

Aspergillus ustus GR-98이 생산하는 Dextranase의 정제

이종태* · 도재호 · 양재원 · 김찬조¹

한국인삼연구소 연구원 제품개발부, ¹충남대학교 식품공학과

Purification of Dextranase by *Aspergillus ustus* GR-98

Jong-Tae Lee*, Jae-Ho Do, Jae-Won Yang and Chan-Jo Kim¹

Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Taejon 305-345, Korea

¹Department of Food Technology, Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea

Abstract — The dextranase (EC 3.2.1.11) produced by *Aspergillus ustus* GR-98 was purified by the following sequential methods; salting-out and dialysis, gel filtration on BIO-GEL P-100, ion exchange chromatography on DEAE-cellulose, affinity chromatography on hydroxyapatite, and preparative electrophoresis. Three active fractions, dextranases I, II and III, were isolated in electrophoretically pure states, and specific activities of the dextranases were 1,276, 1,154 and 1,125 units/mg, the degrees of yield were 9.0, 3.6 and 2.2%, having 145, 131.1 and 127.8 times as those of culture filtrate in degree of purification, respectively. The enzyme purity was confirmed by the PAGE, SDS-PAGE and gel permeation-HPLC.

Dextranase(α -D-1,6-glucan 6-glucanohydrolase, EC 3.2.1.11)(1)는 dextran을 가수분해하는 효소이며, 여러종류의 곰팡이, 방선균, 세균, 신장, 간장, 소장 및 비장 등에 존재한다고 알려져 있다(2).

Dextranase의 정제에 관한 연구로는 Fukumoto 등(3), Sugiura 등(4) 및 Chaiet 등(5)은 *Penicillium* sp., Hanada 등(6), 이 등(7) 및 Hiraoka 등(8)은 *Aspergillus* sp., Hattori 등(9)은 *Chaetomium* sp., Barret 등(10)은 *Streptococcus* sp., Koenig 등(11)은 *Lipomyces* sp.이 생산하는 효소의 분리정제에 관하여 보고하였다. 상기 보고들에 의하면 미생물이 생산하는 dextranase는 분자량 및 등전점이 유사한 2종 이상의 isozyme 형태로 존재하는 것이 많은 것으로 알려져 있으며, 컬럼충진제로 Sepadex와 같은 dextran 유도체들을 사용하기 곤란한 점 등이 효소정제의 어려움이 되고 있다. 따라서 효소정제시 일반적으로 널리 사용하는 유안염석법, 유기용매 침전법, 겔여과법, 이온교환 chromatography 뿐만 아니라 친화 chromatography, 등전점 chromatography 및 preparative 전기영동법 등 여러가지 방법을 동원하여 정제하였다고 보고하였다. 본 연구에서는 전보(12)에서 분리, 동정 및 효소생산성을 검토한 *Aspergillus ustus* GR-98이

생산하는 dextranase를 분리, 정제하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주

본 실험에 사용된 균주는 전보(12)에서 분리, 동정한 *Aspergillus ustus* GR-98로, 전보(12)의 균주의 분리 및 보관용 배지에서 4주마다 계대배양하여 사용하였다.

배지 및 배양

전보(12)에서 검토한 효소생산 최적배지(2% dextran, 0.3% KNO₃, 0.02% MgSO₄·7H₂O, 0.05% K₂HPO₄, 0.05% KCl, 2.5 μ g/ml pyridoxamine and pH 7.0) 200 ml를 2 l 배양병에 주입하고 autoclave한 다음 선정 균주의 포자현탁액을 10 ml 씩 접종하여 30°C에서 7일간 정치 배양하였다.

Dextranase의 활성측정 및 단백질 정량

Dextranase의 활성은 전보(12)와 동일한 방법으로 측정하였으며, 단백질은 Lowry법(13)으로 bovine serum albumin을 표준 단백질로 하여 정량하였고 preparative electrophoresis 정제시의 단백질은 280 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

Key words: *Aspergillus ustus* GR-98, dextranase, purification

*Corresponding author

효소의 정제

염석 및 탈염 효소정제의 전 과정은 4°C의 냉장실에서 행하였다. 배양액을 Whatman No.41 여과지로 여과한 배양여액에 0.3 포화가 되도록 황산암모늄을 가하여 12시간 방치한 다음 14,000×g에서 20분간 원심분리하여 침전물을 제거하고 그 상층액에 황산암모늄을 0.8 포화가 되도록 가하여 12시간 방치시킨 후 14,000×g에서 20분간 원심분리하여 침전된 효소 단백질을 분리하였다. 이를 50 mM sodium phosphate 완충액(pH 7.0)에 녹여 반투막에 넣고 동일 완충액으로 12시간씩 3회 투석하여 황산암모늄을 제거하였다.

BIO-GEL P-100 겔 여과 유안 염석후 투석하여 농축시킨 조효소액을 50 mM sodium phosphate 완충액(pH 7.0)으로 평형화시킨 BIO-GEL P-100 column (26×860 mm)에 주입하고 20 ml/hr의 유속으로 10 ml 씩 분획하였다.

DEAE-cellulose column chromatography BIO-GEL P-100 겔 여과에서 효소활성을 나타내는 분획을 모아서 염석, 탈염 및 농축시키고 이를 5 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.2)으로 평형화시킨 DEAE-cellulose column(20×175 mm)에 주입하고 NaCl 0.1M까지 linear gradient하여 20 ml/hr의 유속으로 5 ml 씩 분획하였다.

Hydroxyapatite의 친화성 chromatography DEAE-cellulose column chromatography에서 효소활성을 나타내는 분획을 모아서 염석, 탈염 및 농축시키고 이를 10 mM MgCl₂가 함유된 10 mM potassium phosphate 완충액(pH 6.8)으로 평형화시킨 hydroxyapatite column(20% celite 함유, 20×100 mm)에 주입하고 potassium phosphate 완충액 50 mM까지 linear gradient 하여 13 ml/hr의 유속으로 5 ml 씩 분획하였다.

Preparative electrophoresis Hydroxyapatite의 친화성 chromatography에서 효소활성을 나타내는 분획을 모아서 염석, 탈염 및 농축시키고 이를 BIO-

RAD社의 Prep Cell(Model 491)을 사용하여 Table 1의 분리조건으로 3 ml 씩 분획하였다.

효소의 순도검증

Gel electrophoresis PAGE 및 SDS-PAGE는 Laemmli법(14)에 따라 pH 8.3의 완충액계에서 7.5% acrylamide를 중합시켜 well당 2 mA의 전류를 통하여 polyacryamide slab gel 전기영동한 후 0.125% Coomassie brilliant blue R-250으로 30분간 염색하고 탈색액 I 및 II로 탈색시켜 밴드를 확인하였다. SDS PAGE용 시료는 0.125M Tris-HCl(pH 6.8), 4% SDS, 20% glycerol, 10% β-mercaptoethanol 혼합용액에 동량의 정제효소를 가한 후 비등수에 2분간 끓인 다음 냉수에 식혀 조제하였고, 상기와 같은 방법으로 전기영동한 다음 염색 및 탈색시켜 밴드를 확인하였다.

HPLC Protein I-125(300×7.8 mm ID, Waters) 컬럼이 부착된 Waters社의 HPLC(510 pump system)를 사용하여 분석하였으며, 50 mM sodium phosphate 완충액(pH 7.0)을 용매로 하여 0.5 ml/min의 유속으로 용출시켰다.

결과 및 고찰

효소의 정제

염석 및 탈염 *Aspergillus ustus* GR-98을 효소생산 최적배지조성에 접종하여 30°C, 7일간 정치배양한 후 그 배양여액을 회수하고 이를 30~80% 염석 및 탈염하였다. 염석 및 탈염과정에서 얻은 효소분획의 dextranase 활성은 비활성으로 나타내어 32 units/mg이며, 수율은 77%, 정제도는 3.6으로 계산되었다.

BIO-GEL P-100에 의한 겔 여과 황산암모늄 염석후 투석한 효소액을 Minitan system(Millipore社)을 사용하여 한외여과법으로 농축시킨 다음 농축액을 50 mM sodium phosphate 완충액(pH 7.0)으로 평형화시킨 BIO-GEL P-100 column에 주입하고 겔여과하였다. 그 결과 Fig. 1과 같이 3개의 단백질 분획을 얻었으며, dextranase 활성분획은 어느 단백질 분획과도 일치하지 않았다. 따라서 효소활성분획만을 모아서 염석, 투석 및 농축시킨 후 다음 과정의 시료로 사용하였다. 효소활성분획의 비활성은 111 units/mg, 수율은 57%, 정제도는 12.6이었다.

DEAE-cellulose에 의한 이온교환 chromatography 겔여과에서 얻은 효소활성분획을 5 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.2)으로 평형화시킨 DEAE-cellulose 컬럼에 주입하고 NaCl을 0~0.1M의 농도구배법으로 용출시킨 결과는 Fig. 2와 같다. 효소활성분획은 상기

Table 1. Separation condition of Model 491 Prep Cell

| | |
|--------------------|---------------------------------------|
| Gel composition | 5% Acrylamide |
| Gel height | 8 cm |
| Gel size | 28 mm ID |
| Sample load | 6 mg total protein |
| Running conditions | 40 mA constant current (250~350 V) |
| Elution speed | 0.35 ml/min. |
| Running time | 24 hr |

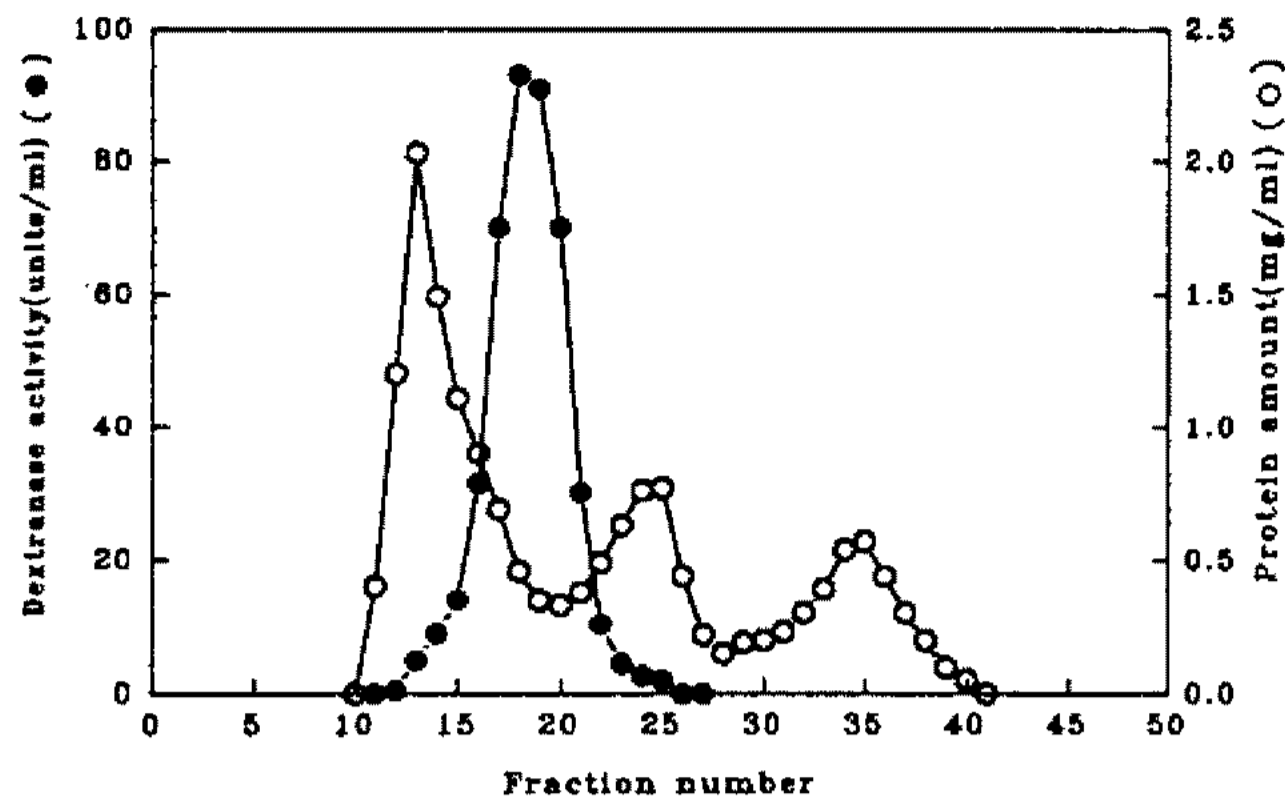


Fig. 1. Gel filtration of a crude dextranase preparation from *Asp. ustus* on Bio-Gel P-100.
The column was stabilized with 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0).
The elution, at a flow rate of 20 ml/hr, was performed with the same buffer and 10 ml fractions were collected.

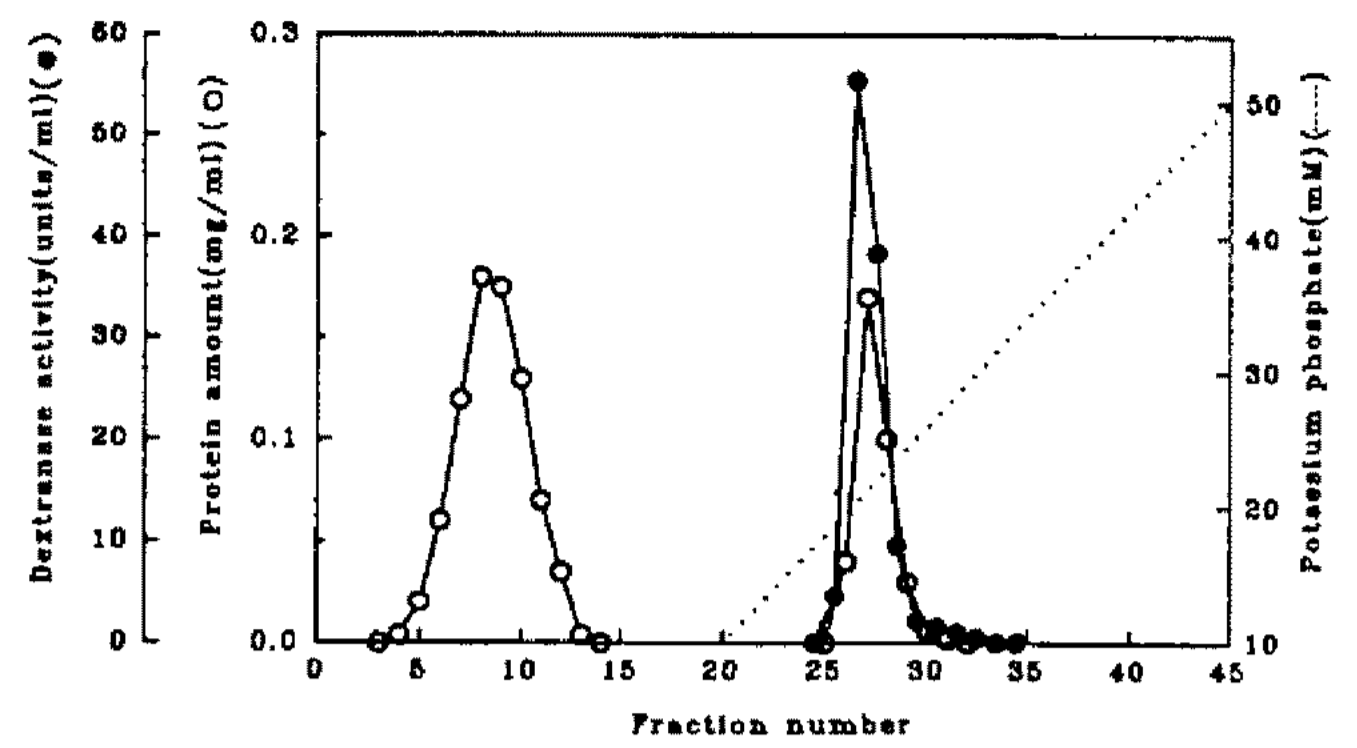


Fig. 3. Affinity chromatography of *Asp. ustus* dextranase on hydroxyapatite column.
The column was equilibrated with 10 mM potassium phosphate buffer (pH 6.8).
The enzyme absorbed was eluted by a linear gradient of potassium phosphate concentration at a flow rate of 13 ml/hr and 5 ml fractions were collected.

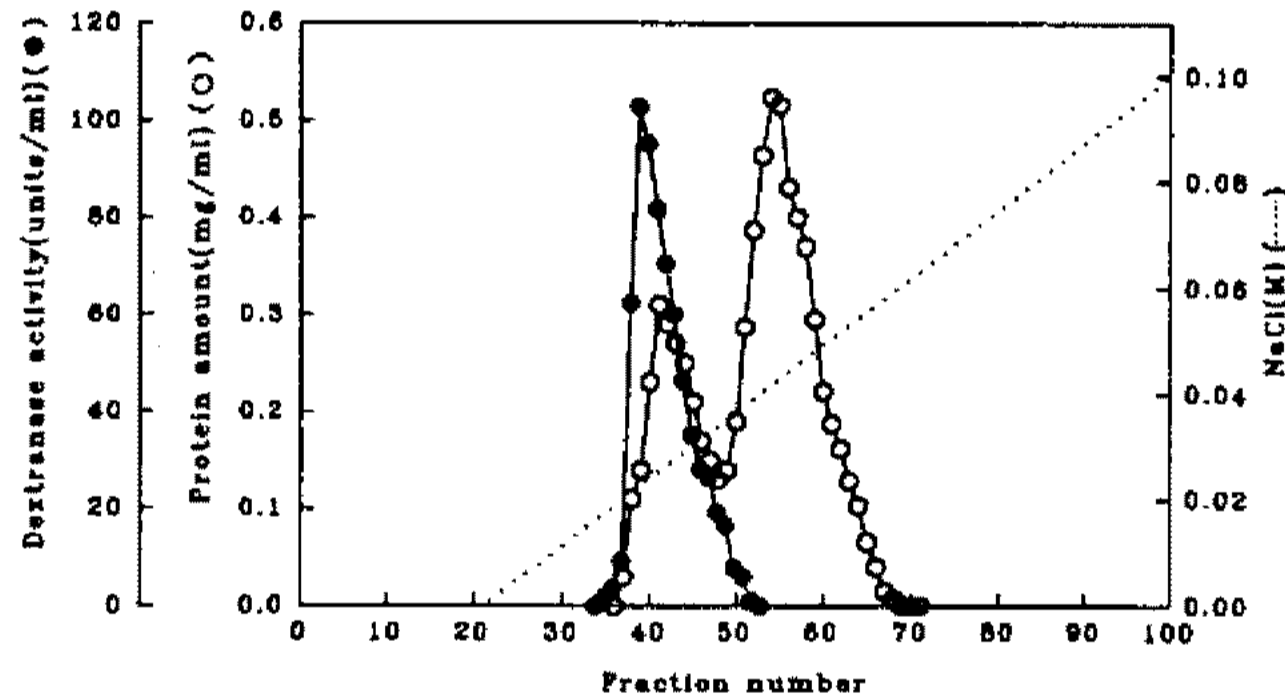


Fig. 2. Ion exchange chromatography of *Asp. ustus* dextranase on DEAE-cellulose column.
The column was equilibrated with 5 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2).
The enzyme absorbed was eluted by a linear gradient of NaCl concentration of a flow rate of 20 ml/hr and 5 ml fractions were collected.

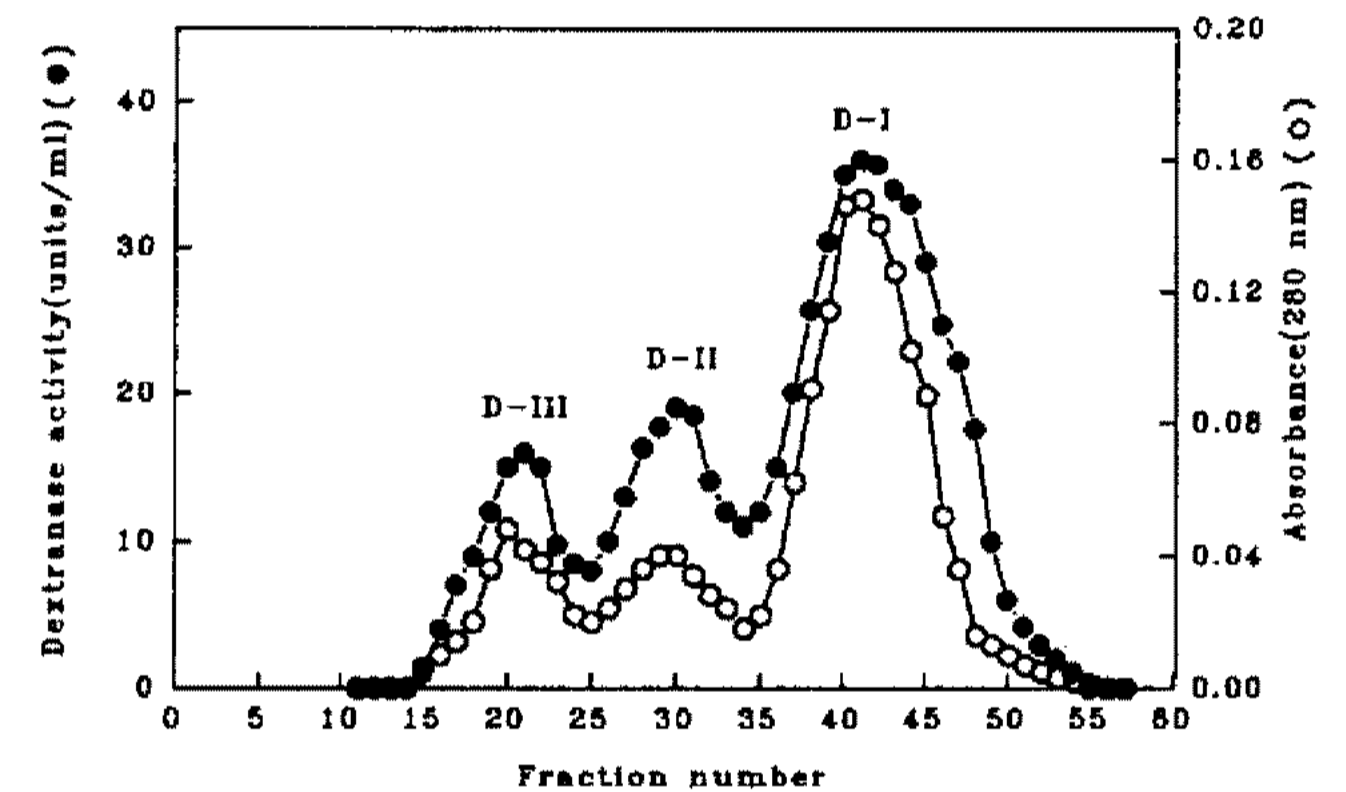


Fig. 4. Preparative electrophoresis pattern of *Asp. ustus* dextranase.
The crude enzyme (about 6 mg protein) obtained from hydroxyapatite column chromatography was applied to preparative electrophoresis on 5% acrylamide gel at 4°C for 24 hrs and 3 ml fractions were collected.

조건에서 DEAE-cellulose 칼럼에 흡착되었으며 NaCl 0.02M 부근에서 용출되었다. 효소활성분획의 비활성은 294 units/mg, 수율은 36%, 정제도는 33.4이었다.

Hydroxyapatite에 의한 친화성 chromatography DEAE-cellulose 이온교환 chromatography에서 얻은 효소활성분획을 염석, 탈염 및 농축시키고 이를 10 mM MgCl₂가 함유된 10 mM potassium phosphate 완충액(pH 6.8)으로 평형화시킨 hydroxyapatite(20% celite 함유) 칼럼에 흡착시켜 동일 완충액으로 10~50 mM 농도구배법으로 용출시킨 결과는 Fig. 3과 같다. 비흡착부위 및 흡착부위에서 1개씩 2개의 단백질분획을 얻었으며 효소활성은 흡착분획에서 나타났고, 완충용액 20 mM 농도 부근에서 용출되었다. 단백질분획과 효소활성분획이 거의 일치하여 이를 PAGE한

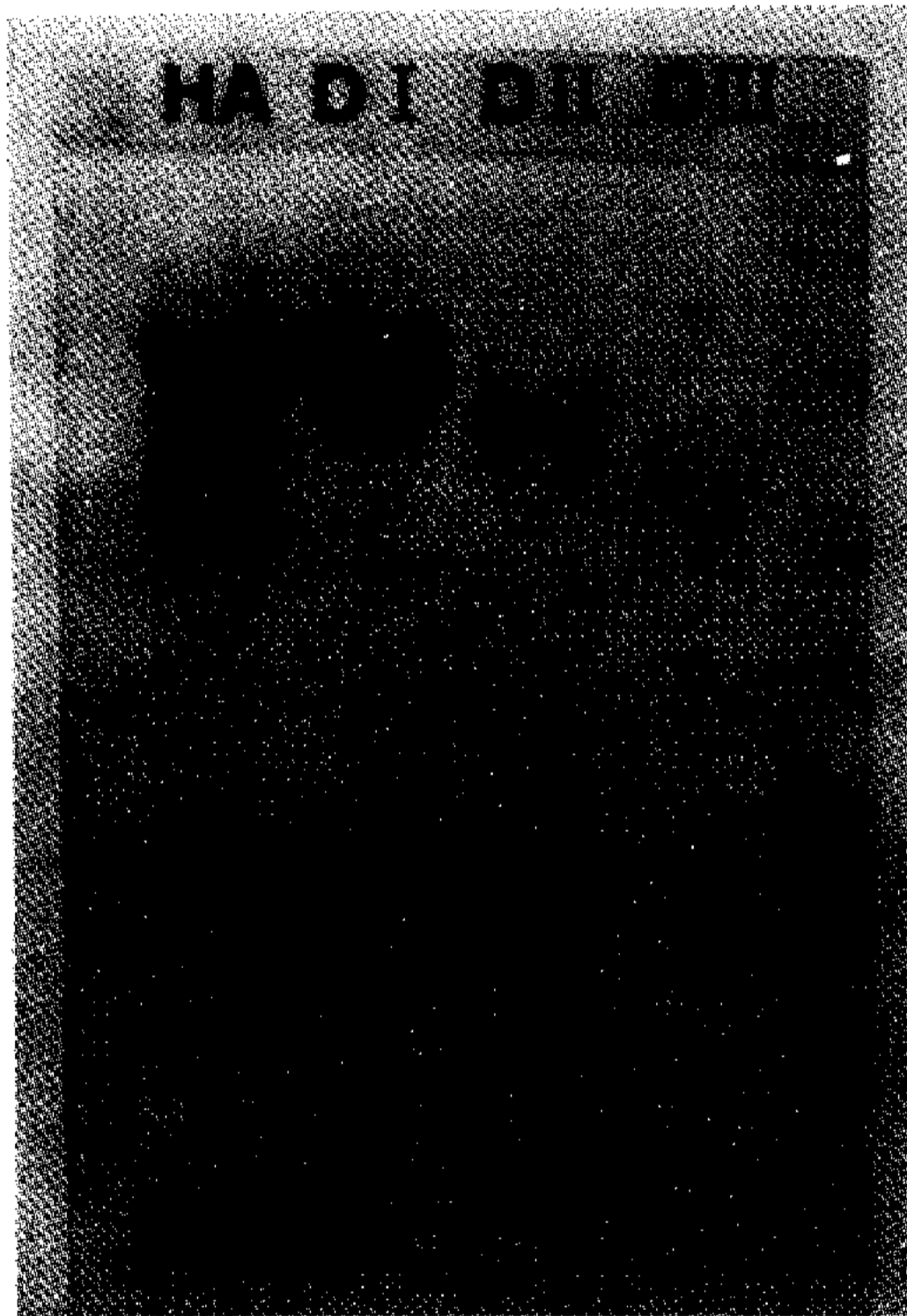
결과 3개의 band가 확인되었다. 친화성 chromatography 결과 비활성은 792 units/mg, 수율은 23%, 정제도는 90.0이었다.

Preparative electrophoresis 친화성 chromatography에서 얻은 효소활성분획을 염석, 탈염 및 농축시키고, Prep Cell을 사용하여 전기영동법에 따라 분리 정제한 결과는 Fig. 4와 같다. 단백질분획 및 효소활성분획은 3개의 분획 즉, dextranase I, II, III로 분리되었으며 dextranase I은 비활성 1,276 units/mg, 수율 9.0%, 정제도 145이었고, dextranase II는 비활성 1,154 units/mg, 수율 3.6%, 정제도 131.1이었으며, dextranase III는 비활성 1,125 units/mg, 수율 2.2%, 정제도 127.8이었다.

Hattori 등(9)은 *C. gracile* 효소의 정제에서 dextra-

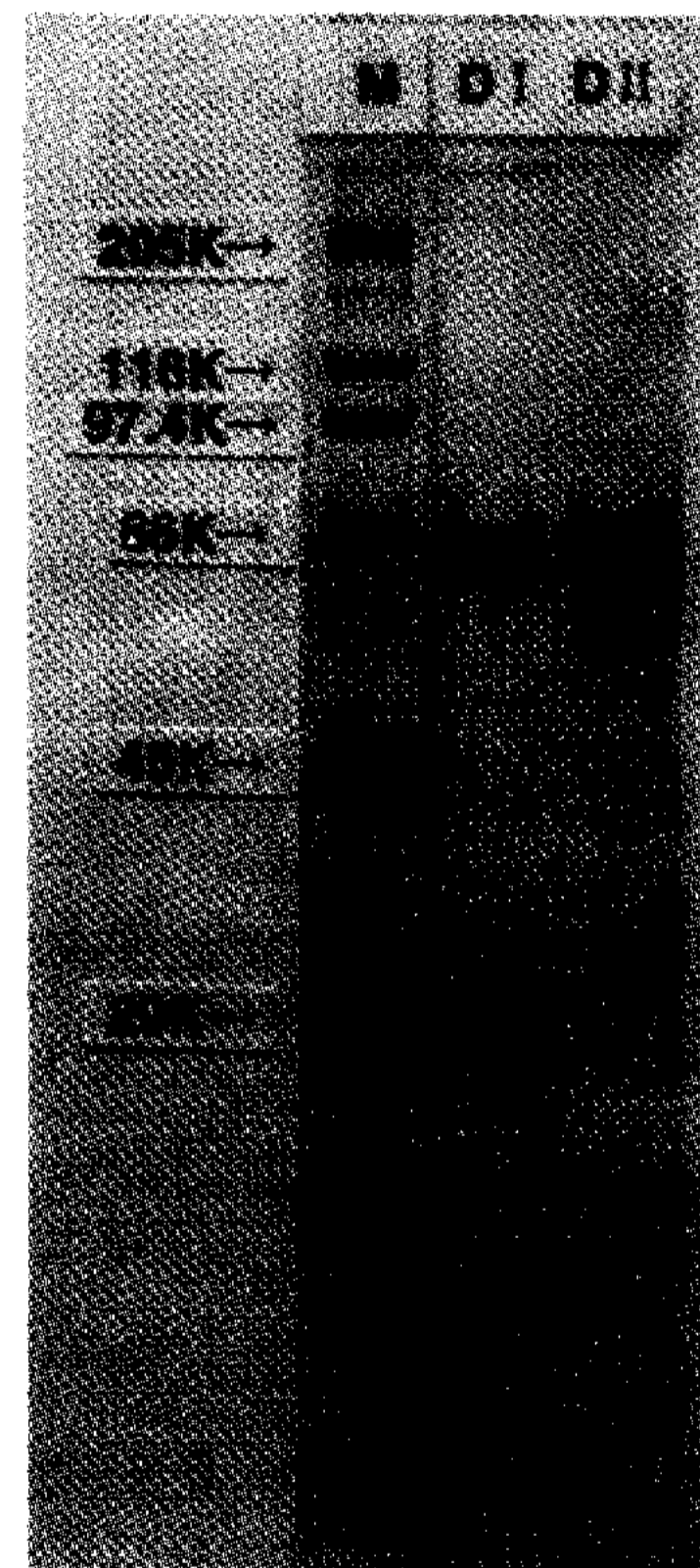
Table 2. Summary on purification of dextranase from the culture filtrate of *Aspergillus ustus* GR-98

| Procedure | Volume (ml) | Total protein (mg) | Total activity (units) | Specific activity (units/mg) | Recovery (%) | Purification factor (fold) |
|---------------------------------|-------------|--------------------|------------------------|------------------------------|--------------|----------------------------|
| Culture filtrate | 8,800 | 4,650 | 41,100 | 8.8 | 100 | 1.0 |
| Salting out and dialysis | 880 | 1,000 | 31,600 | 32 | 77 | 3.6 |
| Gel filtration on BIO-GEL P-100 | 270 | 210 | 23,300 | 111 | 57 | 12.6 |
| DEAE-cellulose chromatography | 150 | 50 | 14,700 | 294 | 36 | 33.4 |
| Hydroxyapatite chromatography | 70 | 12 | 9,500 | 792 | 23 | 90.0 |
| Preparative electrophoresis | | | | | | |
| Dextranase I | 10 | 2.9 | 3,700 | 1,276 | 9.0 | 145.0 |
| Dextranase II | 10 | 1.3 | 1,500 | 1,154 | 3.6 | 131.1 |
| Dextranase III | 10 | 0.8 | 900 | 1,125 | 2.2 | 127.8 |

**Fig. 5. Polyacrylamide gel electrophoresis patterns of *Aspergillus ustus* dextranase I, II and III.**

HA, after hydroxyapatite column chromatography; DI, dextranase I; DII, dextranase II; DIII, dextranase III. Electrophoresis was done with 7.5% polyacrylamide in 25 mM Tris-glycine buffer (pH 8.8).

nase I 및 II를 분리하였으며, 수율은 7.7%, 3.4%이었고, Sugiura 등(4)은 *P. funiculosum*, Hiraoka 등(8)은 *A. carneus* 효소의 정제에서 isoelectrofocusing에 의해 dextranase I 및 II를 분리하였고, 수율은 10% 이하이었다. Hanada 등(6), 이(7) 등은 *A. ustus* 효소의 정제에서 단일정제효소를 얻었다고 보고하였으나 GR-98 균주가 생산하는 dextranase는 3개의 효소활

**Fig. 6. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis patterns of *Aspergillus ustus* dextranase I and II.**

M, marker; DI, dextranase I; DII, dextranase II. Electrophoresis was done with 7.5% polyacrylamide in 25 mM Tris-glycine buffer (pH 8.8).

성분확을 가지는 것으로 나타났다. 3개의 분획중 dextranase III는 수율이 아주 낮아 제외하였다.

이상의 정제과정을 요약하면 Table 2와 같다.

정제효소의 순도시험

정제효소 dextranase I과 II를 PAGE 및 SDS-PAGE로 확인한 결과 Fig. 5, 6에서와 같이 단일 밴

참고문헌

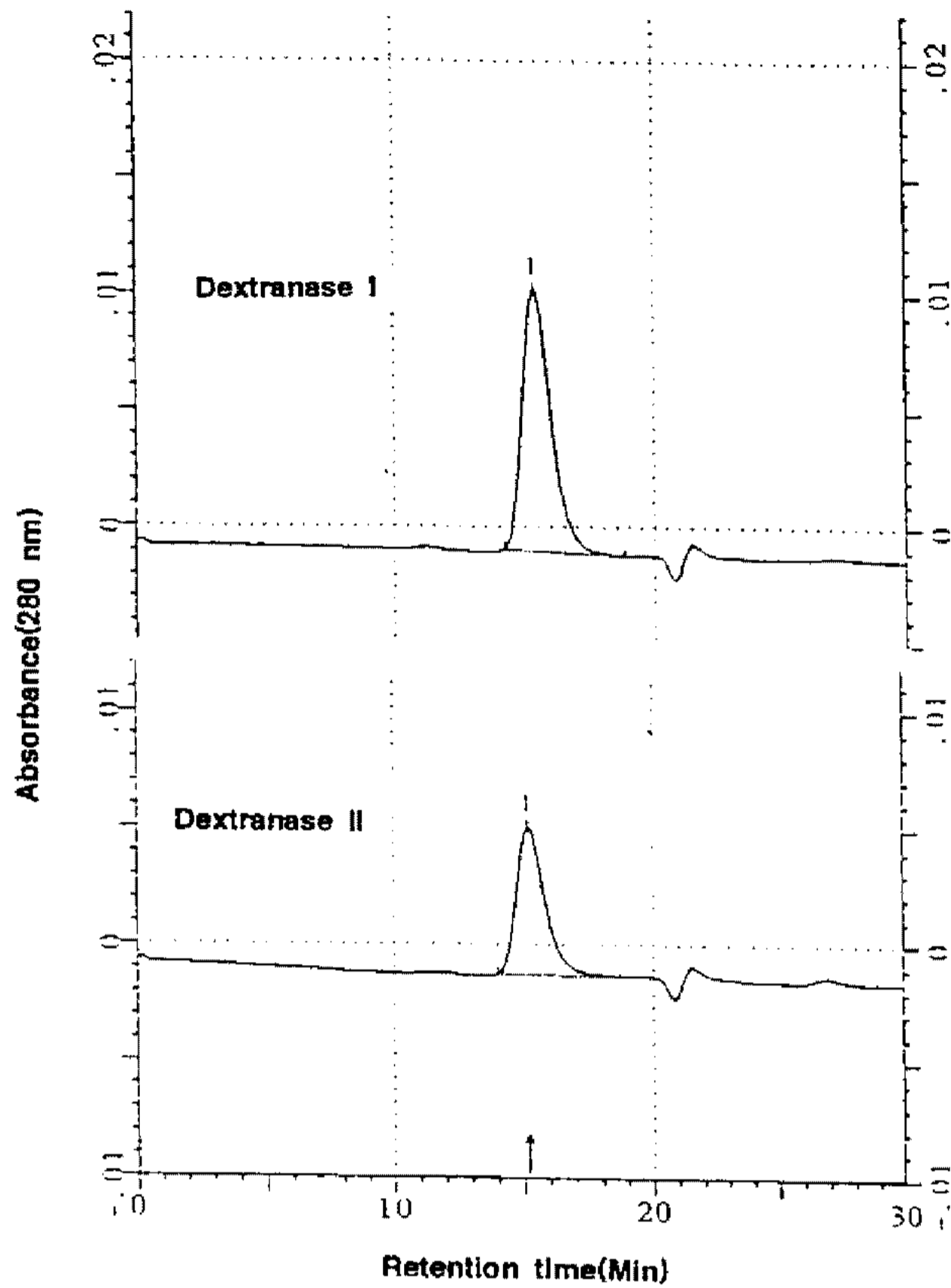


Fig. 7. HPLC chromatograms of *Aspergillus ustus* dextranase I and II.

Column: protein I-125 (300×7.8 mm ID), elution solvent: 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), flow rate: 0.5 ml/min.

드를 나타내어 전기영동에서 균일성을 확인하였고, HPLC 분석에 의해서도 Fig. 7과 같이 좌우대칭의 단일 peak를 얻었다. 따라서 정제효소 dextranase I과 II는 전기영동 및 HPLC에 의해 순수함을 확인하였다.

요 약

Aspergillus ustus GR-98로부터 dextranase를 생산한 후 효소를 정제하였다. Dextranase는 배양여액으로부터 30~80% 황산암모늄분획, BIO-GEL P-100에 의한 gel 여과, DEAE-cellulose column chromatography, Hydroxyapatite column chromatography 및 Preparative electrophoresis에 의해 정제한 결과 순수한 효소 3종(dextranase I, II, III)을 얻었다. Dextranase I, II, III의 비활성도는 각각 1,276, 1,154, 1,125 units/mg이었고, 수율은 9.0, 3.6, 2.2%, 정제도는 145, 131.1, 127.8배였다. 정제효소는 PAGE, SDS-PAGE 및 Protein I-125 칼럼을 사용한 HPLC에 의하여 순수함을 확인하였다.

1. Barman, T.E. 1969. *Enzyme Handbook*, Vol 2, Pp. 569-569. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.
2. 漆貞正. 1983. 데키스트라나-제. *日本農藝化學會誌* 57: 155-166.
3. Fukumoto, J., H. Tsuji, and D. Tsuru. 1971. Studies on mold dextranases, I. *Penicillium luteum* dextranase: Its production and some enzymatic properties. *J. Biochem.* 69: 1113-1121.
4. Sugiura, M., A. Ito, T. Ogiso, K. Kato, and H. Asano. 1973. Studies on dextranase, Purification of dextranase from *Penicillium funiculosum* and its enzymatic properties. *Biochem. Biophys. Acta* 309: 357-362.
5. Chaiet, L., A.J. Kempt, R. Harman, E. Kaczka, R. Weston, K. Nollstadt, and F.J. Wolf. 1970. Isolation of a pure dextranase from *Penicillium funiculosum*. *Appl. Microbiol.* 20: 421-426.
6. Hanada, K., A. Hirose, and E. Ninomiya. 1974. Some properties of the purified dextranase (Studies on the dextranase produced by *Aspergillus ustus* 237 Part II). *Nippon Nôgeikagaku Kaishi* 48: 21-26.
7. 이건주, 이형환. 1983. *Aspergillus ustus*가 생산하는 exo-dextranase의 정제에 관한 연구. *한국균학회지* 11: 23-26.
8. Hiraoka, N., J. Fukumoto, and D. Tsuru. 1972. Studies on mold dextranases: III. Purification and some enzymatic properties of *Aspergillus carneus* dextranase. *J. Biochem.* 71: 57-64.
9. Hattori, A., K. Ishibashi, and S. Minato. 1981. The purification and characterization of the dextranase of *Chaetomium gracile*. *Agric. Biol. Chem.* 45: 2409-2416.
10. Barrett, J.F., T.A. Barrett, and R. Curtiss III. 1987. Purification and partial characterization of the multicomponent dextranase complex of *Streptococcus sobrinus* and cloning of the dextranase gene. *Infect. Immun.* 55: 792-802.
11. Koenig, D. and D. Day. 1989. The purification and characterization of a dextranase from *Lipomyces starkeyi*. *Eur. J. Biochem.* 183: 161-167.
12. 이종태, 이동희, 광이성, 김영호, 성현순, 김찬조. 1995. Dextranase 생산균주의 분리, 동정, 및 효소 생산. *한국산업미생물학회 투고중.*
13. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randal. 1951. Proteins by sephadex gel filtration. *Biochem. J.* 91: 222-233.
14. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structure proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

(Received 8 March 1995)