

Arthrobacter sp가 생산하는 Inulinase의 정제 및 성질

임성일* · 이대희 · 홍석산 · 김현규 · 유진영
한국식품개발연구원 생물공학연구본부

Purification and Properties of an Inulinase Produced by *Arthrobacter* sp. Lim, Seong-II*, Dae-Hee Lee, Seok-San Hong, Hyun-Kyu Kim, and Jin-Young Yoo. Division of Food Biotechnology, Korea Food Research Institute, San 46-1, Baekhyundong, Songnam, Kyonggido 463-420, Korea - The inulinase producing microorganism was isolated from soil and tentatively identified as *Arthrobacter protophormiae/ramosus*. Inulinase was purified by ethanol precipitation, DEAE-Sephadex ion exchange chromatography and Sephadex gel filtration chromatography. The molecular weight of the purified enzyme was 34 kDa. The specific activity, yield and purity were 31.5 Unit/mg, 19.5% and 18.5 fold, respectively. Optimal pH and temperature for reaction of the purified inulinase were 8.5 and 55°C, respectively. The enzyme was stable at pH 7.5, below 55°C, and the activity was stimulated Mg^{2+} .

Key words: *Arthrobacter*, inulinase, purification

Inulin (2,1 β -D-fructofuran)은 말단부에 glucose를 가지며 20-30개의 fructose로 이루어진 linear polymer로서 *Heliantus tuberosus* (topinambur), *Dahlia*와 *Chicorium intybus* (68-86% dw)에 다량 함유되어 있다[4]. Fructose 시럽은 inulin의 산 또는 효소적 가수분해에 의해 얻을 수 있다. 전지는 화학적 처리로서 강한 산과 온도 조건하에서 행해지는데 원하지 않는 색과 향기의 시럽이 생성된다. 후자는 미생물 유래의 inulinase에 의한 효소적 가수분해로서 온화한 조건으로 높은 가수분해 산물을 얻을 수 있다[14].

Fructan 분해효소는 크게 exo-enzyme (E.C.3.2.1.80, 3.2.1.26, invertase), endo-enzyme (E.C.3.2.1.7) 및 inulin fructotransferase (E.C.2.4.1.93)로 나눌 수 있다[23]. 이들 효소의 개발 및 올리고당 합성에 대한 연구로는 Cheetham 등[2]에 의해 *Bacillus subtilis*가 생산하는 과당 전이효소를 이용하여 α -1,2 결합의 이당류로부터 과당을 전이시켜 xylosucrose, galactosucrose 및 6-deoxysucrose를 제조하는 공정에 대하여 연구된 바 있고, Saha 등[26]은 고온성 *Bacillus*에서 생산된 α -amylase와 비슷한 성질을 지닌 효소를 분리한 바 있으며 이 효소에 의해 액화 전분으로부터 생산되는 물질이 여러 가지 중합도를 가진 올리고당임을 확인한 바 있다. 또한 Kimura 등은 *Pseudomonas*의 exo-maltotetrahydrolase와 *Klebsiella*의 pullulanase를 이용하여 올리고당을 생산하는 방법으로 효율을 높이기 위한 방안으로 담체효소 결합을 시도하여 연속공정을 개발하였다[9-11]. 이와 같은 고정화 방법에 대하여는 Kimura도 *Pseudomonas stutzeri*에서 생산

되는 α -amylase를 이용하여 말토테트라오스를 생산하고자 하였다[11]. 국내에서는 몇몇 미생물 유래의 inulinases에 대해서 많은 연구가 이루어지고 있으나, 이들 대부분은 inulinase 관련 효소의 분리 및 특성에 치중되어 있으며, 세포의 inulinase의 특성과 정제에 관해서도 일부 보고된 바 있다[6,8,13,17].

많은 연구자들이 inulin 관련 효소를 찾고자 노력하였지만 보다 산업화 지향적인 연구와 우수한 효소의 탐색이 지속되어야 할 것으로 판단된다. 이와 같은 노력의 일환으로 전보[18]에서 inulinase의 응용을 목적으로 마늘, 양파, 더알리아 및 주변의 토양으로부터 inulinase 활성이 높고 다양한 중합체를 만드는 *Arthrobacter protophormiae/ramosus* 96-11 균주를 분리하고 동정하였으며 inulinase의 최적생산 조건에 대하여 연구한 바 있다. 본 연구에서는 96-11 균주가 생산하는 inulinase를 정제하고 정제 inulinase의 효소적 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

공시균주

전보[18]에서 잠정 동정한 *Arthrobacter protophormiae/ramosus* 96-11 균주를 공시균주로 하였다.

효소생산

전보[18]의 inulinase 최적 생산 조건을 바탕으로 먼저 100 mL의 stock soln. I [K_2HPO_4 (2.8 mM), KH_2PO_4 (12.8 mM), Na_2SO_4 (11.5 mM), $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (9.55 mM), $MnCl_2 \cdot 6H_2O$ (50.5 μ M)]과 1 mL의 stock soln. II [$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (10 μ M), $FeCl_3 \cdot 2H_2O$ (90 μ M)/50%의 HCl 원액]를 NH_4Cl

*Corresponding author

Tel. 82-342-780-9277, Fax. 82-342-780-9265

E-mail: silim@kfri.re.kr

1.07 g과 섞고 증류수를 가한 다음 1 L로 정용하고 pH를 7.5으로 맞춘 무기염류 기초배지에 각 1%의 inulin과 tryptone, NH₄Cl를 첨가한 inulinase 생산배지에 공시균주를 접종하여 30°C에서 48시간 배양하여 inulinase를 생산하였다.

단백질의 정량

단백질의 정량은 Lowry 방법[19] 및 Bradford 방법[1]에 준하여 측정하였다. Lowry 방법은 효소액과 Biuret 시약 (Sigma), Folin & Ciocalteus phenol 시약 (Sigma)을 섞어 30분간 방치한 후 725 nm에서 흡광도를 측정하고 표준단백질 (Sigma)과 비교하여 정량하였다. Bradford 방법은 조효소액과 Bradford 시약을 섞어 흡광도를 측정한 후 표준단백질 (Bio-rad)과 비교하여 정량하였다.

Inulinase 활성 측정

Inulinase는 반응기질로서 inulin의 2,1-결합을 분해하여 여러 가지 올리고당과 β-D-fructose의 중합체를 만든다. 따라서 이때 생성되는 환원당들의 농도를 정량하여 역가를 측정하였다. 즉 50 mM 인산 완충용액 (pH 7.0)에 inulin을 녹인 2% inulin 기질에 효소액 0.5 mL을 가하여 45°C에서 30분간 반응시킨 후 생성된 환원당 함량을 DNA법[3]으로 측정하였다. 효소단위는 효소액 1 mL가 inulin를 가수분해하여 분당 1 μM의 환원당을 생성할 때를 1 unit로 하였다. 이때 표준물질은 glucose를 사용하였다.

Inulinase의 정제

먼저 액체배지를 사용하여 96-11균주를 inulinase 최적생산배지를 이용하여 30°C에서 48시간 배양한 후, 원심분리하여 상등액을 조효소액으로 하였다. 조효소액으로부터 단백질을 농축하기 위하여 에탄올 농도를 60-80%로 가하고 4°C에서 2시간 방치한 후, 7000 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 침전물을 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)로 해시키고, 동일 완충액으로 18시간 투석, 동결건조하였다. 동결건조된 효소를 상기 buffer로 용해시킨 다음 DEAE-sephadex A-50 컬럼 (2.5 × 30 cm)에 주입하고 흡착된 단백질을 0~1 M NaCl로 1 mL/min의 유속으로 용출하여 얻어진 분획 (5 mL)들은 활성측정 후 활성 분획물을 모아 다시 동결건조하였다. 활성분획물은 다시 Sephadex G-50 컬럼 (1.6 × 60 cm)을 이용하여 1 mL/min의 유속으로

gel filtration chromatography를 실시하였다.

Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)

정제된 inulinase의 분자량을 측정하기 위하여 젤농도 12.5%로 전기영동을 행하였다. 전기영동 후 밴드의 확인은 coomassie brilliant blue R-250으로 염색하여 확인하였다. 표준물질은 Sigma사의 전기영동용 표준단백질 marker로서 trypsinogen (24 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (36 kDa), egg albumin (45 kDa), bovine albumin (66 kDa)를 사용하였다.

Inulinase의 특성

작용 최적온도는 30°C~60°C의 각 온도에서 효소와 기질을 반응시켜 측정하였으며 열안정성은 효소를 45°C~60°C의 온도에서 0~120분간 처리한 후, 기질과 반응시켜 조사하였다. pH에 대한 영향은 Britton Robinson buffer (pH 5~9)를 사용하여 측정하였는데 작용 최적 pH는 기질 용액의 pH를 5.0에서 9.5까지 각각 조정한 후 효소를 가하여 일정시간 반응시켜 조사하였고, pH 안정성은 각 pH의 완충용액 1 mL에 효소를 첨가하여 4°C에서 1시간 처리한 후 기질을 혼합하여 반응시켜서 측정하였다. Inulinase의 각종 금속이온과 mercaptoethanol, EDTA에 대한 영향은 최종농도가 1 mM이 되게 효소액과 혼합한 후, 30°C에서 1시간 반응시킨 후 잔존 활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

Inulinase의 정제

Arthrobacter protophormiae/ramosus 96-11 균주가 분비하는 inulinase를 정제하기 위하여 먼저 에탄올을 이용한 침전 방법을 사용하였다. 에탄올의 농도를 결정하기 위하여 에탄올 농도를 달리하여 시험한 결과 60-80%의 에탄올 농도에서 가장 높은 활성이 검출되어 조효소액의 에탄올 최종농도를 60-80%로 조정하여 단백질을 침전시켜 농축하였다. 이때 약 2배의 정제효과가 있었으나 효소의 회수율은 약 40%이었다 (Table 1).

에탄올 침전법으로 얻어진 효소를 DEAE Sephadex A-50에 흡착시켜 0~1.0 M의 NaCl 용액으로 용출시킨 결과는

Table 1. Summary of purification of inulinase from *Arthrobacter protophormiae/ramosus*.

Step	Total activity (Unit)	Total protein (mg)	Specific activity (Unit/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Crude Enzyme	1,425	852	1.67	100.0	1.00
60-80% Ethanol Precipitation	564	181	3.12	39.6	1.87
DEAE-Sephadex A-50	393	54	7.28	27.6	4.36
Sephadex G-50	278	9	30.89	19.5	18.50

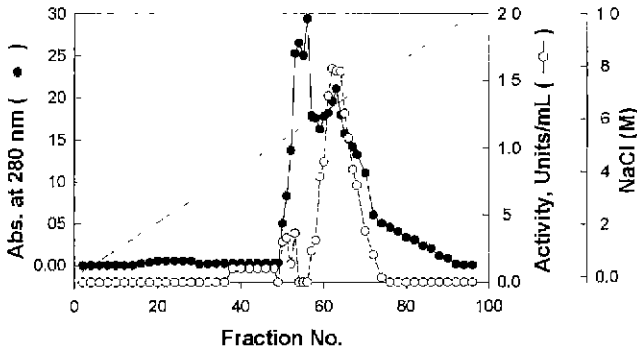


Fig. 1. DEAE Sephadex A-50 ion-exchange chromatography.

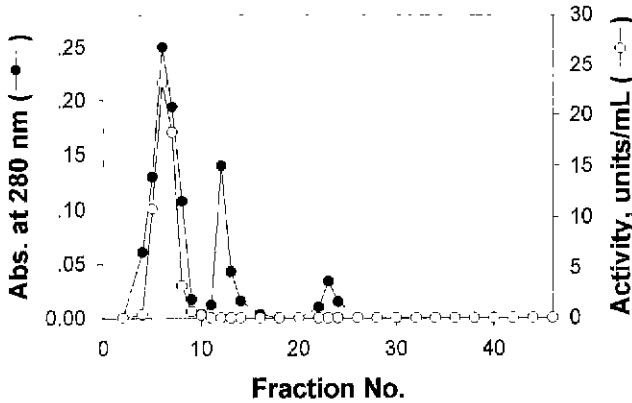


Fig. 2. Sephadex G-50 gel filtration chromatography.

Fig. 1과 같이 280 nm의 흡광도를 볼 때 0.5~0.7 M의 NaCl 농도에서 두 개의 fraction으로 나누어졌으며 fraction number 65에서 강한 inulinase 활성이 검출되었다. 이때의 비활성역가는 7.2 unit/mg로서 정제도가 약 4.3배였다 (Table 1). 순수정제를 위해 Sephadex G-50을 사용하여 gel filtration chromatography 한 결과 (Fig. 2), 2개의 단백질 peak가 검출되었으며 주 peak 부분에서 inulinase 활성이 검출되었다. 이때의 비활성도는 31.5 unit/mg, 수율은 19.5%, 정제도는 18.9배였다. 정제 단백질을 전기영동한 결과, 단일 밴드가 검출되었으며 (data not shown) 단일밴드의 분자량은 약 34 kDa로 밝혀졌다 (Fig. 3). Inulinase의 분자량은 돼지감자 inulinase 57 kDa[7], *Bacillus* sp. 56 kDa[13], *Pseudomonas* sp. endo-inulinase인 PI, PII 효소의 분자량이 각각 210 kDa, 170 kDa인 것[13]과 *K. marxianus* var. *marxianus* inulinase 400 kDa[21] 등과 같이 미생물의 종류와 source에 따라 다양하게 나타나는데 이들과 비교하면 본 효소는 비교적 작은 분자량이었다.

Inulinase의 특성

Inulinase의 pH에 대한 영향을 조사한 결과, Fig. 4에서와 같이 최적 pH가 8.5로서 alkaline inulinase인 것으로

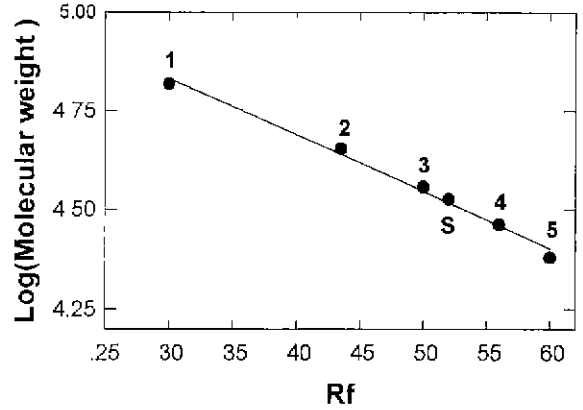


Fig. 3. Molecular weight estimation of the purified inulinase by 12.5% SDS-PAGE (Log₁₀ molecular weight vs. relative mobility).

Purified enzyme; S, bovine albumin (66 kDa); 1, egg albumin (45 kDa); 2, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (36 kDa); 3, carbonic anhydrase (29 kDa); 4, trypsinogen (24 kDa); 5.

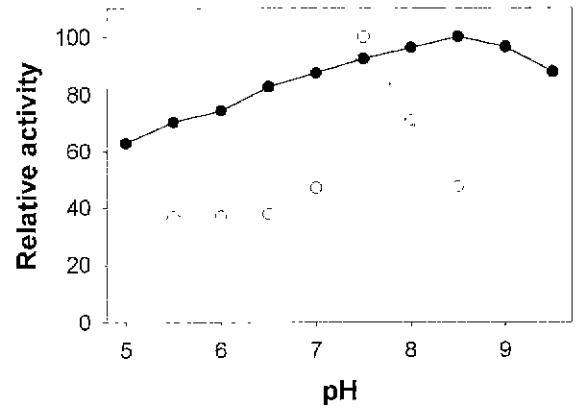


Fig. 4. Effects of pH on activity and stability of the purified inulinase from *Arthrobacter protophormiae/ramosus*. ●···●: Activity, ○···○: Stability

나타났다. 이와 같은 연구결과는 *Pseudomonas* sp.와 *Bacillus* sp.의 endo-와 exo-type의 최적 pH가 6.0인 점[25]과 *Kluyveromyces marxianus*의 최적 pH 5.0이고 pH 7.0에서는 활성이 검출되지 않았다는 결과[12]와 상당한 차이가 있었다. 그리고 *Arthrobacter* sp.[24]과 *Asp niger*의 fructozyme (pH 4.0)과 곰팡이 [21,22] 및 효모[5,20]의 inulinase의 최적 pH (5.0)보다 높았다. 한편 마늘[16] 유래의 inulinase의 최적 pH도 5.0이고 pH 7.0 이상에서 효소활성이 거의 검출되지 않은 결과와는 큰 차이가 있었다. pH 안정성은 Fig. 4와 같이 pH 7.5에서 가장 안정하였으나 산성영역에서 상당히 불안정한 것으로 나타났다. 이는 *Asp. niger*가 생산하는 fructozyme은 pH 3.0~5.0의 pH 범위에서 안정하고 대부분의 inulinase가 pH 4.5~5.0의 산성 범위에서 안정하다는 결과[21]와는 상반된 결과였다.

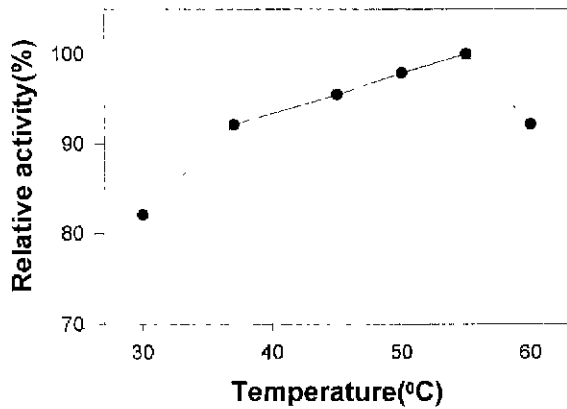


Fig. 5. Effects of temperature on activity of the purified inulinase from *Arthrobacter protophormiae/ramosus*.

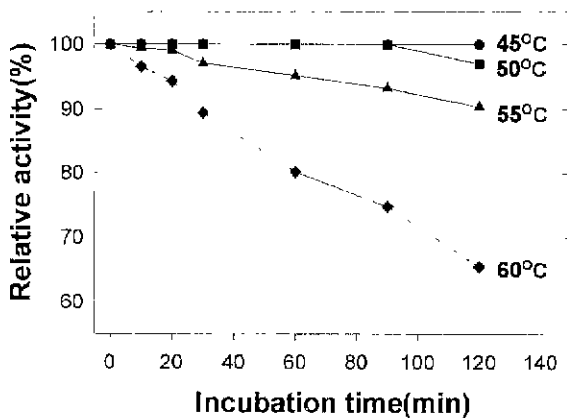


Fig. 6. Thermal stability of the purified inulinase from *Arthrobacter protophormiae/ramosus*.

Inulinase의 온도에 대한 영향을 조사한 결과, Fig. 5와 같이 최적활성 온도는 55°C로서 35°C~60°C의 온도범위에서 기질과 반응시켰을 90%이상의 높은 활성이 검출되었다. 이 결과는 지금까지 보고된 미생물 유래의 inulinase[5,20, 22,27]의 최적 온도와 비슷한 결과로서 오염방지나 inulin 용해도 등이 관여되는 공업적 이용 시 큰 문제가 없을 것으로 생각된다. 효소액을 각 온도에서 2시간 정제시킨 후 45°C에서 기질과 반응시켜 열에 대한 안정성을 조사한 결과, Fig. 6과 같이 55°C이하에서 안정한 것으로 나타났으며 60°C에서 20분간 처리시 90% 이상의 높은 활성이 검출되어 미늘 유래의 inulinase와 *Asp. niger*의 fructozyme[21]의 동일 조건에서의 활성 보다 10% 이상 높은 것으로 나타났으며 *Kluyveromyces marxianus* 유래의 inulinase 활성이 60°C에서 10분간 반응으로 약 80% 실행되는 것[24]과 비교해 열에 대해 매우 높은 안정성이 있다는 결과를 얻었다.

효소활성에 미치는 각종 금속이온과 EDTA의 영향을 조사한 결과 Table 2와 같이 *Pseudomonas* sp.와 *Bacillus* sp.의 endo-type에서 Mg²⁺ 이온의 존재하에서 활성이 약 20%

Table 2. Effects of metal ions on activity of purified inulinase

Ion	Source	Relative activity(%)
	None	100.0
Ca ²⁺	CuSO ₄ ·5H ₂ O	91.1
Fe ²⁺	FeSO ₄	107.8
K ⁻	K ₂ CO ₃	71.1
Na ⁺	NaCl	68.9
Mg ²⁺	MgSO ₄ ·7H ₂ O	153.7
Mn ²⁺	MnSO ₄	92.5
Zn ²⁺	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	71.1
Ag ⁺	AgNO ₃	0.0
	2-Mercaptoethanol	6.0
	p-Mercurybenzoate	10.0
	EDTA	100.0

The enzyme solution were preincubated with each metal ion (2 mM) for 1 hr at 30°C before activity measurement.

감소한다[25] 비해 본 정제 inulinase의 경우는 Mg²⁺ 이온 하에서 활성이 약 1.5배 증가하여 뚜렷한 활성화 효과가 있는 것으로 나타났고 Fe²⁺에 의해 효소활성이 일부 촉진되었다. 이는 *Aspergillus* sp.의 inulin 분해활성이 1 mM의 Mg²⁺의 존재하에서 증가하는 것[15]과 유사하였다. 한편 metal complex 시약인 EDTA에 대해서는 상당히 안정한 것으로 나타났으나 Ag⁺와 2-mercaptoethanol 및 p-mercurybenzoate 등에 의해서는 심하게 저해되었는데 Ag⁺의 경우 완전히 실행되었다. 한편 식물체유래의 inulinase 중 마늘의 경우 EDTA를 포함한 대부분의 금속이온에 대해 부분 또는 완전 실행되어[16] 효소의 기원에 따라 다양한 결과로 나타났다.

요 약

토양 유래의 *Arthrobacter protophormiae/ramosus*가 생산하는 inulinase를 정제하고 특성을 조사하였다. 배양액으로부터 60~80%의 에탄올로 단백질을 침전시킨 다음, DEAE-Sephadex ion chromatography와 Sephadex gel filtration chromatography로 분자량 약 34 kDa의 inulinase를 정제하였다. 이때 비활성역기는 31.5 unit/mg이었고 수율은 19.5%이었으며 정제도는 18.9배였다. 정제효소의 최적 pH와 온도는 8.5 and 55°C였으며 pH 7.5, 55°C이하에서 안정하였고 Mg²⁺이온에 의해 효소활성이 1.5배 활성화 되었다.

REFERENCES

- Bradford, M. 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: 248-254.
- Cheetham, P. S. J., A. J. Hacking and M. Vlitos. 1989. Syn-

- thesis of novel disaccharides by a newly isolated fructosyl transferase from *B. subtilis*. *Enzyme Micro. Technol.* **22**: 212–219.
3. Dubois, M. G., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and, F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**: 350–356.
 4. Fleming, S. E. and J. W. GrootWassink. 1979. Preparation of highfructose syrup from the tubers of the Jerusalem artichoke(*Heliantus tuberosus* L.). *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **12**: 1–28.
 5. Guiraud, J. P., C. V. Gaudin, and P. Galzy. 1980. Etude de l'inulinase de *Candida salmenticensis* Van Uden et Buckley. *Agr. Biol. Chem.* **44**: 1245–1252.
 6. Han, S. B., H. S. Ryu, M. W. Rho, T. K. Lee, H. S. Sohn, S. J. Woo, and T. B. Uhm. 1991. Purification and properties of *Aspergillus ficuum* endoinulinase. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 158–162.
 7. Jhon, D. Y. and M. H. Kim. 1988. Studies on inulase from Jerusalem artichoke. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **17**: 205–210.
 8. Kang, S. I. and S. I. Kim. 1993. Purification and properties of inulin fructotransferase(depolymerizing) from *Enterobacter* sp. S45. *J. Kor. Agric. Chem. Soc.* **36**: 111–114.
 9. Kimura, T. and M. Okada. 1989. Stability of immobilized maltotetraose-forming amylase from *Pseudomonas stutzeri*. *Biotechnol. Bioeng.* **33**: 845–855.
 10. Kimura, T., M. Yoshida, K. Oishi, M. Ogata, and T. Nakakuki. 1989. Immobilization of exo-maltotetrahydrolase and pullulanase. *Agric. Biol. Chem.* **53**: 1843–1848.
 11. Kimura, T. and M. Okada. 1988. Continuous production of maltotetraose using immobilized *Pseudomonas stutzeri* amylase. *Biotechnol. Bioeng.* **32**: 669–676.
 12. Kim, S. I. and H. S. Moon. 1987. Purification and characterization of intracellular and extracellular inulase from *Kluyveromyces marxianus*. *J. Kor. Agr. Chem. Soc.* **30**: 169–178.
 13. Kim, K. N. and Y. J. Choi. 1990. Purification and properties of extracellular inulinase from *Bacillus* sp.. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 490–495.
 14. Kosaric, N., A. Wiczorek, G. P. Copsentino, and Z. Duvnjak. 1985. Industrial processing and products from the Jerusalem Artichoke. *Advances in Biochemical Engineering* **32**: 1–24.
 15. Kwon, T. J., H. K. Chung, H. W. Kang, and J. H. Seu. 1973. Studies on the inulin hydrolyzing enzyme produced by *Aspergillus* sp.(C-74 strain), Part 1. Some properties of the inulin hydrolyzing enzyme from selected strain. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng* **1**: 37–42.
 16. Lee, J. S., S. J. Kwon, S. H., Yi, N. M. Kim, and J. Y. Yoo. 1997. Partial purification and properties of inulinase from garlic(*Allium sativum* L.). *Kor. J. Food & Nutr.* **10**: 325–329.
 17. Lee, T. K., H. C. Sung, Y. J. Choi, and H. C. Yang, 1987. Culture condition for inulase production by *Pseudomonas species*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **15**: 176–183.
 18. Lim, S. I., D. H. Lee, S. S. Hong, and J. Y. Yoo 2000. Screening and Identification of an inulinase producing micro-organism and optimal condition for the enzyme production. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 156–160.
 19. 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**: 265–269.
 20. Nahm, B. H. and S. M. Byun. 1977. Purification and characterization of inulase from *Kluyveromyces fragilis*. *Kor. Biochem. J.* **10**: 95–101.
 21. Nakamura, T., S. Maruki, S. Nakatsu, and S. Ueda. 1978. Culture conditions for inulinase production by *Aspergillus*. *J. Agr. Chem. Soc.* **52**: 581–587.
 22. Nakamura, T. and S. Nakatsu. 1977. General properties of extracellular inulase from *Penicillium*. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* **51**: 681–681.
 23. Norman, B. E. and B. Hojer-Pedersen. 1989. The production of fructooligosaccharides from inulin or sucrose using inulinase or fructosyltransferase from *Aspergillus ficuum*. *Denpun Kagaku* **36**: 103–111.
 24. Park, J. B., Y. M. Kwon, and Y. J. Choi. 1995. Production of inulin fructotransferase(depolymerizing) by *Arthrobacter* sp. A-6. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 68–74.
 25. Park, S. G. and Y. J. Choi. 1991. Hydrolysis of inulin by endo- and exo-inulinase. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 52–56.
 26. Saha, B. C., G. J. Shen, K. C. Srivastava, L. W. LeCureux, and J. G. Zeikus. 1989. New thermostable α -amylase-like pullulanase from thermophilic *Bacillus* sp. 3183. *Enzyme Microbiol. Technol.* **11**: 760–764.
 27. Uhm, T. M., J. S. Hong, H. S. Shon, M. K. Park, and S. M. Byun. 1985. Aconstitute inulinase from a *Bacillus*. *J. Kor. Agr. Chem. Soc.* **28**: 131–136.

(Received April 12, 2000)