exoinulase 생산균주들과 fructose oligomer를 생산하는 균주들을 선발하였으며 이중 fructose oligomer를 생산하는 *Streptomyces* 균주(S-56)가 invertase 활성이 없는 endoinulase를 분비하는 것을 발견하였고 이 효소의 생산조건 및 효소적 특성을 규명한 바 있다.<sup>16,17)</sup> 본 보고에서는 exoinulase를 생산하는 34번 균주의 동정, 효소생산조건 검토, 정제 및 효소특성 등에 대하여 기술하였다.

### 재료 및 방법

#### 균주분리 및 동정

전보<sup>16)</sup>와 같은 방법으로 방선균을 토양으로부터 분리하고 inulase 생산 기본배지에서 5일간 진탕배양한 배양상징액과 2% inulin용액을 반응시킨 후 분해산물을 TLC로 검정, fructose가 나타나는 균주중 배양액의 inulin소모도가 가장 높은 34번 균주를 exoinulase 생산균주로 선발하였으며 이 균주의 동정은 주사현미경(Hitachi S-570) 관찰 및 세포벽성분의 분석법<sup>18)</sup>으로 하 등<sup>16)</sup>의 방법을 따랐다.

효소생산조건 검토 및 효소의 생산

Inulase 생산기본배지중 탄소원 및 유기질소원을 다 음과 같이 변경한 배지에 34번 균주를 접종, 30℃에서 진탕배양 후 각 배양 상정액의 효소활성을 측정하였다. 즉, 탄소원은 inulin대신 glucose, sucrose 및 soluble starch를 각각 1%씩 첨가하였으며 유기질소원은 yeast extract대신 peptone, 대두박, beef extract 및 corn steep liquor를 조단백질양으로 yeast extract와 동등수준이 되게 첨가하였다.

효소는 inulase생산 최적배지에서 2일간 진탕 배양한 것 20ml를 2l의 최적배지를 함유한 4l 발효조에 접종한 후 30℃에서 300 rpm으로 96시간 배양하여 생산하였으며 이때 동기조건은 1.5 vvm, antifoam agent로는 0.01% AZ 20R 용액을 사용하였다.<sup>16)</sup>

효소의 정제

원심분리하여 균체를 제거한 배양상정액에 ethanol을 첨가하여 40~80%(v/v)의 농도에서 생성되는 침전물을 0.01 M sodium phosphate(pH 6.0) buffer에 녹인 것을 조효소액으로 하였으며 이를 DEAE-cellulose 및 Sephadex G-200을 사용하여 다음과 같이 정제하였다. 1차 정제는 상기 sodium phosphate buffer에 평형시킨 DEAE-cellulose column(2×20 cm)에 15 ml(효소 130 U)의 조효소액을 주입하고 동일 buffer 300 ml로 용출한 후 NaCl을 사용, 0~0.5 M이 되도록 linear salt gradient로 용출하였다. 용출속도는 30 ml/hr, 5 ml/tube로 분획하였다. 효소활성 분획을 모아 ultrafiltration으로 농축후 이 효소액을 2차 정제에 사용하였다. 동일 buffer에 Sephadex G-200을 평형시킨 column(×100 cm)에 1차 정제한 상기 효소용액 15 ml(120 U)를 주입하고 같은 buffer로 15 ml/hr의 속도로 용출하고 5 ml/tube로 분획하였다.<sup>17)</sup> 각 분획의 단백질양은 280 nm에서의 흡광도로, 효소활성은 상기 DNS방법으로 측정하였다.

효소의 일반적 성질

Gel filtration에 의해 정제된 효소의 최적 pH는 3.0~7.5 범위의 0.1 M citric acid-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(Mc Ilvaine) buffer를 사용하여 40℃에서 15분간 반응 후 효소활성을 측정하고 최적온도는 pH 5.0에서 반응온도를 30℃~70℃로 달리하여 상기조건에서 반응, 효소활성을 측정하여 정하였다. 효소의 열안정성은 45℃~55℃ 사이에서 5~60분간 열처리하고 남아있는 효소활성을 최적 pH의 실험방법과 같이 측정하여 조사하였다. Km, Vmax는 inulin은 1~10%, sucrose는 2~100 mM인 농도에서 각 기질농도별로 60분까지 반응시키면서 시간별로 효소활

성을 측정하여 초기속도를 구하고 이로부터 Lineweaver-Burk plot를 작도, 두 값을 구하였다.

금속이온 및 chelating agent 영향실험은 CaCl<sub>2</sub>, NaCl, MgCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, KCl, BaCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub>, AgNO<sub>3</sub>, MnCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>3</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, LiCl, MoO<sub>3</sub> 및 EDTA-2Na와 8-hydroxyquinoline의 1 mM 용액에 효소를 30℃에서 30분간 방치 후 각각의 활성을 측정하여 정하였다. 기질특이성은 inulin, sucrose, raffinose, melezitose의 2~4% 용액을 기질로 사용하여 효소활성을 조사하였으며 반응특이성은 2% inulin 1 ml에 효소액 0.5 ml(0.5 U/ml)를 첨가하고 40℃에서 15분~72시간까지 반응시키면서 일정시간별로 1 μl의 반응용액을 채취, TLC로 분해산물을 검정하여 조사하였다.

분석방법

효소활성은 김과 문<sup>7)</sup>의 방법에 따라 효소에 의해 inulin이 분해되어 생성되는 환원당량을 DNS방법으로 측정하였으며 효소활성단위 1 U는 1분간에 1 μ mole의 환원당이 생성되는 것으로 정하였다. 총당은 phenol-sulfuric acid법<sup>19)</sup>으로 fructose를 표준으로 하여 정량하였고 균체양은 건조질량법으로 측정하였으며<sup>20)</sup> 그의 inulin의 효소분해산물 및 균사의 세포벽 성분중 diaminopimelic acid의 분석은 전보의 TLC방법 등<sup>16)</sup>에 따랐다. 단백질 정량은 bovine serum albumin을 표준으로 하여 Lowry 등<sup>21)</sup>의 방법을 일부수정하여 사용하였고<sup>7)</sup> 전기영동은 7.5% polyacrylamide gel을 사용, Weber와 Osborn<sup>22)</sup>의 방법을 일부 수정한 방법<sup>16)</sup>을 이용하였다.

결과 및 고찰

균주의 동정

34번 균주의 포자와 균사를 주사현미경으로 관찰한 결과 10개 정도의 포자가 simple형의 rectiflexible(RF) 형태로 spore chain을 형성하는 smooth형의 포자를 가지고 있고 기균사는 잘 관찰되지 않았다. 또한 이 균주의 영양균사는 액체배양시 광학현미경으로 본 결과 분절화 되지 않는 것으로 나타났다(Fig. 1). 또한 배양균사체를 가수분해하여 그 세포벽성분을 TLC로 검정해 본 결과 diaminopimelic acid는 LL형으로 나타났다. 따라서 이 균주는 *Streptomyces* 속으로 분류하였으며 *Streptomyces* sp. S34로 명명하였다. 이 균주는 endoinulsase를 생산하는 전보<sup>16)</sup>의 S56 균주와는 같은 속에 속하나 포자의 형태가 다르며(S56는 spiral형) 기균사가 적은 것이 상 이하다.

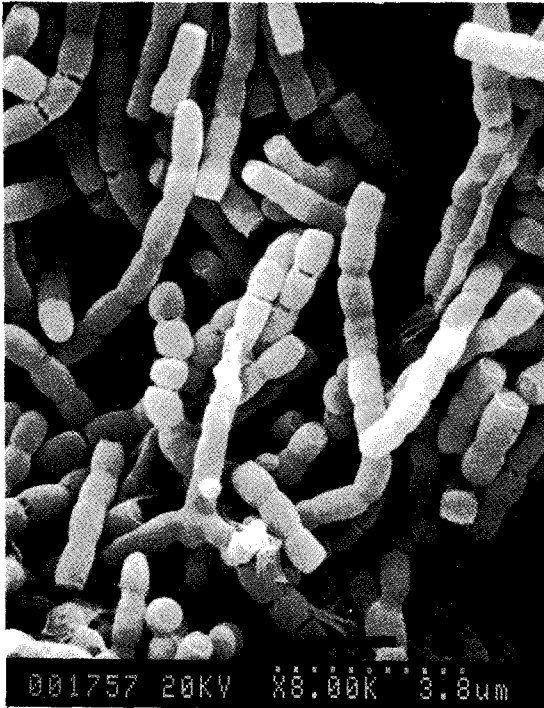


Fig. 1. Scanning electron microscope of strain S34. The bar denotes 2 μm.

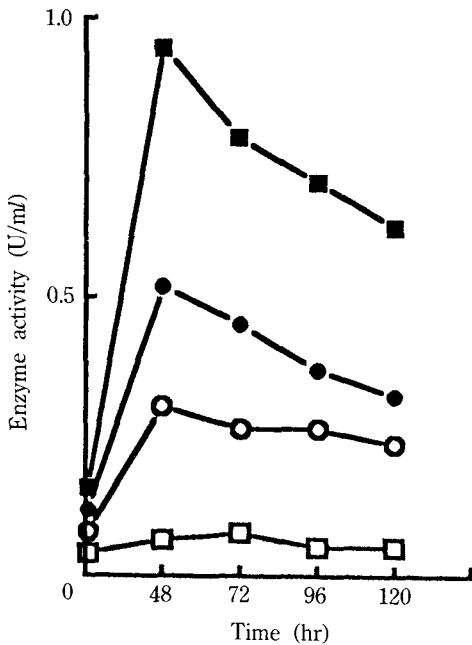


Fig. 2. Effect of carbon sources on exoinulase production from *Streptomyces* sp. S34. ■—■: Inulin, □—□: Sucrose, ●—●: Soluble starch, ○—○: Glucose

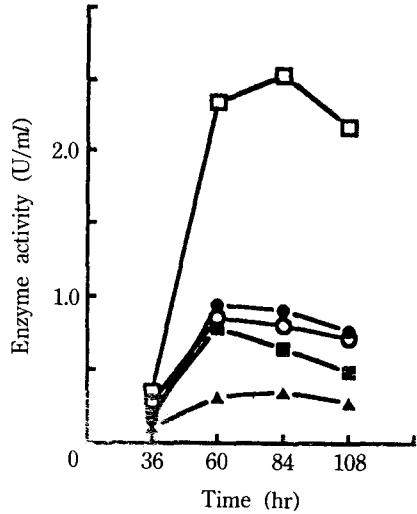


Fig. 3. Effect of organic nitrogen sources on exoinulase production from *Streptomyces* sp. S34. ■—■: Yeast extract, □—□: Soybean meal, ●—●: Corn steep liquor, ○—○: Beef extract, ▲—▲: Peptone

효소생산조건의 검토

Inulin, glucose, soluble starch, sucrose를 탄소원으로 사용하여 균주를 진탕배양하고 48시간후에 효소활성을 측정한 결과 inulase 생산은 inulin을 탄소원으로 사용하였을 때 0.9 U/ml로 가장 높았으며 glucose 및 soluble starch를 사용한 배지에서도 효소활성이 각각 0.3 U/ml, 0.5 U/ml로 inulin에 비해 약 30%, 50%에 해당하는 효소생산이 관찰되었다(Fig. 2). 그러나 sucrose 배지에서는 효소활성이 거의 없었다. 이러한 결과로 보아 이 균주가 분비하는 inulase는 inulin에 의하여만 유도생산되는 *Streptomyces* sp. S56 균주의 endoinulase<sup>16)</sup>와는 다른 구성효소로 생각된다. 대부분의 미생물생산 exoinulase는 본 균주와는 다르게 유도효소로 발표되고 있으며<sup>23-25)</sup> 구성효소로는 *Bacillus*<sup>10)</sup> 및 *Kluyveromyces* 돌연변이주<sup>26)</sup>에서만 보고되고 있다.

유기질소원을 변경하여 실험한 결과 S56 균주와는 상이하게 대두박을 사용하였을 때 배양 48시간 만에 효소활성이 2.56 U/ml로 가장 높았으며 yeast extract, beef extract, corn steep liquor 사용보다 약 3배의 효소 생산을 보여주었다(Fig. 3). 이상의 결과로 본 균주의 inulase 생산은 inulin 기본배지에 유기질소원으로 대두박을 첨가한 경우 최고에 달하였고 이의 배지조성은 inulin 1.0%, 대두박 0.5%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.4%, NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.8%, KCl 0.05%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05%, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.001%, pH 6.0이었다.

**배양시간에 따른 효소생산**

최적배지를 사용하여 발효조에서 배양하면서 시간에 따른 균체량, 총당, 환원당 및 inulase 생산량을 측정 한 결과는 Fig. 4에 나타내었다. 효소생산은 배양 12시간부터 급격히 증가하여 36시간에 1.72 U/ml로 최고에 달하였고 균체량의 증가도 거의 같은 양상을 보여주어 44시간에는 8.51 g/l로 최고에 달하였다. 총당량은 배양 22시간에서 부터 급격히 감소한 반면 환원당량은 같은 배양시간에서 5.55 mg/ml로 최고값을 보였으며 이후 점차 감소하여 발효말기에는 총잔당이 1.8 mg/ml이었다. S56균주<sup>16)</sup>의 endoinulase 생산양상과 비교하며 보면 균체량증가와 효소생산증가가 동일양상을 보이고 있으며 다만 최고 효소생산 배양시간이 S56의 경우 96시간으로 본 균주 S34보다 장시간 배양이 필요하였다.

**효소의 정제**

발효조 배양액에서 균체를 제거한 상정액으로 부터

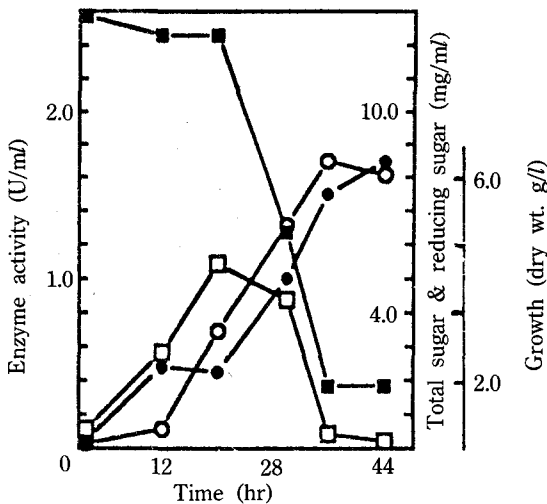


Fig. 4. Growth and exoinulase production from *Streptomyces* sp. S34 during fermentor culture.  
 ●—●: Growth (dry wt., g/l), ■—■: Total sugar (mg/ml), □—□: Reducing sugar (mg/ml), ○—○: Inulase activity (U/ml)

얻은 40%~80% ethanol 침전물을 조효소로 하였으며 이때 효소회수율은 49.3%이었다(Table 1). S56으로 부터의 endoinulase 조효소 제조와는 달리 S34 inulase는 ammonium sulfate에 의하여 침전되지 않았다. 조효소의 sodium phosphate buffer 용액을 먼저 DEAE-cellulose column을 통과시킨 결과 4개의 단백질 peak가 나타났으며 이중 0.2 M 농도에서 용출되는 마즈막 peak에서 효소활성이 검출되었다(Fig. 5). 이 분획을 수집, 농축하여 Sephadex G-200으로 재 정제한 결과 2개의 단백질 peak중 첫번째에서 효소활성이 발견되었다(Fig. 6). 각 chromatography에서 얻은 효소의 specific activity는 32.38 U/mg protein, 40.22 U/mg protein으로 최종적으로 볼 때 약 68배가 정제되었고 수율은 23.7%이었다(Table 1). 2차 정제한 효소를 polyacrylamide gel 전기영동으로 분석해 본 결과 약 4개의 band를 나타냈으며 각 band를 잘라내어 효소활성을 검정한 결과 이동도가 제일 낮은 것에서 활성이 검출되었다(Fig. 7).

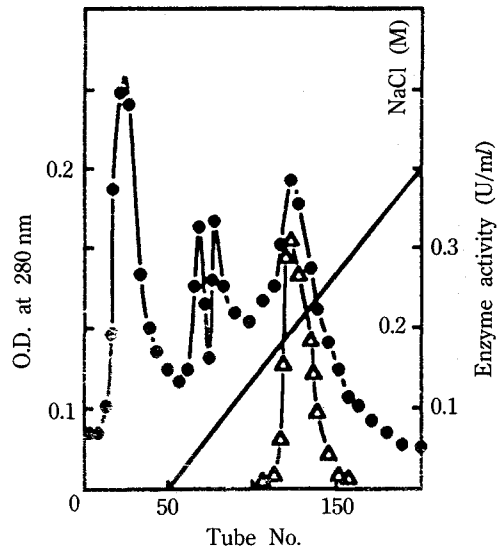


Fig. 5. Sephadex G-200 gel filtration of exoinulase purified on DEAE-cellulose.  
 ●—●: O.D. at 280 nm, △—△: Inulase activity (U/ml)

Table 1. Steps in exoinulase purification from *Streptomyces* sp. S34

Steps	Volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (units/mg protein)	Yield (%)	Purification fold
Culture broth	1630	7469.	4401	0.59	100	1
Ethanol Precipitation (40~80% v/v)	250	301.5	2167.5	7.19	49.3	12.19
DEAE-cellulose	171	45.8	1483.1	32.38	33.7	54.92
Sephadex G-200	100	25.95	1044	40.22	23.7	68.17

**효소의 일반적 성질**

pH 3.0~7.5의 범위에서 inulase 활성을 측정된 결과 최적 pH는 5.5~6.0으로 나타났으며 활성의 pH에 따른 변화를 살펴보면 산성 pH(3.0~4.5)에서는 활성이 거의 없고 pH 6 이상 7에서 75~58%의 활성을 나타내고 있다 (Fig. 8). pH에 따른 이러한 활성의 변화는 S56 endoinulase<sup>17)</sup>와 비교할 때 훨씬 커서 보다 좁은 범위의 활성 pH를 가지고 있었다.

최적온도는 50 °C로 나타났으며 이 온도이하인 30~45 °C에서는 50% 이상의 활성을 보이고 있으나 보다 높은 온도에서는 활성이 급격히 감소하는 경향을 보여 60 °C에서는 50%, 65 °C에서는 24%만의 활성이 남아 있었다 (Fig. 8). 이러한 효소활성과 온도와의 관계는 최적 온도보다 높은 온도에서 낮은 온도보다 활성이 더 높은 경향을 보이는 S56의 endoinulase와는 반대되는 결과이다.

45 °C ~ 55 °C에서 60분 동안 처리하고 시간별로 잔류 효소활성을 측정하여 inulase의 열안정성을 검토하여 본 결과 45 °C 및 50 °C에서는 1시간 처리로도 57%, 45%의

활성을 보유하고 있으나 55 °C에서는 5분만에 거의 활성을 상실하였다(Fig. 9). 이러한 열안정성은 S56 endoinulase<sup>17)</sup>보다 낮은 것이며 또한 *Aspergillus*,<sup>10)</sup> *Kluyveromyces* 등<sup>7)</sup>이 분비하는 exoinulase보다도 낮은 결과이다.

금속이온 및 chelating agent의 활성에 미치는 영향은 Table 2에 나타내었다. 본 효소는  $Mn^{+2}$  이온에 의해 활성화되며  $Ag^+$ ,  $Hg^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$  이온에 의하여 80% 이상

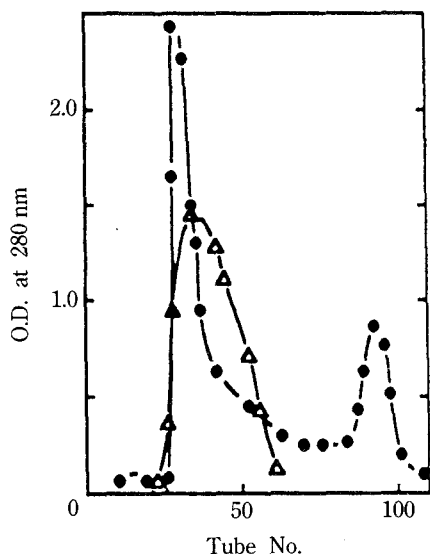


Fig. 6. Sephadex G-200 gel filtration of exoinulase purified on DEAE-cellulose.

●-●: O.D. at 280 nm, △-△: Inulase activity (U/ml)



↑ Activity

Fig. 7. 7.5% polyacrylamide gel electropherogram of exoinulase purified on Sephadex G-200.

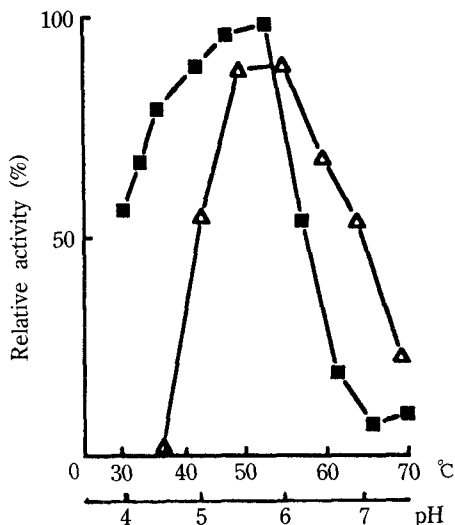


Fig. 8. Effect of pH and temperature on exoinulase activity.

△-△: pH, ■-■: Temperature (°C)

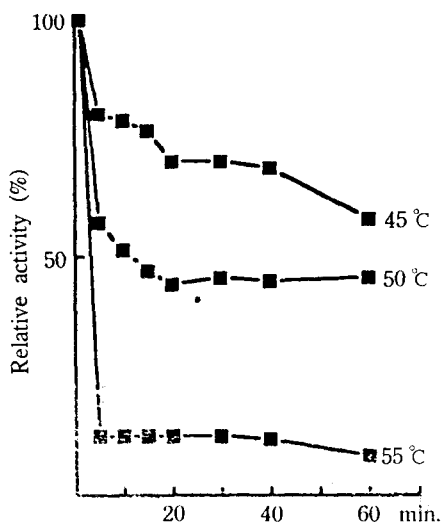


Fig. 9. Heat stability of exoinulase.

Enzyme solution was preincubated at 45, 50 and 55 °C for 10, 30 and 60 min respectively. The remaining activity was measured at 30 °C for 15 min.

Table 2. Effect of metal ions on exoinulase activity

Metal ions (added as chloride)	Concentration (mM)	Relative activity (%)
Control	-	100
Na <sup>+</sup>	1	102
K <sup>+</sup>	1	111
Ag <sup>+</sup> (as AgNO <sub>3</sub> )	1	25
Hg <sup>+2</sup>	1	4
Ca <sup>+2</sup>	1	95
Mg <sup>+2</sup>	1	109
Cu <sup>+2</sup>	1	83
Ba <sup>+2</sup>	1	100
Co <sup>+2</sup>	1	117
Mn <sup>+2</sup>	1	126
Zn <sup>+2</sup>	1	102
Li <sup>+2</sup>	1	102
Fe <sup>+3</sup>	1	19
Mo <sup>+6</sup> (as MoO <sub>3</sub> )	1	70
EDTA(disodium salt)	1	30
8-hydroxyquinoline	1	49

활성이 감소되었다. S56 endoinulase는 Mo<sup>+6</sup> 및 Cu<sup>+2</sup> 이온에 의하여 활성이 완전 상실되거나 36%의 활성감소가 일어났으나<sup>17)</sup> 본 효소에는 거의 영향이 없었다. EDTA 및 8-hydroxyquinoline에 의하여 50% 이상의 활성저해가 되는 것으로 보아 본 효소도 전자의 endoinulase<sup>17)</sup>와 같이 metalloenzyme으로 생각되었다.

Inulin에 대한 효소활성을 100으로 할 때 sucrose, raffinose 및 melezitose에 대한 활성은 각각 52%, 48.9% 및 0.0으로써 melizitose에 대한 활성은 전혀 없어 α-glucosidase 활성은 존재하지 않는 것으로 나타났으나 본 효소는 invertase 활성을 보유하고 있어 gel filtration으로 정제된 효소의 sucrose에 대한 specific activity가 20.91 mg protein으로 invertase의 inulase 활성에 대한 비(S/I)는 0.52로 나타났다.

본 균주가 분비하는 inulase로 inulin을 가수분해하고 반응시간별로 분해산물을 TLC로 분석해 본 결과 반응 시간에 따라 inulin은 감소하고 fructose는 증가하며 반응 24시간부터 나타나는 fructose dimer인 F<sub>2</sub> 이외에는 다른 분해산물이 검출되지 않았다(Fig. 10). 따라서 이 효소는 inulin의 β-2,1 결합을 말단에서 부터 fructose 한개씩 절단하는 전형적인 exoinulase(β-D-fructofuranosidase; EC 3.2.1.26)로 확인되었다. 이 효소의 inulin에 대한 Km 및 Vmax값은 16.51 mM, 1.93 μmole/min로 S56의 endoinulase보다 더 낮았으며 sucrose에 대한 것은 각각 14.62 mM, 0.194 μmole/min로써 기질친화도에 있어서도

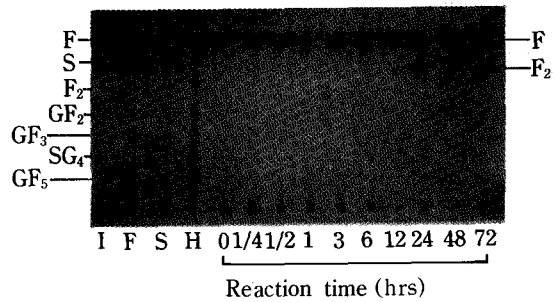


Fig. 10. Thin layer chromatogram of inulin hydrolysates with exoinulase.

I: Inulin, F: Fructose, S: Sucrose, H: Acid hydrolysate of inulin, F<sub>2</sub>: Inulobiose, GF<sub>2</sub>: 1-kestose

inulin과 sucrose가 거의 동등하였으나 최대속도는 inulin의 경우가 약 10배 빠른 것으로 나타났다.

### 감사의 글

본 연구는 동력자원부 에너지관리공단의 대체에너지 기술 개발사업비 및 한국과학재단 지정 농업생물신소재 연구센터의 부분 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

### 참 고 문 헌

- Green, J. R.: Ann. Bot., 1: 223(1987)
- Vandamme, E. J. and Derycke, D. G.: Advan. Appl. Microbiol., 29: 139(1983)
- Rutherford, P. P. and Deacon, A. C.: Biochem. J., 126: 569(1972)
- Flood, A. E., Rutherford, P. P. and Weston, E. W.: Nature, 214: 1049(1967)
- Mukherjee, K. and Sengupta, S.: Can. J. Microbiol., 33: 520(1987)
- Nakamura, T., Hoashi, S. and Nakatsu, S.: 일본농화학회지, 52: 105(1978)
- 김수일, 문향식: 한국농화학회지, 30: 169(1987)
- Guiraund, J. P. and Galzy, P.: Enzyme Microb. Technol., 3: 305(1981)
- Negoro, H. and Kito, E.: J. Ferment. Technol., 51: 103(1973)
- 엄태봉, 홍재식, 손희숙, 박문국, 변시명: 한국농화학회지, 28: 131(1985)
- Nakamura, T., Kurokawa, T., Nakatsu, S. and Ueda, S.: 일본농화학회지, 52: 159(1978)
- 정구영, 박성오, 이계호: 한국농화학회지, 23: 211(1980)

13. 이태경, 최용진, 양한철: 산업미생물학회지, 16 : 259 (1988)
14. Ettalibi, M. and Baratti, J. C.: Appl. Microbiol. Biotechnol., 26 : 13(1987)
15. Onodera, S. and Shiomi, N.: Agric. Biol. Chem., 52 : 2569(1989)
16. 하영주, 최연호, 김수일: 산업미생물학회지, 17 : 593 (1989)
17. 김수일, 하영주: 산업미생물학회지, 50: 551(1992)
18. Lechevalier, M. P. and Lechevalier, H.: Int. J. Syst. Bacteriol., 20 : 435(1970)
19. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F.: Anal. Chem., 28 : 350(1951)
20. Calam, C. T.: Method. Microbiol., 1 : 567(1969)
21. Ldwry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: J. Biol. Chem., 193 : 265(1951)
22. Weber, K. and Osborn, M.: J. Biol. Chem., 244 : 4406(1969)
23. 김기철: 한국농화학회지, 18 : 177(1975)
24. Beluche, I., Guiraud, J. P. and Galzy, P.: Folia Microbiol., 25 : 32(1980)
25. Negoro, H. and Kito, E.: J. Ferment. Technol., 51 : 96(1973)
26. Grootwassink, J. W. D. and Hewitt, G. M.: J. Gen Microbiol., 129 : 31(1983)

### Production and properties of exoinulase from *Streptomyces* sp. S34

Young-Ju Ha and Su-Il Kim (Department of Agricultural Chemistry and Research Center for New Bio-Materials in Agriculture, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea)

**Abstract :** An exoinulase-producing bacterium was isolated from soil, and identified as *Streptomyces* sp. The maximum inulase production was achieved when inulin as carbon source and soybean meal as organic nitrogen source were included in the culture. The exoinulase was considered to be a constitutive enzyme produced not only by inulin but also by soluble starch or glucose. The purified enzyme on DEAE-cellulose and Sephadex G-200 column showed the maximal activity at pH 5.5~6.0 and 50 °C, but lost 65% inulase activity at 50 °C after 1 hour incubation. This exoinulase was activated by Mn<sup>+2</sup>, whereas more than 80% inactivation was observed with Ag<sup>+</sup>, Hg<sup>+2</sup> and Fe<sup>+3</sup>. The enzyme was possibly a metalloenzyme in that EDTA and 8-hydroxyquinoline inhibited the enzyme. Km values for inulin (16.51 mM) and sucrose (14.62 mM) were in very close range suggesting mostly equal affinity toward the substrates. However, the maximum velocity for inulin was 10 times greater than for sucrose.