

Streptomyces sp. S560이 생산하는 Endoinulase의 정제 및 특성

김수일* · 하영주

서울대학교 농업생명과학대학 농화학과 및 농업생물신소재연구센터

Purification and Characterization of Endoinulase from *Streptomyces* sp. S56

Kim, Su-Il* and Young-Ju Ha

Department of Agricultural Chemistry and Research Center for New
Bio-Materials in Agriculture, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

Abstract — The extracellular endoinulase from *Streptomyces* sp. S56 was purified and characterized. The culture broth was fractionated by ammonium sulfate saturation followed by DEAE-cellulose column chromatography and Sephadex G-200 gel filtration. The ultimately purified fraction revealed a single band in 7.5% polyacrylamide gel electropherogram. The purified enzyme showed the maximal activity at pH 5.5~6.0 and 50°C, but lost 93% of inulase activity after 30 min incubation at 55°C. The essential amino acid residue for catalytic activity appeared to be tryptophan. This endoinulase was activated by Mn^{2+} , whereas inactivated by Ag^+ , Hg^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} and Mo^{6+} . EDTA and 8-hydroxyquinoline inhibited the enzyme so that the enzyme was considered to be a metalloenzyme. The K_m value for inulin was 0.287 mM, and no invertase or α -glucosidase activity was found in the enzyme.

Endoinulase(inulinase EC 3.2.1.7)는 inulin 내부의 β -2,1 결합을 불규칙하게 가수분해하는 효소(1)로 식물체의 inulase(2,3)가 이에 속하며 미생물에서는 *Aspergillus niger*(4), *Streptomyces chibaensis*(5), *Pseudomonas* sp.(6), *Aspergillus ficuum*(8-11), *Penicillium purpurogenum*(12) 등 일부 미생물에서만 보고되었다. 미생물의 endoinulase는 ion-exchange chromatography, gel filtration 등의 방법으로 정제되어 그 일반적 성질이 연구, 보고되었는데(5-12), exoinulase와는 다르게 이 효소는 invertase 활성이 거의 없고 inulin을 가수분해하여 주로 fructose oligomer를 생성하는 것으로 알려졌다. 또한 다른 미생물과는 다르게 *Aspergillus ficuum* 및 *Penicillium pupurogenum*은 한 균주에서 endo와 exoinulase 두 종류 모두 같이 분비하고 있으며(8-12), 이러한 특성을 이용하여 inulin으로부터 fructo 올리고당의 생산이 시

도되고 있다(11).

본 연구에서는 전보(13)에 이어 토양에서 분리한 *Streptomyces* sp. S56으로부터 생산한 endoinulase를 분리, 정제하고 그 작용기작과 특성을 알아보기 위한 것으로 최적 pH, 최적온도, 열안정성, 기질특이성, 반응특이성, K_m 등의 일반적 성질과 chemical modification을 이용하여 효소 촉매작용에 관련된 amino acid residue를 조사하여 보았다.

재료 및 방법

효소의 생산

균주는 서울대학교 농과대학 농화학과 생화학연구실에서 보유중인 *Streptomyces* sp. S56을 사용하였으며 하 등(13)의 방법에 따라 균주를 배양하여 효소를 생산하였다.

효소의 정제

균체를 제거한 배양상징액의 $(NH_4)_2SO_4$ 30~70%

Key words: Endoinulase, inulin, *Streptomyces*, characterization

*Corresponding author

포화침전물을 20°C, 9,000×g로 원심분리하여 0.01 M sodium phosphate buffer(pH 7.0)에 녹인 후 조효소로 사용하였다. 조효소의 1차 정제는 0.01 M sodium phosphate buffer(pH 7.0)로 평형시킨 DEAE-cellulose column(2×30 cm)에 조효소 15 ml를 흡작시키고 동일 buffer로 NaCl 농도가 0.~0.5 M 되도록 linear salt gradient 방법을 사용, 30 ml/hr의 속도로 용출시켜 행하였다. Inulase 활성 분획을 모아 gum arabic으로 농축하고 농축액 15 ml를 0.01 M sodium phosphate buffer(pH 7.0)에 평형시킨 Sephadex G-200 column(2×100 cm)에 주입하여 동일 buffer로 15 ml/hr의 속도로 용출시켜 재정제하였다. 재정제한 inulase는 증류수에 투석 후 농축하여 다음 실험에 사용하였다.

효소의 일반적 성질

Gel filtration에 의해 정제된 효소의 최적 pH는 pH 3.0~7.5 범위의 0.1 N citric acid-Na₂HPO₄(McIlvaine) buffer를 사용하여 40°C에서 15분간 반응 후 효소활성을 측정하고 최적온도는 pH 5.0에서 반응온도를 30~70°C로 달리하여 상기 조건에서 반응, 효소활성을 측정하여 정하였다. 효소의 열안정성은 45~60°C 사이에서 5~60분간 열처리하고 남아있는 효소활성을 최적 pH의 실험방법과 같이 측정하여 조사하였다. K_m, V_{max}는 inulin은 1~10%, sucrose는 2~100 mM인 농도에서 각 기질농도별로 60분까지 반응시키면서 시간별로 효소활성을 측정하여 초기속도를 구하고 이로부터 Lineweaver-Burk plot를 작도, 두 값을 구하였다.

금속이온 및 chelating agent 영향실험은 CaCl₂, NaCl, MgCl₂, CuCl₂, KCl, BaCl₂, CoCl₂, HgCl₂, AgNO₃, MnCl₂, FeCl₃, ZnCl₂, LiCl₂, MoO₃ 및 EDTA-2Na와 8-hydroxyquinoline의 1 mM 용액에 효소를 30°C에서 30분간 방치 후 각각의 활성을 측정하여 정하였다. 기질특이성은 inulin, sucrose, raffinose, melizitose의 2~4% 용액을 기질로 사용하여 효소활성을 조사하였으며 반응특이성은 2% inulin 1 ml에 효소액 0.5 ml (0.5 U/ml)를 첨가하고 40°C에서 15분~72시간까지 반응시키면서 시간별로 1 μl의 반응용액을 채취, TLC로 분해산물을 검정하여 조사하였다.

효소의 chemical modification

효소의 tryptophan residue는 N-bromosuccinimide (14), lysine residue는 pyridoxal 5'-phosphate(15),

argine residue는 phenylglyoxal(16), tyrosine residue는 N-acetylimidazole(17), histidine residue는 diethylpyrocarbonate(18) methionine residue는 chloramin-T(19), cysteine residue는 5,5'-dithiobis(2-benzoic acid)(20), cystine residue는 dithiothreitol (21), 그리고 carboxyl기는 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl)carbodiimide(22)를 사용하여 chemical modification시켰다.

분석방법

Inulase 활성은 김 등(23)의 방법에 따라 효소에 의해 inulin이 분해되어 생성되는 환원당량을 DNS법(24)으로 측정하여 결정하였고 효소단위는 1분간 1 μmole의 환원당이 생성되는 것을 1단위로 하였다. 전기영동은 acrylamide 농도를 7.5%로 하고 Davis(25)의 방법을 일부 수정하여 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.0) 조건에서 실시하였다. 단백질량은 bovine serum albumin(fraction V)을 표준으로 하여 Lowry 등(26)의 방법을 사용하여 측정하였고, inulin 분해산물의 분석은 Collins 등(27)의 방법을 사용, TLC로 행하였다.

결과 및 고찰

효소의 정제

최적조건에서 균주를 배양한 후 배양액으로부터 30~70% 포화 (NH₄)₂SO₄ 분별침전법으로 조효소를 제조한 결과 inulase 회수율은 49.7%이었다(Table 1). (NH₄)₂SO₄로 침전시킨 조효소를 DEAE-cellulose column chromatography를 정제한 결과는 280 nm에서 단백질 peak가 4개 나타났으며 이중 0.2 M NaCl에서 용출되는 3번째 peak가 inulase 활성을 가지는 것으로 나타났다(Fig. 1). DEAE-cellulose에 의해 정제된 이 inulase 분획을 gum arabic으로 농축하고 Sephadex G-200 gel filtration으로 재정제하였으며 그 결과 2개의 단백질 peak 중 첫번째에서 inulase 활성이 나타났다(Fig. 2). 2차 정제한 inulase를 농축하여 7.5% polyacrylamide gel 전기영동한 결과 재정제한 inulase는 전기영동상에서 단일 band로 나타났으며 이 band를 slicing하여 inulase 활성을 검정해 본 결과 활성을 보유하고 있었다(Fig. 3).

Endoinulase를 분비하는 다른 미생물의 경우에는 ion chromatography로 정제한 결과 여러 종류의 endoinulase가 존재한다고 보고하고 있으나(5-12) 본

Table 1. Summary of steps in endoinulase purification from *Streptomyces* sp. S56

Steps	Volume	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/mg protein)	Yield (%)	Purification fold
Culture broth	1150	2300	920	0.4	100	1
(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation (30~70%)	90	336.6	457.2	1.36	49.7	3.4
DEAE-cellulose	51	11.22	290.7	25.9	31.59	64.75
Sephadex G-200	40	4.8	184	38.33	20.0	95.83

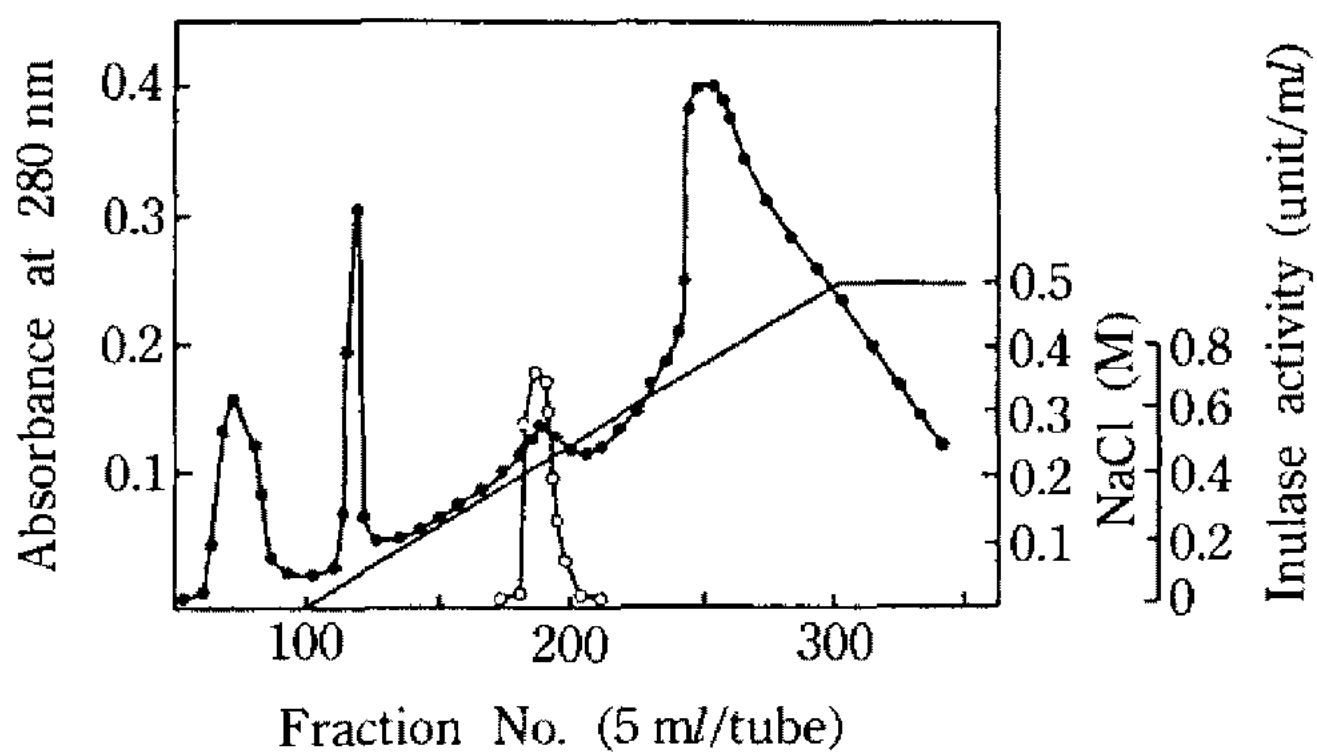


Fig. 1. DEAE-cellulose chromatogram of crude endoinulase from *Streptomyces* sp. S56.

●-●: absorbance at 280 nm
○-○: inulase activity (unit/ml)

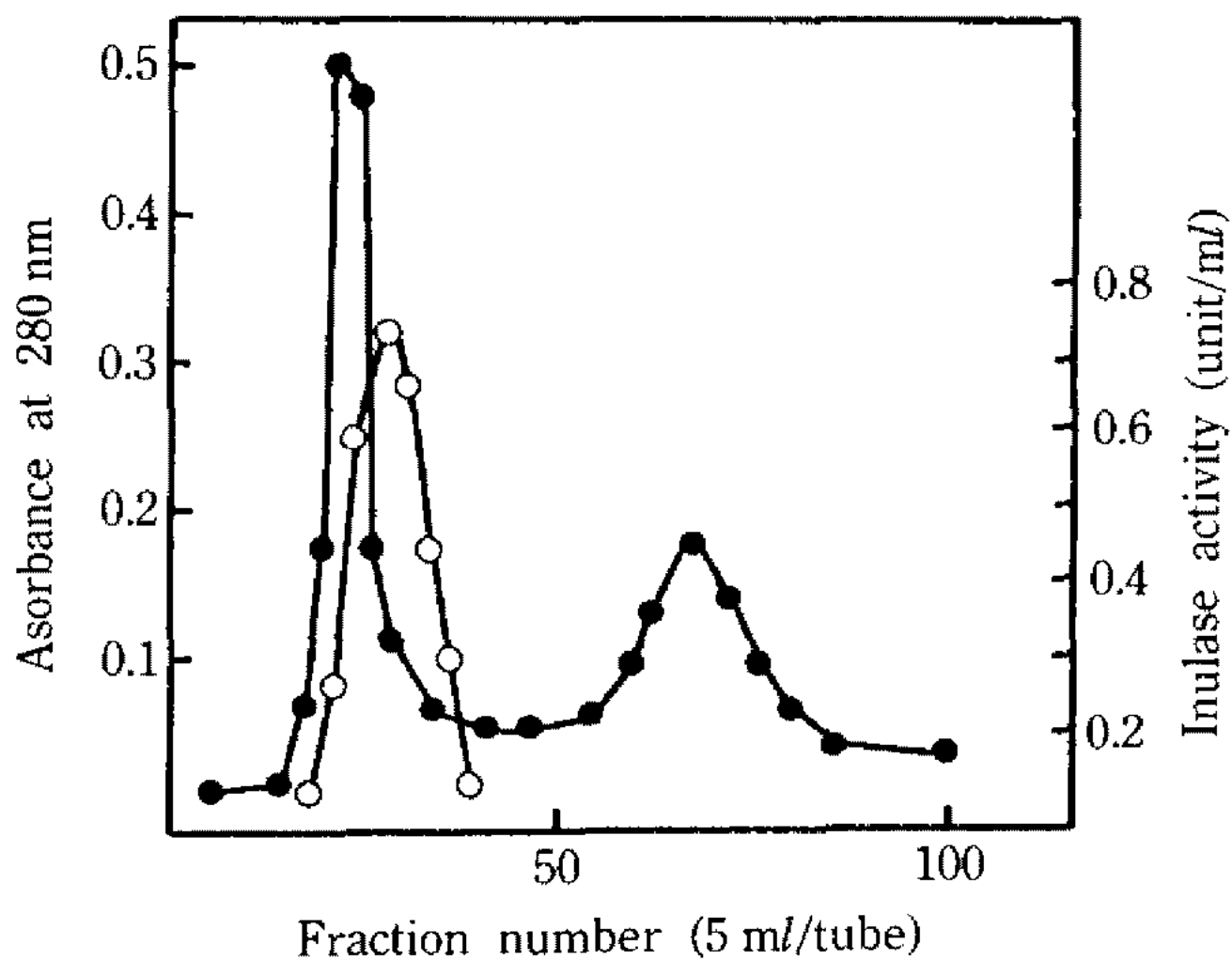


Fig. 2. Sephadex G-200 gel filtration of endoinulase purified on DEAE-cellulose column.

●-●: Absorbance at 280 nm
○-○: Inulase activity (unit/ml)

실험균주는 한 종류의 inulase만 보유하는 것으로 나타났다. 특히 *Aspergillus*(8,9), *Penicillium*(12) 등의 균주에서는 여러 종류의 endoinulase 외에 동일 균주에서 exoinulase도 동시에 생산된다고 보고되고

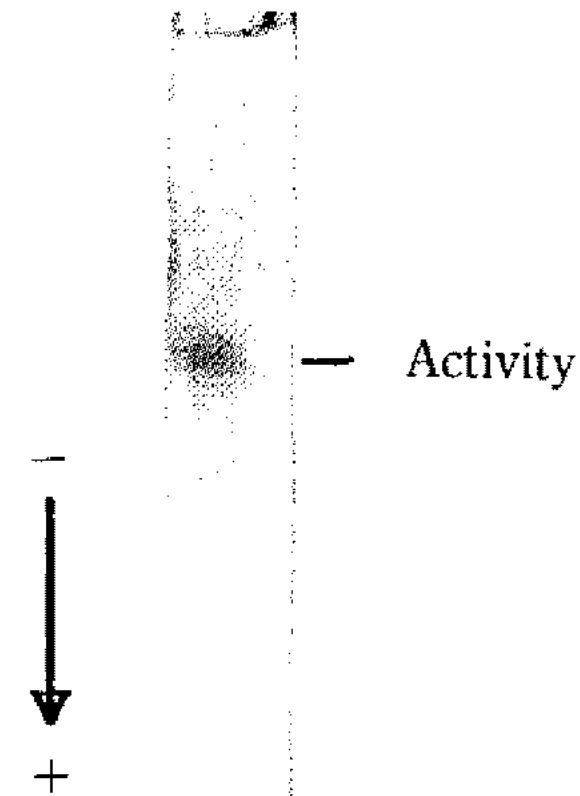


Fig. 3. 7.5% polyacrylamide gel electropherogram of endoinulase purified on Sephadex G-200.

있으나 본 *Streptomyces* 균주에서는 이와 다르게 다음의 반응특이성 실험에 나타난 바와 같이 한종의 endoinulase만을 생산하였다.

이상 (NH₄)₂SO₄ 분별침전, DEAE-cellulose column chromatography, Sephadex G-200 gel filtration의 정제과정에 의하여 본 효소는 비활성이 각각 mg protein당 1.26, 25.9, 38.33 units로 약 3, 65, 96배로 정제되었으며 회수율은 20%이었다(Table 1).

효소의 일반적 성질

최적 pH, 최적온도, 열안정성 : 0.1 M citric acid-Na₂HPO₄(McIlvaine) buffer를 사용, 반응액의 pH를 3.0~7.5로 조절하여 inulase 활성을 측정한 결과 최적 pH는 5.0~6.0이었으며(Fig. 4), 반응온도를 30~70 °C로 달리하여 각 온도에서의 inulase 활성을 측정한 결과 최적온도는 50°C로 나타났다(Fig. 4).

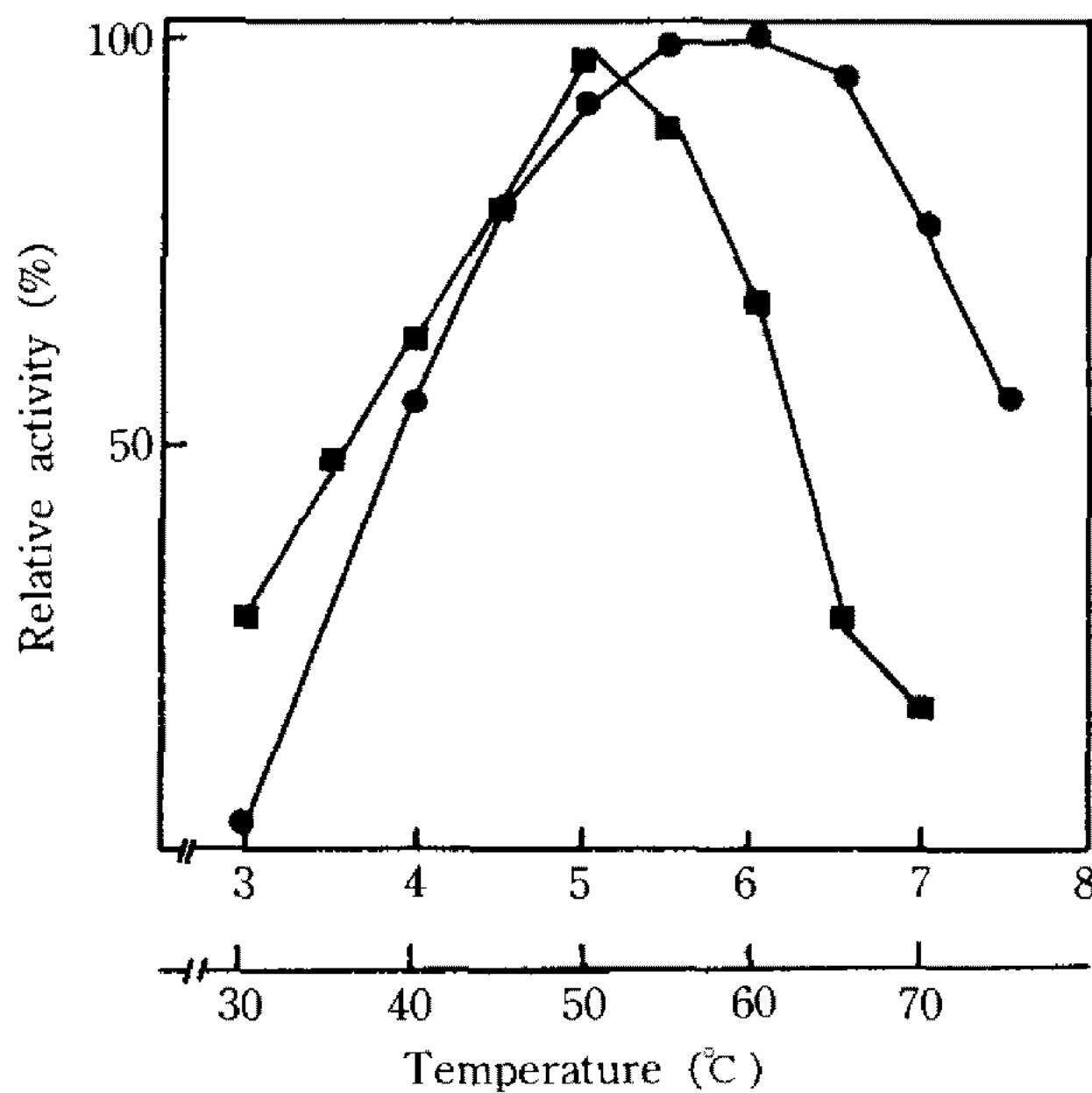


Fig. 4. Effect of pH and temperature on endoinulase activity.

●-●: pH; enzyme activity was assayed in McIlvaine buffer (pH 3.0~7.5) for 15 min at 40°C.

○-○: temperature; enzyme activity was assayed in 0.1 M sodium acetate (pH 5.0) buffer for 15 min at indicated temperature.

열안정성은 45~60°C 사이에서 5~60분까지 열처리 후 잔류활성을 측정함으로써 조사한 결과, 45°C 와 50°C 에서 열처리 후 잔류활성이 각각 74%와 73%, 1시간 후에는 66%와 42%의 잔류활성을 나타내었으며, 55°C 에서는 5분간 열처리 후 잔류활성이 43%, 30분 후에는 7%로 활성이 급격히 감소하였으며 60°C 에서는 5분만에 거의 대부분 활성을 잃어 잔류활성은 19%이었다(Fig. 5). 이러한 효소작용 최적 pH, 온도 및 열안정성은 이미 발표된 다른 미생물 endoinulase의(5-12) 성질과 비슷하였으나 열안정성에 있어서는 *Pseudomonas*(7) 및 *Penicillium*(12) 속에서 생산되는 효소가 다소 높은 것으로 보고되고 있다.

금속이온의 효과: 효소액에 14가지 금속이온과 chelating agent인 EDTA, 8-hydroxyquinoline을 1 mM로 첨가하여 30°C 에서 30분간 방치한 후 효소활성을 측정된 결과는 Table 2에 나타내었다. 본 효소는 주로 Mn^{2+} 이온에 의하여 효소활성이 증가되었으며, Ag^+ , Hg^+ , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mo^{6+} , Zn^{2+} 이온에 의해서는 효소활성이 약 50% 이상 감소 또는 완전 실활되는 것으로 나타났다. 이러한 금속이온의 효소활성에 미치는 영향은 기존의 endoinulase와는 완전히 상이하게 나타난 것으로 예를들면 본 효소의 활성을 증가

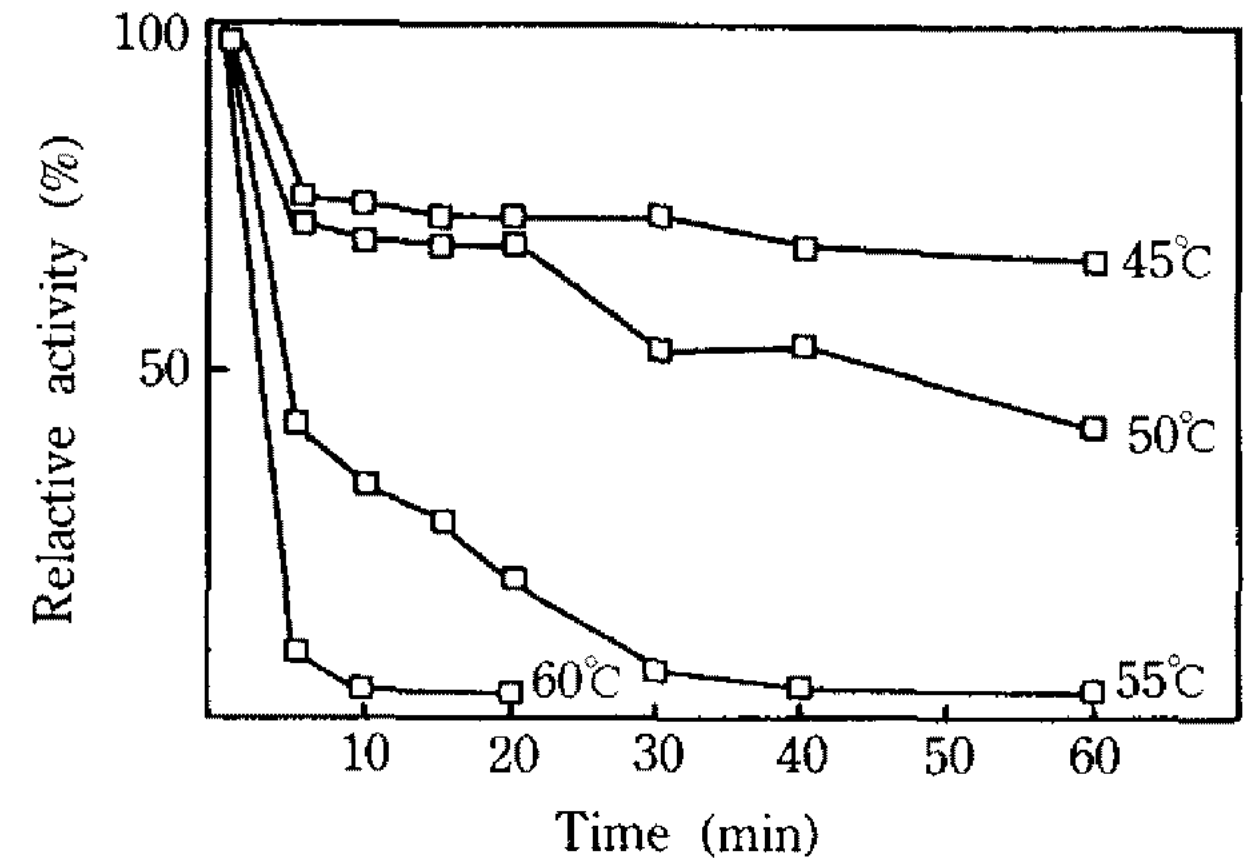


Fig. 5. Heat stability of endoinulase from *Streptomyces* sp. S56.

After incubation at indicated temperature for 5 to 60 min, residual activity was measured in the standard assay condition.

Table 2. Effect of metal ions on endoinulase activity from *Streptomyces* sp. S56

Metal ions (added as chloride)	Concentration (mM)	Relative activity (%)
control	—	100
Na^+	1	100
K^+	1	100
Ag^+ (as $AgNO_3$)	1	54
Hg^+	1	0
Ca^{2+}	1	100
Mg^{2+}	1	100
Cu^{2+}	1	18
Ba^{2+}	1	100
Co^{2+}	1	112
Mn^{2+}	1	128
Zn^{2+}	1	64
Li^{2+}	1	100
Fe^{3+}	1	22
Mo^{6+} (as MoO_3)	1	0
EDTA (disodium salt)	1	84
8-hydroxyquinoline	1	54

Enzyme solution was preincubated with each metal ion or chelating agent for 30 min at 30°C. The activity without metal ion or chelating agent is shown as 100%.

시키는 Mn^{2+} 이온은 *Aspergillus*(8) 생산효소에서는 활성저해이온으로, 본 효소의 활성저해이온인 Fe^{3+} 은 상기 균주에서는 주 활성증가이온으로 보고되고 있으며 또한 *Streptomyces*에서도(5) 다른 결과를 보고

Table 3. Substrate specificity of endoinulase from *Streptomyces* sp. S56

Substrate	Relative activity (%)
Inulin	100
Sucrose	0
Raffinose	0
Melezitose	0
S/I ¹ =0	

Enzyme activity was assayed in 0.1 M sodium acetate (pH 5.0) buffer for 15 min at 40°C and one unit of activity was defined as the activity liberating 2 μmole reducing groups, except for inulin (1 μmole), per 1 min.

$$1 \text{ S/I} = \frac{\text{total units of invertase activity}}{\text{total units of inulase activity}}$$

하고 있다.

또한 본 효소는 EDTA와 8-hydroxyquinoline에 의해 저해를 받는 것으로 나타나서 효소의 활성 중심에 금속이온이 위치하는 metalloenzyme일 가능성이 큰 것으로 추정된다(28). EDTA에 의한 활성감소는 *Aspergillus*(8) 분비 endoinulase에서도 발표되었으나 *Pseudomonas*(7)에서는 활성에 영향을 주지 않는 것으로 보고되고 있다.

기질특이성 : Inulin, sucrose, raffinose, melezitose를 기질로 하여 효소의 분해력을 측정하고 inulin에 대한 활성을 100으로 할 때 각 기질에 대한 상대활성도를 검정한 결과 본 실험의 inulase는 sucrose, raffinose, melezitose에 대한 분해력은 전혀 없는 것으로 나타났다(Table 3). Raffinose는 galactose가 sucrose에 α-1,6 결합을 한 것이며 melezitose는 glucose가 sucrose의 fructose에 α-1,3 결합을 한 것으로 각각 invertase 및 α-glucosidase 활성이 있으면 가수분해된다. 따라서, 본 실험의 inulase는 invertase와 α-glucosidase 활성은 전혀없는 효소로 판명되었다. 현재까지 알려진 식물체(2, 3)와 *Streptomyces chibensis*(5), *Pseudomonas*(6)에서 생산되는 endoinulase는 본 균주에서 생산되는 효소와 같이 sucrose에 대한 활성/inulase는 대한 활성(S/I)비가 거의 0으로 inulase 이외에 sucrose에 대한 활성은 없는 것으로 보고되고 있으나 *Aspergillus*(8-10), *Penicillium*(12) 등 exoinulase를 동시에 분비하는 균주의 endoinulase는 약하지만 일부 invertase 활성이 존재하는 것(S/I=0.2~1.2)으로 보고하고 있다. 본 실험의 endoinu-

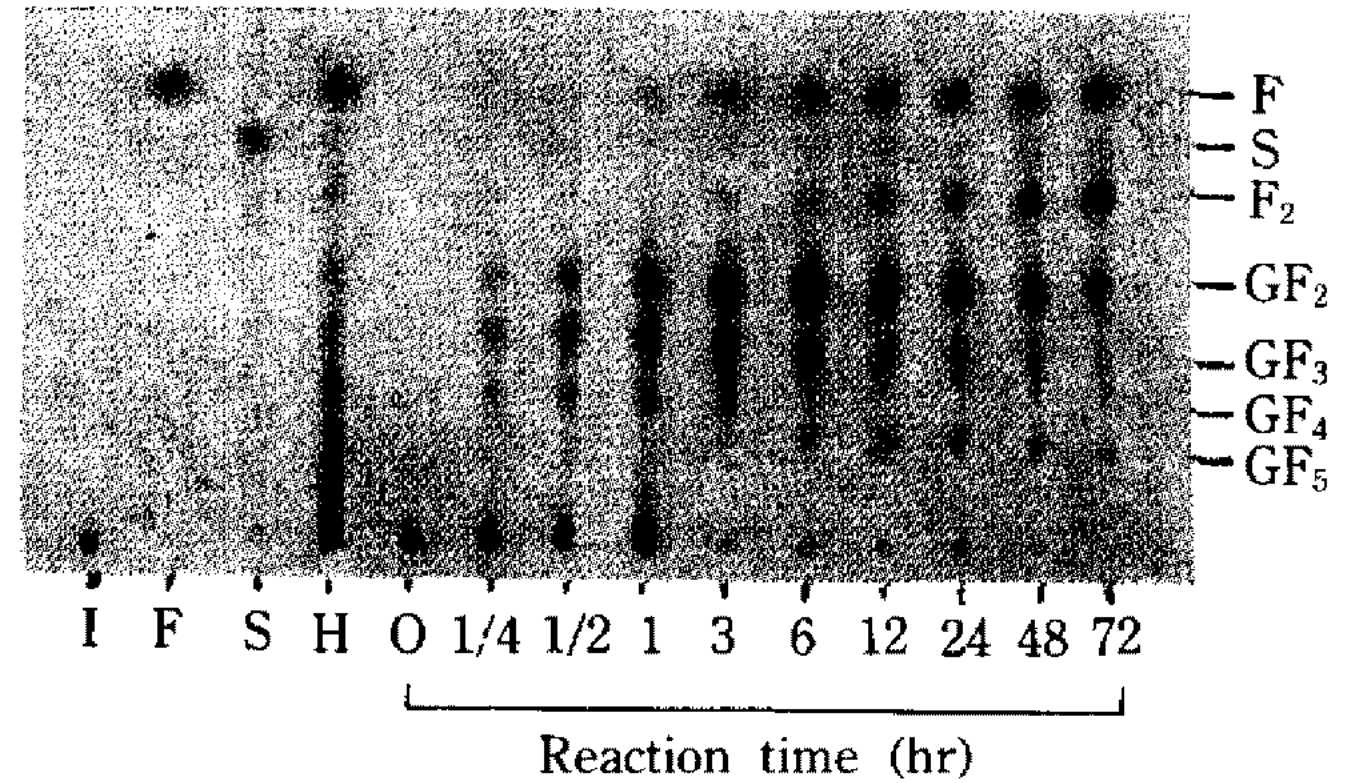


Fig. 6. Thin-layer chromatogram showing the formation of fructose oligomer during degradation of inulin (2% (w/v) in 0.1 M sodium acetate (pH 5.0) buffer) by incubation with 0.5 units of endoinulase at 40°C. I: Inulin, F: Fructose, S: Sucrose, H: Inulin hydrolysate.

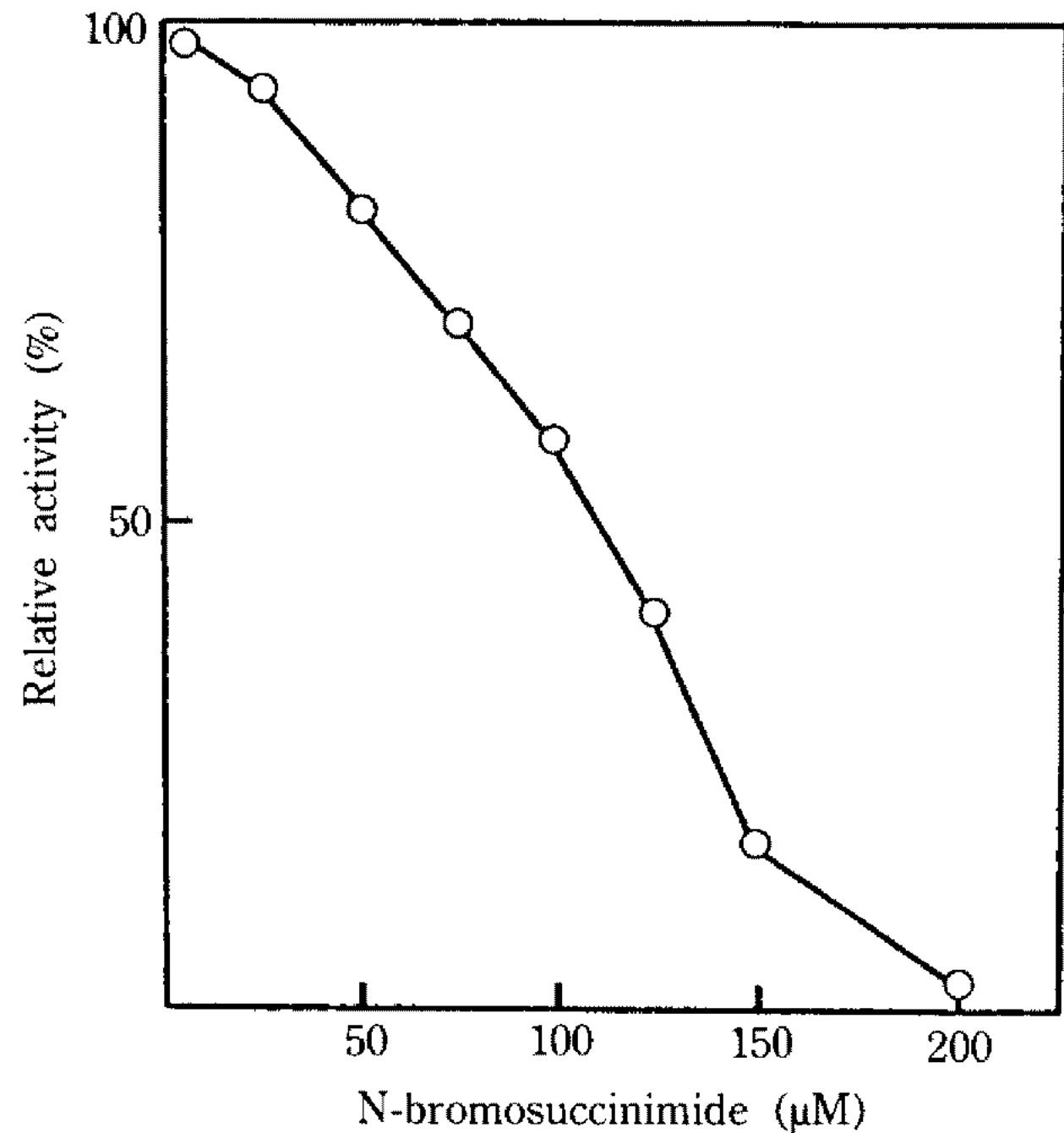


Fig. 7. Inactivation of endoinulase by N-bromosuccinimide.

The reaction was carried out in 0.1 M sodium acetate (pH 5.0) buffer with 0 to 0.5 mM N-bromosuccinimide for 1 hour at 40°C.

lase는 S/I비가 0으로서 invertase 활성이 거의 없는 전형적인 endoinulase(inulinase, EC 3.2.1.7)로 나타났다(Table 3).

반응특이성 : 정제한 효소와 inulin을 72시간 반응시키면서 일정시간별로 생성된 분해산물을 TLC로 검정한 결과 inulase의 분해산물은 시간이 경과함에 따라 중합도(DP) 3~6의 fructose oligomer(GF₂-GF₅)가 증가했으며 반응 3시간째부터는 fructose와 DP 2

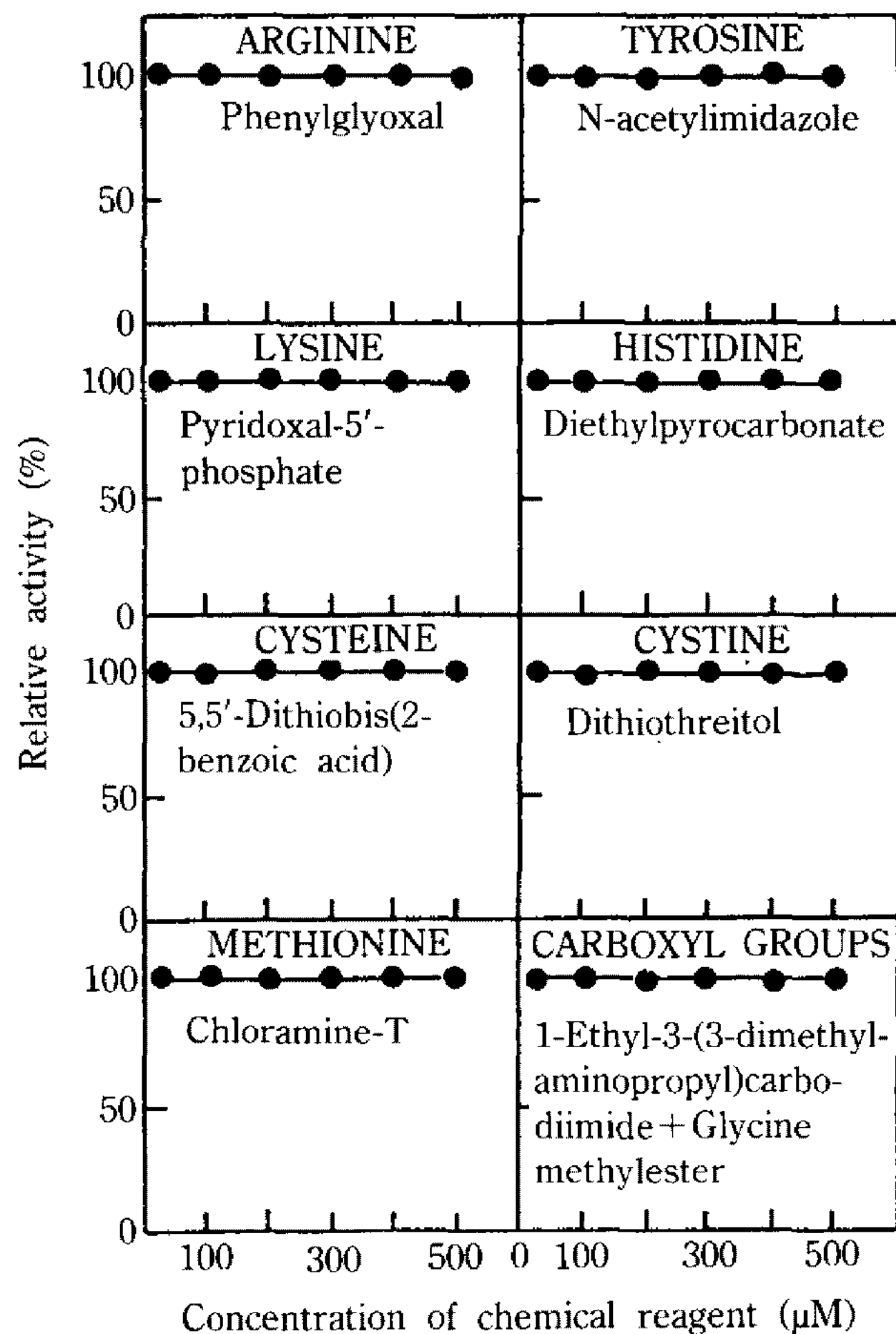


Fig. 8. Reaction of endoinulase with various chemical modification reagents.

The chemical modification reactions were carried out in 0.1 M sodium phosphate (pH 7.0) buffer, except for carboxyl groups (0.1 M sodium acetate (pH 5.0) buffer), with the indicated concentration of modification reagents for 1 hour at 25°C.

(F₂)의 fructose oligomer도 나타나기 시작하여 그 양이 반응시간에 따라 점차 증가하였다(Fig. 6). Inulin의 가수분해시 fructose만 생성되는 exoinulase와는 반대로 반응시간에 따라 fructose oligomer가 많이 나타나는 본 실험결과는 본 inulase가 inulin의 β-2,1 결합을 내부에서 불규칙하게 가수분해하는 endo형임을 시사하여 주고 있다.

K_m , V_{max} : Michaelis 상수(K_m)와 V_{max} 값을 inulin의 평균 분자량을 5,000으로 하고 Lineweaver-Burk plot를 이용하여 구한 결과 효소의 inulin에 대한 K_m 값과 V_{max} 값은 각각 0.287 mM, 0.109 μmole/min이었다. 효소의 기질에 대한 친화력을 나타내는 K_m 값의 경우 *Aspergillus*의 endoinulase는 570 mM, *Pseudomonas*는 2 mM, *Streptomyces chibaensis*는 0.45 mM, *Penicillium*은 0.21 mM로 본 효소가 친화력이 가장

높은 것으로 보인다.

효소의 chemical modification

본 효소의 촉매작용에 관여하는 essential amino acid residue를 알아보기 위해 몇가지 amino acid residue와 carboxyl기에 대한 specific chemical modification을 행한 결과는 Fig. 7과 8에 나타내었다.

N-bromosuccinimide(NBS)는 효소의 tryptophan residue를 pH 4.5~5.0에서 선택적으로 산화시키며 pH 6.0에서는 sulfhydryl기를 tryptophan보다 먼저 산화시키는 것으로 알려져 있어(29) 0.1 M sodium acetate(pH 5.0) buffer에서 NBS를 처리한 본 실험 조건하에서는 methionyl기와 cysteinyl기의 부가반응은 제외된 것으로 생각하였다. 본 효소는 NBS 처리 농도를 증가할수록 불활성되어 200 μM을 처리했을 때 완전히 활성을 잃는 것으로 나타났다(Fig. 8). 반면 arginine, tyrosine, lysine, histidine, methionine, cysteine, cystine 및 carboxyl기에 대한 chemical modification 결과는 효소활성에 아무런 영향을 주지 않는 것으로 나타났다(Fig. 8). 따라서 본 실험의 endoinulase 효소촉매작용에 관여하는 essential amino acid residue는 tryptophan residue인 것으로 추정되었으며 이러한 결과는 endoinulase의 경우 *Pseudomonas*에서도(7) 보고되고 있다.

요 약

Streptomyces sp. S56으로부터 endoinulase를 생산하고 정제하여 물리화학적 성질을 조사하였다. 조효소는 DEAE-cellulose column chromatography 및 Sephadex G-200 gel filtration에 의하여 정제하였으며, 정제된 효소는 polyacrylamide gel 전기영동결과 단일 band로 나타나서 전기영동상 순수하게 분리되었다. 정제효소의 최적 pH는 5.5~6.0, 최적온도는 50°C였으며, 최적 온도에서의 열안정성은 1시간 처리 후 42%의 잔류활성을 보였다.

정제효소는 금속이온 중 Mn^{2+} 에 의해서는 활성이 증가되었으나, Ag^+ , Hg^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} , Mo^{6+} 에 의해서는 활성이 50% 이상 감소하였다. 또한 EDTA, 8-hydroxyquinoline에 의하여 활성이 저해되는 것으로 보아 metalloenzyme인 것으로 추정되었다. 본 효소는 inulin 내부의 β-2,1 결합을 가수분해하여 fructose oligomer를 생산하는 inulase 활성만을 가지고 있었으며 invertase 및 α-glucosidase 활성은 나타내지

않았다. Inulin에 대한 K_m 값은 0.287 mM, V_{max} 는 0.109 $\mu\text{mol}/\text{min}$ 이었다.

효소의 촉매작용에 관하여는 amino acid residue는 tryptophan로 추정되었으며 그외에 arginine, tyrosine, lysine, methionine, histidine, cysteine 및 cystine의 chemical modification 실험결과 효소활성저해가 나타나지 않아 이들 amino acid residue는 효소작용에 직접적으로 관여하지 않는 것으로 추정되며 carboxyl기도 효소활성에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

감사의 말

본 연구는 동력자원부 에너지관리공단의 대체에너지기술개발사업비 및 한국과학재단지정 농업생물신소재연구센터의 부분적 지원을 받아 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Vandamme, E.J. and D.G. Derycke. 1983. Microbial inulases: fermentation process, properties and applications. *Adv. Appl. Microbiol.* **29**: 139-176.
- Edelman, J. and T.G. Jefford. 1964. The metabolism of fructose polymers in plants. *Biochem. J.* **93**: 148-161.
- Rutherford, P.P. and A.C. Deacon. 1972. β -Fructofuranosidases from roots of Dandelion (*Taraxacum officinale* Weber). *Biochem. J.* **126**: 569-573.
- Nakamura, T., Kurokawa, S. Nakatsu, and S. Ueda. 1978. Crystallization and general properties of an extracellular inulase from *Aspergillus* sp. (studies on microbial inulase, part IV). *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*. **52**: 159-166.
- 정구영, 박관화, 이계호. 1981. *Streptomyces chibaensis*가 분비하는 이눌라아제의 정제와 특성. *한국식품과학회지* **13**: 67-73.
- 이태경, 최용진, 양한철. 1988. *Pseudomonas*가 생산하는 inulinase에 관한 연구. *산업미생물학회지* **16**: 259-264.
- 이태경, 신현철, 최용진, 양한철. 1988. *Pseudomonas* sp. 균체의 endoinulase 특성. *산업미생물학회지* **16**: 484-488.
- Ettalibi, M. and J.C. Baratti. 1987. Purification, properties and comparison of invertase, exoinulase and endoinulases of *Aspergillus ficuum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 13-20.
- Ettalibi, M. and J.C. Baratti. 1990. Molecular and kinetic properties of *Aspergillus ficuum* inulinases. *Agric. Biol. Chem.* **54**: 61-68.
- Azhari, R., A.M. Szlak, E. Ilan, S. Sideman and N. Lotan. 1989. Purification and characterization of endo- and exo-inulase. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **11**: 105-117.
- Norman, B.E. and B. Hojer-Pederson. 1989. The production of fructooligosaccharides from inulin or sucrose using inulinase or fructosyltransferase. *Denpun Kagaku*. **36**: 103-111.
- Onodera, S. and N. Shiomi. 1988. Purification and substrate specificity of endo-type inulase from *Penicillium purpurogenum*. *Agric. Biol. Chem.* **52**: 2569-2576.
- 하영주, 최언호, 김수일. 1989. *Streptomyces* sp. S56의 endo형 inulase의 생산. *산업미생물학회지* **17**: 593-599.
- Thomson, J.W., G.C.K. Roberts and A.S.V. Burgen. 1980. The effect of modification with N-bromosuccinimide on the binding of ligands to dihydrofolate reductase. *Biochem. J.* **187**: 501-506.
- Ogawa, H. and M. Fujioka. 1980. The reaction of 5-phosphate with an essential lysine residue of sacchropine dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **255**: 7420-7425.
- Poulose, A.J. and P.E. Kolattukudy. 1980. Presence of one essential arginine that specifically binds the 2-phosphate of NADPH on each of the ketoacyl reductase and enoyl reductase active sites of fatty acid synthetase. *Arch. Biochem. Biophys.* **199**: 457-464.
- Riordan, J.F. and B.L. Vallee. 1972. Modification reactions: O-Acetyltyrosine. *Meth. Enzymol.* **25**: 500-506.
- Bloxham, D.P. 1981. The chemical reactivity of the histidine-195 residue in lactate dehydrogenase thiomethylated at the cysteine-165 residue. *Biochem. J.* **193**: 93-97.
- De la Llosa, P., A.E. Abed and M. Roy. 1980. Oxidation of methionine residues in lutropin. *Can. J. Biochem.* **58**: 745-748.
- Talgoy, M.M., A.W. Bell, and H.W. Duckworth. 1979. The reactions of *E. coli* citrate synthase with the sulhydryl reagents 5,5-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) and 4,4-dithiodipyridine. *Can. J. Biochem.* **57**: 822-833.
- Lundblad, R.L. and C.M. Noyes. 1984. Chemical reagents for protein modification, Vol. 1, p. 95. CRC Press Inc.
- Carraway, K.L. and D.E., Jr Koshland. 1972. Carbodiimide modification of proteins. *Meth. Enzymol.* **25**: 616-622.

23. 김수일, 문향식. 1987. *Kluyveromyces marxianus*가 생산하는 intracellular 및 extracellular inulase의 정제 및 특성 비교. 한국농화학회지. **30**: 169-178.
24. Melius, P. 1971. Isolation of yeast invertase by Sephadex gel chromatography. *J. Chem. Educ.* **48**: 765-766.
25. Davis, B.J. 1964. Disc electrophoresis-II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **121**: 404-427.
26. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
27. Collins, F.W. and K.R. Chandorkar. 1971. Thin layer chromatography of fructooligosaccharides. *J. Chromatogr.* **56**: 163-167.
28. Royer, G.P. 1982. *Fundamentals of Enzymology*, p. 109. John Wiley & Son Inc. New York.
29. Freisheim, J.H., A.A. Kumar, D.T. Blankenship and B.T. Kauffman. 1979. *Chemistry and Biology of Pteridines*. p. 419. Elsevier-North Holland. Amsterdam.

(Received September 2, 1992)