

항체를 이용한 Endoinulinase 생산 곰팡이의 검색

이선희 · 김미경 · 정미선 · 정용섭 · 엄태봉*

전북대학교 식품공학과

Screening of the Endoinulinase-producing Fungi by Using Antibody

Lee, Sun-Hee, Mi-Kyung Kim, Mi-Sun Chung,
Yong-Seob Jeong and Tai-Boong Uhm*

Department of Food Science and Technology,
Chonbuk National University, Chonju 560-756, Korea

Abstract — An assay system by using antibody was adopted to screen the endoinulinase producing-fungi due to its high specificity toward endoinulinase. To determine whether the affinity-purified rabbit serum, which were generated against the purified endoinulinase, can react only with the endoinulinase, rocket immunoelectrophoresis was performed. The results showed that the serum specifically reacts with endoinulinase but not with exoinulinase and other proteins in the culture media. Using this polyclonal antibody, a strain from 62 fungal colonies was selected and it secreted an endoinulinase in the culture media to the amount comparable to that of *Aspergillus ficuum* ATCC 16882 known as a high endoinulinase producer.

식물의 저장 탄수화물인 이눌린(inulin)은 약 35개의 D-fructose 분자가 β -2,1 결합에 의해 직쇄상으로 결합되어 있고, 한쪽 말단이 sucrose에서와 같이 포도당이 α -1,2 결합으로 연결되어 있다(1-3). 이눌린은 *Compositae*와 *Campanulaceae family*와 같은 식물에 주로 존재하는데 특히 돼지감자는 괴경의 70~80%가 이눌린으로 이루어져 있어 과당이나 oligofructo당 생산에 잠재적인 생산 작물로 생각되고 있다. 지금까지 oligofructo당은 sucrose에 fructosyl transferase를 이용하여 생산되어 왔다. 이 방법은 저가격의 sucrose를 이용한다는 점에서 좋은 방법이라고 할 수 있으나 부산물로 생성되는 glucose를 제거할 필요가 있다. 그러나 곰팡이들로부터 endoinulinase가 발견됨에 따라 이눌린으로부터 oligofructo당을 한단계 공정으로 제조하는 것이 가능해 졌다. 따라서 endoinulinase를 분비하는 미생물을 선별하는 것은 버려지는 돼지감자의 효율적인 이용면에서 그리고 oligofructo당 생산공정의 단순화 관점에서 필요한 일이라

할 수 있다. 현재 많은 곰팡이는 endo-와 exoinulinase를 동시에 내기 때문에 일반적인 환원당 정량 방법으로는 분비한 endoinulinase의 양을 측정하지 못하는 문제점이 생긴다. 이러한 점을 해결하기 위하여 endoinulinase와 선택적으로 결합될 수 있는 항체를 제조하고 이 항체를 이용하여 여러 곰팡이로부터 endoinulinase를 많이 내는 균주를 선별하고자 하였다.

재료 및 방법

Endoinulinase의 정제

*Aspergillus ficuum*이 생산한 조효소액(Novozyme 230)은 덴마크 Novo A/S로부터 얻었다. 이 효소액은 *Aspergillus ficuum* ATCC 16882의 배양액을 한외여과로 농축시키고 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 로 침전시켜 조제된 것으로 1,800 U/ml의 endo- 및 exoinulinase의 활성을 가지고 있었다. 이 조효소액은 많은 양의 염과 cellulase 활성을 가지고 있었기 때문에 Sephadex G-25 column(1×5 cm)에서 탈염시킨 후 Amicon concentrator에서 한외여과(MW. cut-off 10,000)하여 농축 및

Key Words: Endoinulinase, Inulin, Fungal inulinase

*Corresponding author

50 mM sodium-acetate(pH 4.1)로 완충액 교환을 하였다. 이 농축액을 미리 50 mM sodium-acetate(pH 4.1)로 평형화시킨 CM-Sephadex C-50 column(2.5×22 cm)에 주입하고 분당 0.6 ml의 유속으로 충분히 용출한 뒤 0.7 M NaCl로 linear gradient를 걸어주었다. endoinulinase 활성은 gradient를 걸어주기 전에 나왔으므로, 이를 모아 한외여과(MW. cut-off 10,000)하여, 농축 및 20 mM phosphate(pH 6.7)로 완충액 교환을 하였다. 이 농축액을 20 mM phosphate buffer(pH 6.7)로 미리 평형화시킨 DEAE-Sepharose CL-6B column(2.5×30 cm)에 주입하고 분당 0.6 ml의 유속에서 충분히 용출시킨 뒤 0.5 M KCl로 linear gradient를 걸어주었다. gradient에서 분리된 활성 peak를 모아 한외여과(MW. cut-off 10,000)하여 농축한 뒤 1% glycine에서 6시간 투석하였다. 이것을 pI 2.5~5의 Pharmalyte(Pharmacia, Sweden)를 이용 600 V, 5 W에서 14시간 preparative isoelectric focusing을 한 후, Fraction grid로 0.5 cm 간격으로 gel을 분리하였다. 각 분획의 활성을 측정하고 pH 3.75 및 pH 3.78의 두 분획을 모아 Centricon 10(Amicon, USA)에서 농축하였다. 이 농축액을 400 μl씩 HPLC Bio-sil SEC 125(7.6×300 mm) column에 주입하여 활성 peak를 모으고 이것을 Centricon 10에서 한외여과하여 1.0 mg/ml로 농축한 뒤 4°C에 보관하였다. 효소의 정제도는 Laemmli 방법(4)에 준하여 SDS-PAGE를 함으로서 확인되었다.

Exoinulinase의 정제

Exoinulinase의 정제는 Uhm의 방법(5)에 따라 행하였다.

효소 활성 측정 및 단백질 정량

endoinulinase의 활성은 Uhm 등(6)의 방법에 준해 측정하였다. endoinulinase 및 exoinulinase의 효소 활성도는 환원당을 1분당 1 μmole 생산하는 능력을 1 U로 하였다. Invertase 활성은 0.1 M Na-acetate buffer(pH 4)에 녹인 5% sucrose를 기질 용액으로 사용하여 30분간 반응시켜 측정하였고 분당 1 μmole의 sucrose를 분해하는 능력을 1 U로 하였다.

단백질 정량은 Bradford 방법(7)에 따라 시행하였다. 표준단백질로는 bovine serum albumin을 사용하였다.

항체의 조제

정제된 endoinulinase 400 μg을 동량의 complete Freund's adjuvant와 섞어 emulsion을 만든 뒤 New Zealand white rabbit의 등 피하조직에 주사하였다. 2주 후 정제 endoinulinase 400 μg과 Incomplete Freund's adjuvant(IFA) 0.5 ml을 섞어 emulsion을 만든 뒤 토끼에 boosting 주사하고, 2주 후 같은 방법으로 boosting 주사를 하였다. 다시 2주 후 titer를 결정한 뒤 생성된 항체를 얻기 위하여 채혈하였다. 채혈된 혈액은 4°C에서 하루 보관한 뒤 1000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 상등액을 얻고 이것을 10 mM Tris-buffer(pH 8.6)에서 투석하였다. 이 투석액을 10 mM Tris-PO₄(pH 8.6)으로 미리 평형시킨 DEAE-Sepharose CL-6B column(2.5×30 cm)에 주입하였다. 각 분획을 peak별로 모아 rocket immunoelectrophoresis로서 항원과 반응하는 부위를 모은 뒤 10 mM phosphate buffer saline(PBS), pH 8.0로 투석하였다. 부분 정제된 이 serum은 10 mM PBS(pH 8.0)로 미리 평형화시킨 Protein A-Sepharose CL-4B column에 주입하였다. 분당 0.7 ml의 유속으로 충분히 용출시킨 뒤 0.1 M glycine buffer(pH 3.0)로 용출액을 교환하였다. 여기서 분리된 peak는 한외여과(MW. cut-off 30,000)하면서 10 mM PBS(pH 7.3)로 완충액 교환 및 농축하여 4°C에서 냉장 보관하였다.

항체의 특이성(specificity)

정제된 anti-endoinulinase rabbit serum이 endoinulinase에만 선택적으로 반응하는지를 확인하기 위하여 정제된 항체 2 mg을 1% Agarose M과 섞어 8.4×9.4 cm의 Gel Bond film 위에 도포한 뒤 endoinulinase 7, 5, 3, 1, 0.5 μg을 loading하여 Laurell 방법(8)에 따라 immunoelectrophoresis하였다. 비교 실험군으로 정제된 exoinulinase 7 μg 및 5 μg을 같은 방법으로 loading하였다. 균배양액 중의 다른 단백질들과 endoinulinase 항체 사이에 상호반응성을 조사하기 위하여 immunoaffinity resin이 조제되었다. 즉 1 g의 vinylsulfone activated agarose(Sigma)에 11 mg/g matrix의 정제된 항체를 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 8.0)하에서 12시간, 37°C에서 반응시킨 후 0.1 M glycine 용액에 넣고 다시 12시간, 37°C에서 반응시켰다. 이 slurry를 상기 완충용액에서 씻은 후 column(1.0×5 cm)에 충전시켰다.

Endoinulinase 생산균주의 검색

전주시 일원의 토양, 공기, 물로부터 분리된 약

1,200여개의 균주를 2% 이눌린을 유일한 탄소원으로 하는 Czapek's-agar 배지에서 배양하여 균사체 증식이 왕성한 62개의 곰팡이 균주를 선별하였다. 선별된 곰팡이 균들을 27°C에서 67시간 진탕 배양한 후, Whatman filter paper No. 2로 여과하여 그 중 40 ml를 동결 건조하였다. 이것을 400 μ l의 증류수에 녹여 투석하고 Speed-Vac에서 건조시킨 뒤 15 μ l의 0.1 M Tris-barbiturate buffer(pH 8.6)로 녹여 rocket immunoelectrophoresis하였다.

결과 및 고찰

Endoinulinase의 정제

30 ml의 Novozyme 230 조효소액으로부터 CM-과 DEAE-에 의한 ion-exchange chromatography와 isoelectric focusing 및 HPLC gel filtration에 의해 최종 정제된 효소 2.5 mg을 얻을 수 있었다. 정제된 효소의 specific activity는 1,006 U/mg이었으며 I/S ratio(이눌린 가수분해 속도/sucrose 가수분해속도)는 1,475 로써 Baratti 등(9)이 정제한 endoinulinase의 I/S ratio 2.2~2.9에 비해 훨씬 높은 정제도를 얻었다. 특히 정제 과정에서 preparative isoelectric focusing에 의해 sucrose를 분해하는 효소들이 크게 제거됨을 보여주었다. 정제된 효소 7 μ g을 SDS-PAGE gel에 loading 하였을 때 분자량 73,000 \pm 1,000의 단일 밴드(결과는 보이지 않았음)임을 나타내었다.

항체의 조제

토끼에 immunization한 후 생성된 항체는 DEAE-Sephrose에 의해 부분 정제되었다. 그 결과, 280 nm에서 4개의 단백질 peak가 나타났는데 rocket immunoelectrophoresis 결과, immunoglobulin G(IgG)에 해당하는 분획이 정제된 endoinulinase와 강하게 반응하였다. 토끼의 IgG는 protein A와 특이하게 결합되므로 protein A-sepharose column에서 affinity chromatography를 행하였다. 0.1 M glycine-HCl buffer (pH 2.5)에서 방출되는 단백질을 모아 농축한 뒤 SDS-polyacrylamide gel 전기영동 결과 heavy chain과 light chain만 나타내는 비교적 순수한 IgG를 얻을 수 있었다(결과는 보이지 않았음).

이 정제과정을 통해 토끼혈액 100 ml로부터 정제된 항체 54 mg을 얻었다.

Endoinulinase에 대한 항체의 특이성

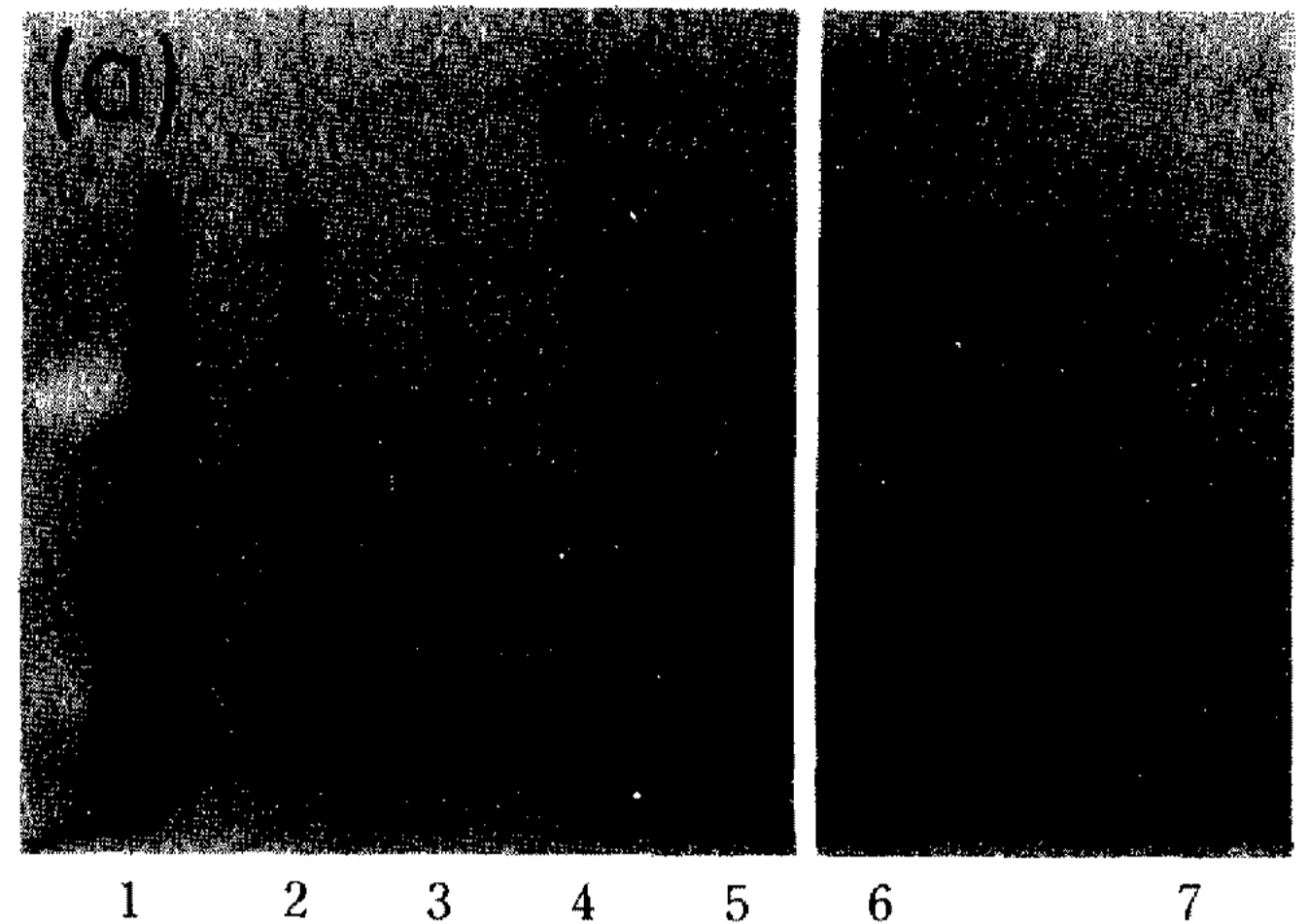


Fig. 1. Laurell-rocket immunoelectrophoresis of endoinulinase and exoinulinase.

Electrophoresis was performed in an agarose gel containing 2 mg of anti-endoinulinase serum. (a) Endoinulinase in lane 1, 2, 3, 4, 5 was 7, 5, 3, 1, 0.5 μ g, respectively. (b) Exo-inulinase in lane 6, 7 was 7, 5 μ g, respectively.

곰팡이 배양액을 농축시켜 정제된 항체에 대해 immunity를 볼 경우, endoinulinase 이외의 exoinulinases나 다른 단백질이 항체와 교차 특이성(cross-reactivity)를 보일 수 있다. 이러한 가능성을 확인하기 위하여 먼저 정제된 endoinulinase와 exoinulinase를 항원으로하여 rocket immunoelectrophoresis를 행하였다. 그 결과 endoinulinase는 0.5 μ g의 적은 양에서도 항체와 반응하여 rocket peak를 보였지만 정제된 exoinulinase의 경우는 7 μ g의 양에서도 endoinulinase에 대한 항체와 반응하지 않았다(Fig. 1). 즉, exoinulinase는 endoinulinase로 만들어진 항체(anti-endoinulinase serum)와 전혀 교차 반응성을 보이지 않아 두 효소의 아미노산 1차 서열은 크게 다른 것으로 추측된다. 또한 배양액 중에 존재하는 다른 단백질들과 endoinulinase 항체와의 비특이적 결합 가능성을 확인하기 위하여 먼저 *Aspergillus ficuum* ATCC 16882를 배양하였다. 이 ATCC 16882는 Novozyme 230(Novo A/S Denmark)의 제조에 쓰이는 균주로 이눌린 가수분해 효소를 가장 잘 분해하는 것으로 알려져 있다(10). 이 배양 상등액을 endoinulinase 항체가 결합된 immunoaffinity gel에서 chromatography를 행하였는데 pH 2.5의 glycine buffer에서 elution되는 단백질은 유일하게 endoinulinase 뿐이었다(Fig. 2). 즉, 만들어진 항체는 선택적으로 endoinulinase와만 결합할 뿐 배양액 중의 다른 성분들과는

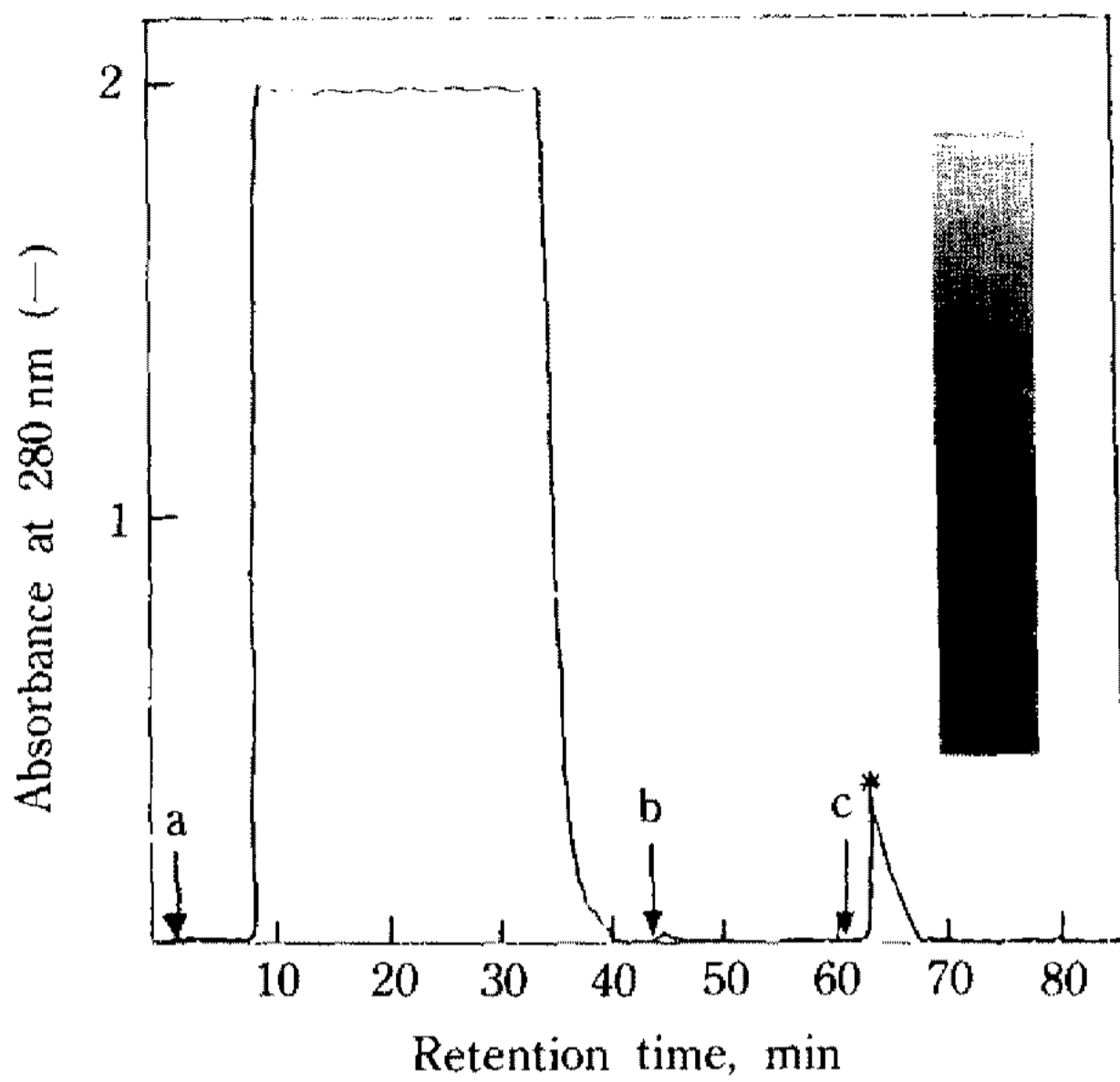


Fig. 2. Immunoaffinity chromatography of the filtrate of *Aspergillus ficuum* ATCC 16882.

Culture filtrate (150 ml) was loaded on the column and washed with (a) 0.01 M Tris-HCl (pH 8.0) containing 0.15 M NaCl, (b) 0.5 M Na-phosphate (pH 6.3) and (c) 0.05 M glycine-HCl (pH 2.5). Only endoinulinase (*) was eluted with buffer C. The inset shows SDS-PAGE of the affinity-purified endoinulinase (7 µg).

결합하지 않는 것을 의미한다. 따라서 우리는 적어도 이 항체가 ATCC 16882 type의 endoinulinase를 분비하는 균주의 검색에 적합하다는 것을 확인하였다.

Endoinulinase 생산균주의 검색

포집된 1,200여개의 곰팡이 균주에서 고체 배양시 균사체 증식이 왕성한 62개의 균주가 선별되었다. 이 균주들의 배양 농축액을 rocket immunoelectrophoresis한 결과, A-18로 분류된 한 곰팡이 균주가 다른 것들에 비해 높은 endoinulinase 함량 peak를 보였다 (Fig. 3). 비교 균주인 ATCC 16882와 그 peak 면적을 비교했을 때 2.8배가 컸으나 Coomassie Blue R-250에 의한 peak의 발색 강도는 ATCC 16882에 비해 낮았다. 이러한 결과는 두 균주가 분비하는 endoinulinase의 아미노산 서열이나 탄수화물 구성의 차이 때문인 것으로 보인다. 정량적으로 endoinulinase 함량을 결정하기 위하여 stationary phase 초기까지 배양한 A-18의 원심 상등액을 endoinulinase 항체가 결합된 Sepharose에 주입시켰다. Immunoaffinity 결과, 배양 상등액 m/당 0.5 µg에 해당하는 endoinulinase 활성을 보였으며 비교 균주인 ATCC 16882는 m/당 0.4 µg을 나타내었다. 즉, A-18은 ATCC 16882와 비

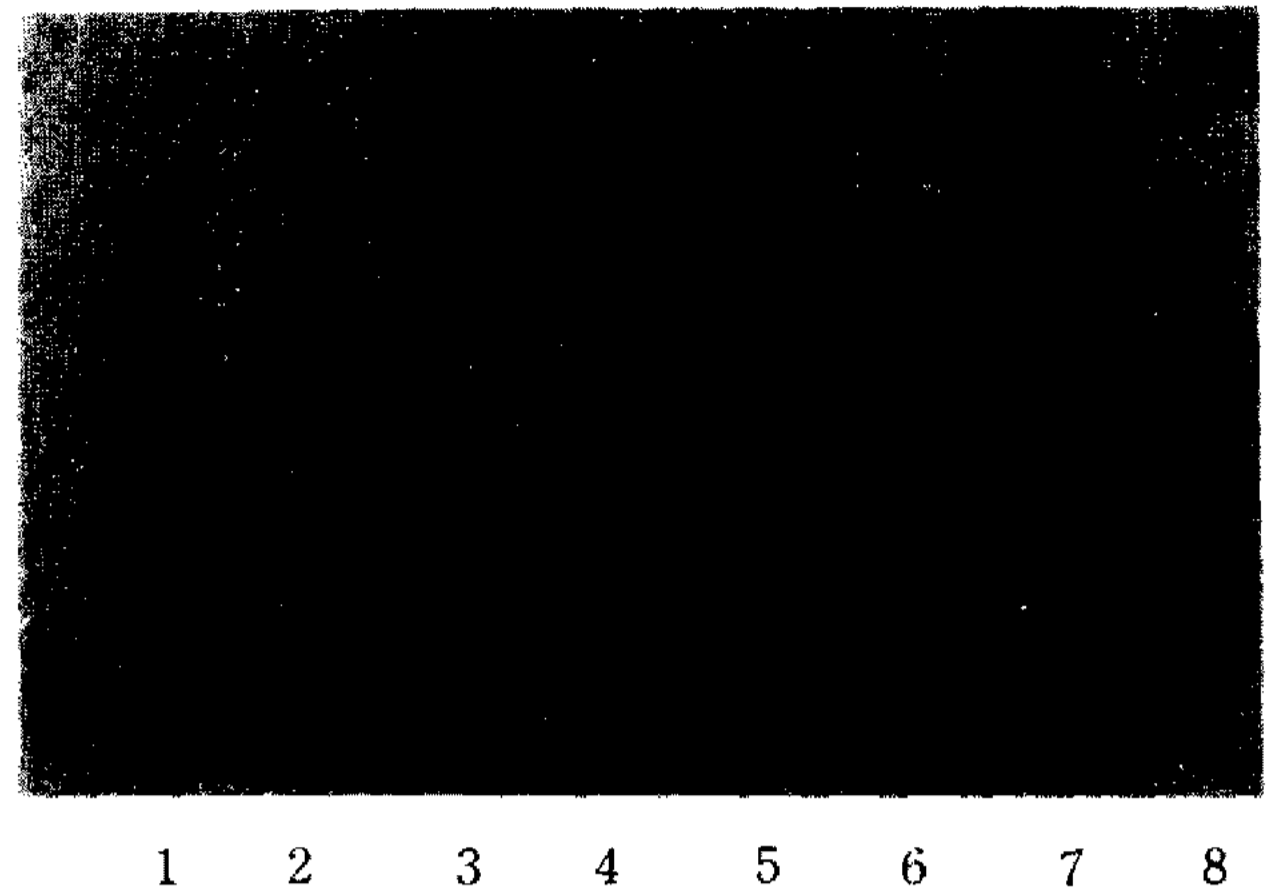


Fig. 3. Screening of the endoinulinase-producing strains by the rocket immunoelectrophoresis.

Lane 1: *Aspergillus ficuum* ATCC 16882, Lane 2: strain No. A-5, Lane 3: strain No. A-6, Lane 4: strain No. A-8, Lane 5: strain No. A-10, Lane 6: strain No. A-14, Lane 7: strain No. A-18, Lane 8: strain No. A-44.

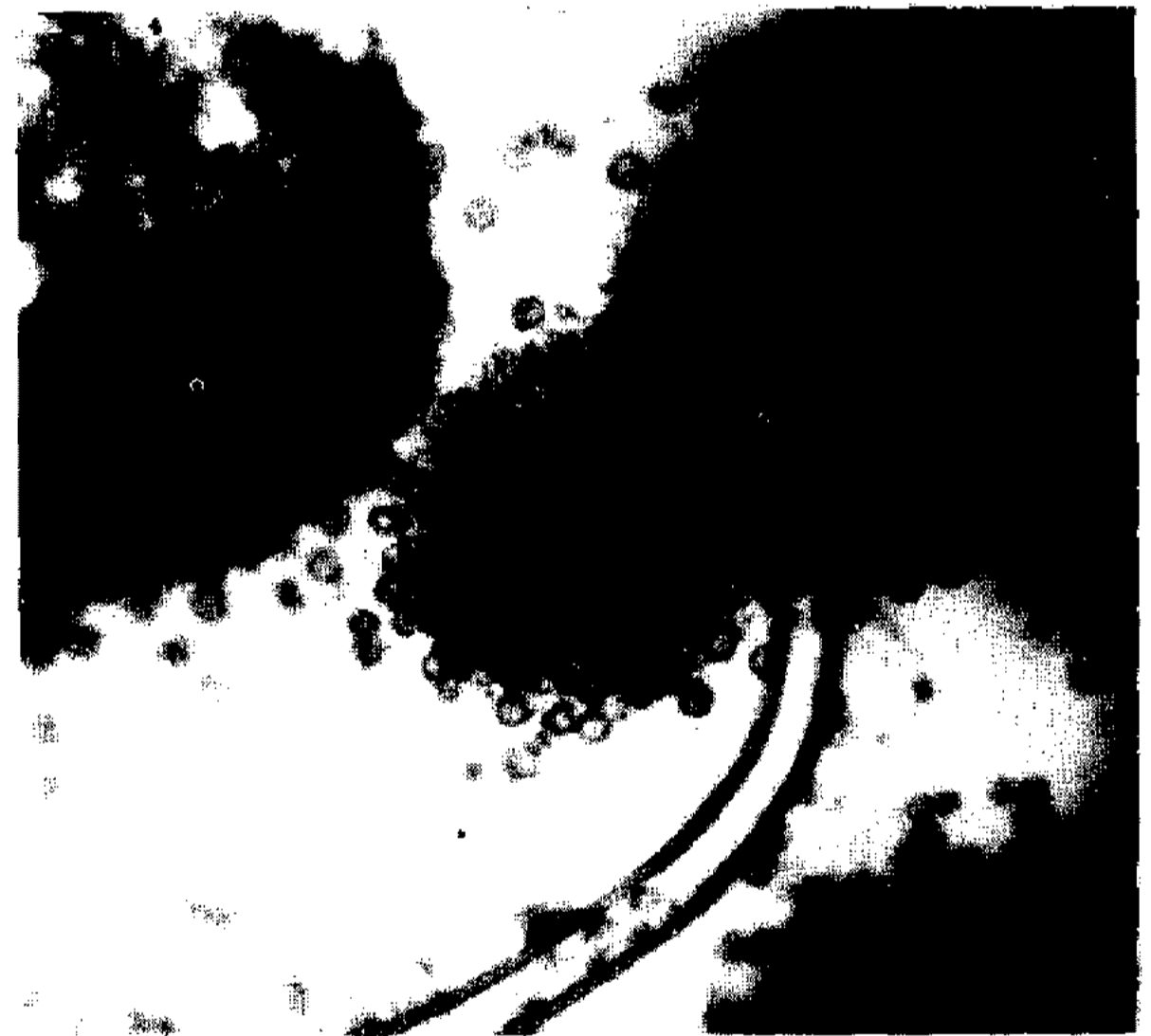


Fig. 4. Photography of an endoinulinase-producing fungal strain A-18.

교할만한 endoinulinase 생산균주로 생각된다. 또한 이늘린을 탄소원으로 하여 고체 배양했을 때 이 균의 포자는 검은 색을 띄었으며 현미경에서는 분생 포자병위에 둥근 모양의 정낭과 그 주위에 경자 및 분생 포자를 형성하였다(Fig. 4). 따라서, 형태학적으로는 *Aspergillus*속으로 추정되나 앞으로 더 많은 조사가 필요할 것이다.

요 약

Oligofructo당 생산에 이용될 수있는 endoinulinase

분석방법은 그 균주가 endo- 및 exoinulinase를 함께 내는 경우, 일반적인 환원당 분석법으로는 정량하기가 어려워진다. 이 실험에서는 endoinulinase만을 선택적으로 정량하기 위한 하나의 방법으로써 항체 분석법을 이용하였다.

Aspergillus niger ATCC 16882 조효소액을 CM-, DEAE ion exchange chromatography, pI 2.5~5에서 preparative isoelectric focusing, HPLC gel filtration을 통해 순수하게 endoinulinase를 정제하였고 이것을 토끼에 주사하여 endoinulinase에 대한 항체를 얻었다. DEAE-ion exchange 및 protein A에서 정제된 이항체는 immunoassay한 결과, exoinulinase가 아닌 endoinulinase와만 특이하게 반응하였고, immuno affinity chromatography 결과들은 배양액 중의 다른 단백질과 반응하지 않음이 확인되었다.

이눌린을 유일한 탄소원으로 한 배지에서 자란 1,200여개의 야생균주들로부터 배양 특성이 우수한 균주를 1차로 선별하고 이 균주들의 endoinulinase 함량을 rocket immunoassay를 통하여 조사하였다. 이 중 1개의 균주는 Novozyme의 ATCC 16882와 비교할만한 정도의 endoinulinase를 배양액 중에 분비함을 확인할 수 있었다.

감사의 말

본 연구는 1991년도 교육부 지원 한국학술진흥재단 지방대학 육성연구비에 의해 연구되었습니다. 그리고 Novozyme 230을 기꺼이 공여해 준 S. Pedersen (Novo A/S) 박사에게 감사를 드립니다.

참고문헌

1. Whistler, R.L. and C.L. Smart. 1953. *Polysaccha-*

- ride Chemistry*, Pp. 276-288. Academic Press, New York.
2. Bacon, J.S.D. and J. Edelman. 1951. The carbohydrates of the Jerusalem artichoke and other *Compositae*. *Biochem. J.* **48**: 114-126.
 3. Edelman, J. and T.G. Jefford. 1968. The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in *Helianthus tuberosus*. *New Phytol.* **67**: 517-531.
 4. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
 5. 한상배, 송근섭, 유향숙, 노민환, 이태규, 손희숙, 우순자, 엄태봉. 1991. *Aspergillus* 조효소액으로부터 Exoinulinase의 정제 및 특성. 한국산업미생물학회지 **19**: 253-258.
 6. 한상배, 유향숙, 노민환, 이태규, 손희숙, 우순자, 엄태봉. 1991. *Aspergillus* 조효소액으로부터 Endoinulinase의 정제 및 특성. 한국산업미생물학회지 **19**: 158-162.
 7. Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-251.
 8. Laurell, C.B. 1966. Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Anal. Biochem.* **15**: 45-52.
 9. Ettalibi, M and J.C. Baratti. 1987. Purification, properties and comparison of invertase, exoinulinase and endoinulinase of *Aspergillus ficuum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 13-20.
 10. Zittan, L. 1981. Enzymatic hydrolysis of inulinase. *Starch* **33**: 373-377.

(Received December 5, 1992)