

Pseudomonas sp.의 균체의 Endo-Inulinase 특성

이태경¹·신현철¹·최용진^{2*}·양한철¹

¹고려대학교 농과대학 식품공학과, ²유전공학과

Characteristics of Extracellular Endo-Inulinase Produced by *Pseudomonas* sp.

Lee, Tae-Kyung¹, Hyun-Chul Shin¹, Yong-Jin Choi^{2*} and Han-Chul Yang¹

¹Department of Food Technology, ²Department of Genetic Engineering,
College of Agriculture, Korea University, Seoul 136-701, Korea

Two forms of extracellular endo-inulinase, designated as P I and P II were resolved from a species of *Pseudomonas* isolated from soil. Both enzymes were glycoproteins with their carbohydrate content of 15% for P I and 2.4% for P II inulinase. Tryptophan residue was proved to be an essential amino acid for their catalytic activity. The molecular weights of P I and P II were estimated to be 210,000 and 170,000, respectively. The activity of the two enzymes was strongly inhibited by *p*-chloromercuribenzoate but the inhibition was nearly completely offset by the addition of the reducing agents such as cysteine or dithiothreitol. On the other hand, the two enzymes were activated about 50-60% of their activities by the presence of Co^{+2} ion, and quite stable at pH values ranging from pH 4.0 to 7.5. They also appeared to be relatively thermostable, and no appreciable inactivation was observed after incubation at 55°C for 2 hours. About 70 % hydrolysis rate with P I and 56 % with P II were achieved when inulin was hydrolyzed at 50°C for 72 hours with 60 units of the enzymes in 2 % inulin solution.

Inulin의 생물학적 가수분해에 의한 fructose 생산에 관한 연구의 일환으로 저자 등은 극히 드문 예로써 endo-type inulinase (EC 3, 2, 1, 7; β -fructan-fructanohydrolase)를 다량 유도 생산할 수 있는 우수 미생물을 토양으로부터 분리 *Pseudomonas* sp. 균주로 동정함과 동시에 효소생산 최적조건을 조사 보고한 바 있고(1) 또 상기 inulinase를 정제하여, PI과 PII isoenzyme을 분리, 두 isoenzyme의 일반 효소성질을 비교 검토하여 제2보(2)에 발표하였다.

본보에서는 전보에 이어 정제 PI, PII isoenzyme의 효소적 특성에 관한 연구를 계속, 그 결과를 보고한다.

재료 및 방법

시 약

Key words: Endo-inulinase, characteristics, *Pseudomonas* sp.

*Corresponding author

본 연구에 사용한 inulin, bovine serum albumin, N-bromosuccinimide, 1-ethyl-3-(3-dimethyl-amino-propyl) carbodiimide N, N'-methylene bisacrylamide, pyridoxal-5'-phosphate, phenyl glyoxal, 5·5'-dithiobis, ferritin, catalase, aldolase 등의 시약은 Sigma 제품, 기타 일반 시약류는 시판 1급이상 분석용 시약을 사용하였다.

효소액 조제

Pseudomonas sp. No. 65 토양 분리균을 효소생산 최적배지(1)에 접종, 48시간 진탕배양하여 얻은 조효소액을 전보(2)에 상술한 과정에 따라 정제하여 단일 단백질로 분리한 PI, PII inulinase를 본 실험의 시료로 사용하였다.

효소활성 측정

Inulinase 활성은 부분 수정한 Nakamura 등의 방

법 (3)에 따라 측정 하였으며, 효소활성 단위는 1분간에 1 μ mole의 환원당을 생산하는 효소량을 1단위로 정하였으며, 비활성은 효소 단백질 mg당, 효소활성 단위로 표시하였다.

단백질 측정

Bovine serum albumin을 표준단백질로 사용하여 Lowry법 (4)에 따라 측정하였다.

탄수화물 측정

효소 분자에 결합되어 있는 탄수화물량은 glucose를 표준당으로 사용한 phenol-sulfuric acid법 (5)으로 측정하였다.

분자량 측정

효소 분자량은 Andrews 방법 (6)에 따라 Sephadex G-200 column에서의 이동속도를 비교하여 산출하였다. 이때 표준 단백질로 ferritin (M.W. : 440,000), catalase (232,000) 및 aldolase (158,000)을 사용하였고, void volume (V_0)은 blue dextrin (2,000,000)을 이용하여 구하였다.

효소 분자의 화학수식 (chemical modification)

Inulinase 분자의 carboxyl residue는 1-ethyl-3

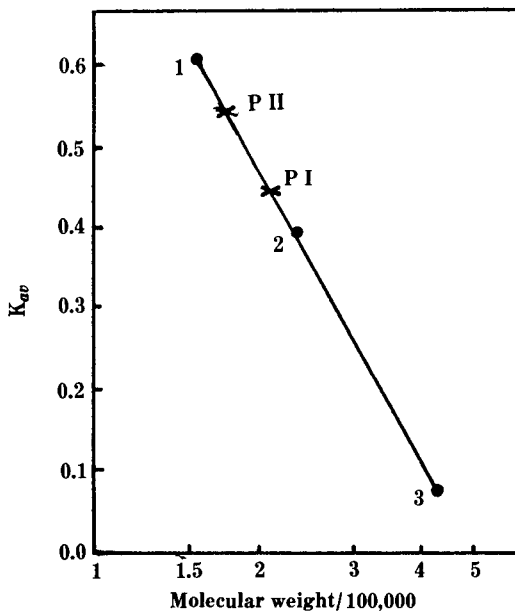


Fig. 1. Estimation of molecular weight by gel filtration on Sephadex G-200.

The standard proteins used were;
1. Aldolase; 2. Catalase; 3. Ferritin.

(3-dimethyl-aminopropyl) carbodiimide (7), lysyl residue는 pyridoxal-5'-phosphate (8), arginyl residue는 1,2-cyclohexadione과 phenyl glyoxal (9), histidyl residue는 diethyl pyrocarbonate (10), tryptophanyl residue는 N-bromosuccinimide (11), cysteinyl residue는 5·5'-dithiobis (12), 그리고 cystine residue는 dithiothreitol (13)을 사용하여 각각의 아미노산을 화학수식하였다.

Inulin 가수분해 및 분해산물 분석

2% inulin 용액 100 ml [0.025 M-a-cetate buffer (pH 5.5)]에 60 units의 inulinase를 첨가, 50°C로 유지, 반응을 계속하면서 경시적으로 시료를 취하여 5분간 가열하여 반응을 정지시켰다. 반응생성물은 High Performance Liquid Chromatography (HPLC : Spectrophysics sp 8,100)을 이용, 다음과 같은 조건에서 분석하였다.

Column, Aminex HPX'42A (7.8×300 mm) : Mobile phase, H₂O : Flow rate, 0.6 ml/min : temperature, 80°C.

결과 및 고찰

효소의 분자량

전보에 설명한 과정 (2)에 따라 단일 단백질로 분리 정제한 PI과 PII inulinase의 분자량을 gel-filtration법으로 측정 한 결과 Fig. 1과 같이 PI이 210,000, PII가 170,000으로 산출되었다. *Aspergillus niger*에서 분리한 두 종의 inulinase의 분자량은 type II 59,000 (14), type III 54,000 (15)이고, *Penicillium* sp.에서 3종의 inulinase가 분리되었으며, 각각의 분자량은 PI 86,000, PII 63,500, PIII 66,000으로 보고 (16)되고 있다. 또 *Kluyvero. fragilis* inulinase는 240,000, *Bacillus subtilis* inulinase는 49,000의 분자량 (18)을 가지고 있다고 한다. 따라서 *Pseudomonas* sp.가 생산하는 본 endo-inulinase는 비교적 큰 분자량을 가지고 있는 inulinase라고 할 수 있겠다.

효소의 당 함량

Yeast inulinase는 약 66%의 매우 높은 함량의 탄수화물 (19)를 가지고 있으며, *Asp. niger* inulinase (18) 역시 20~40%의 비교적 높은 당 함량을 보고하고 있다. 따라서 본 연구에서도 PI과 PII의 당 함량을 분석해 본 결과 포도당으로 환산하여 각각 15%와 2.5%의 탄수화물 함량을 나타내었다. 이상의 결과로 PI, PII 효소역시 일종의 당 단백질임을

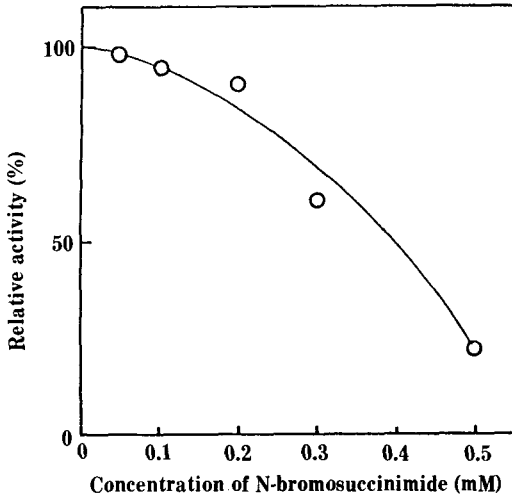


Fig. 2. Inactivation of inulinase P I by N-bromosuccinimide.

The reaction was carried out in 0.2 ml of 0.1 M acetate buffer pH 4.5 at 20°C with N-bromosuccinimide for 60 mins.

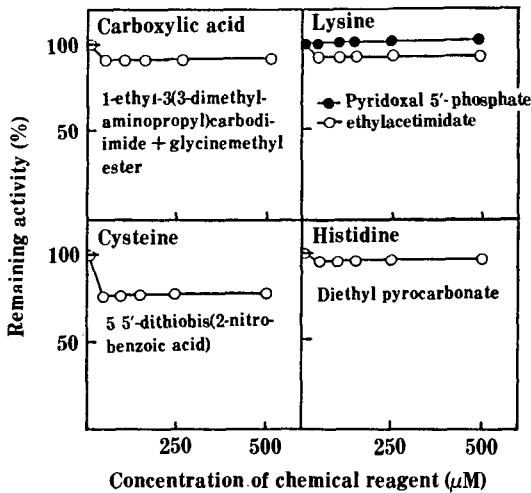


Fig. 3. The reaction of inulinase PI with various modification reagents as a function of the reagent concentration.

The enzyme was incubated either in 0.5 ml of 0.1 M acetate buffer (pH 6.0) or in 0.5 ml of 0.1 M acetate buffer (pH 5.0, in this case, carboxylic acid modification) for 1 hr at 20°C with the indicated concentrations of modification reagents. Portion (50 μl) of the reaction mixture was withdrawn and assayed.

확인하였으나 당 성분의 기능에 대하여서는 더 이상 연구하지 않았다. 한편 *B. subtilis* inulinase(18)는 1.7%의 당을 함유하고 있다고 보고되고 있어 일반적으로 세균 inulinase는 효모나 곰팡이 효소에 비해

Table 1. Inhibitors and activators of inulinase

	Relative activity(%)	
	P I	P II
CaCO ₃ (mM)	88.0	88.6
MgCl ₂ (mM)	88.0	91.0
CuCl ₂ (mM)	5.6	0
KCl (mM)	82.5	93.0
CoCl ₂ (mM)	148.0	161.0
HgCl ₂ (mM)	0	0
MnCl ₂ (mM)	87.7	61.0
FeCl ₃ (mM)	85.9	98.1
EDTA-Na ₂ (mM)	92.2	89.0
Mercaptoethanol (mM)	80.0	63.0
1mM pCMB ^a	23.1	19.4
1mM pCMB + 5mM Cysteine	100	95.5
1mM pCMB + 1mM DTT ^b	100	100

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

- a) pCMB: para chloromercuribenzoate
- b) DTT: dithiothreitol

여 비교적 낮은 당 함량을 가지고 있음을 알 수 있다.

효소활성 필수아미노산

촉매활성에 필수적인 아미노산잔기를 알아보기 위하여, PI 효소를 특정 아미노산에만 특이적으로 작용하는 몇종의 시약과 반응시켜, 그 농도별 효과를 조사한 결과 Fig.2와 같이 N-bromosuccinimide (NBS)에 의해서는 농도증가에 따라 거의 비례적으로 효소활성이 저하되어 0.5mM NBS로 처리하였을 때 약 80%의 효소활성 저하를 나타내므로써 tryptophan 잔기가 PI 효소활성에 필수적임을 알 수 있었다. 그러나 Fig.3에 표시되어 있는 4종과 기타 몇가지 다른 아미노산의 경우는 각각의 특정 시약에 대하여 거의 영향받지 않거나 아니면 초기 활성만 약간 저하될 뿐 시약농도 증가에 거의 변화를 보이지 않음으로써 tryptophan이외의 다른 아미노산은 촉매활성에 직접 관여하고 있지 않다는 것을 알 수 있었다. 별도 자료제공은 하지 않았으나 PII 효소도 PI과 거의 같은 실험결과를 보였으며, Uhm 등(18)에 의하면 *Asp. niger* inulase 역시 tryptophan만이 촉매활성의 필수아미노산이 되고 있다.

효소활성에 미치는 당류효과

Inulin 가수분해에 미치는 각종 당류효과를 살펴보기 위하여 효소반응액에 10 mM의 작중 당을 첨가,

Table 2. Effect of various sugars on of inulinase

	Relative activity(%)	
	P I	P II
Inulin	100	100
Raffinose	78.0	87.0
Glucose	90.1	97.4
Sucrose	79.5	92.2
Maltose	88.5	99.7
Lactose	96.9	91.9
Fructose	87.6	85.1
Melezitose	99.4	92.9

The reaction was carried out for 30 min at 40 °C. The reaction mixture contained 5 mM inulin and 10 mM sugar.

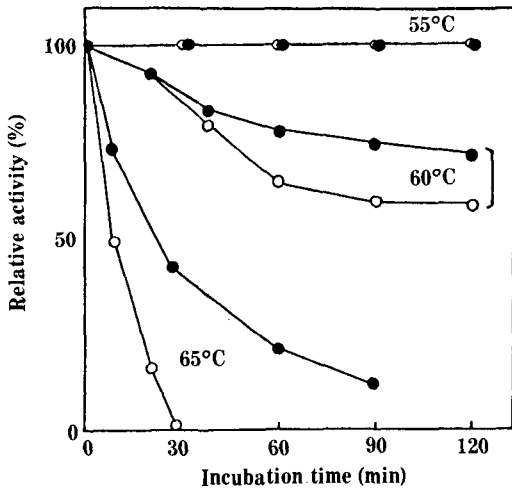


Fig. 4. Thermal stabilities of inulinase P I and P II. Two ml of each enzyme solution was incubated at the various temperatures indicated in the figure, chilled and assayed under the standard assay conditions. ● - ● P I ○ - ○ P II

효소활성을 측정하여 Table 1과 같은 결과를 얻었다. 최종반응 생성물인 fructose는 예상대로 PI과 PII 효소활성을 다같이 약 15% 정도 저하시켰으며, sucrose와 raffinose는 PII에 대해서는 뚜렷한 저해효과를 나타내지 않았으나 PI의 경우는 약 20% 정도 활성저해 현상을 보임으로써 두 효소의 매우 흥미있는 특성의 차이를 보여주고 있다.

각종 저해제 및 촉진제의 효과

PI, PII 효소는 Cu⁺² 이온과 Hg⁺² 이온에 극히 민감하여 1 mM 존재에 의해서도 거의 완전한 활성저해를 보였다. 그러나 1 mM Co⁺² 이온의 존재는 오

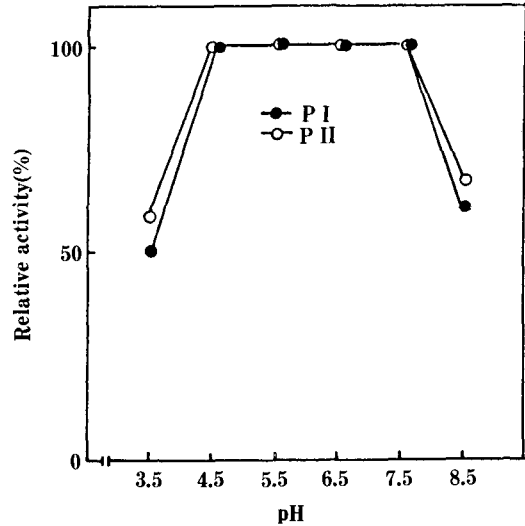


Fig. 5. pH stability curves of inulinase P I and P II. The enzyme preparations were incubated at 4 °C for 24 hours in McIlvain buffers of various pH values. The enzyme assay was carried out under standard conditions described in material and methods.

히려 PI 48%, PII 61% 정도의 높은 활성화의 특이한 효과를 보였다. 또한 두 inulinase는 1 mM pCMB에 의해서 약 80% 정도 활성저해 현상을 나타내었다. 그러나 1 mM dithiothreitol 또는 5 mM의 cysteine을 첨가하면 효소활성이 거의 완전회복 되는 특성을 보였다(Table 2 참조).

효소의 안정성

서로 다른 pH에서의 PI, PII 효소의 안정성을 조사 비교해 본 결과, 대다수의 다른 inulinase와 마찬가지로 본 PI, PII 효소역시 pH 4.5~7.5 사이에서는 매우 안정하였다(14-16) (Fig. 4 참조). 또한 두 inulinase는 55°C에서 120분 가열하였을 때는 전혀 실활되지 않았으나 60°C에서 120분 가열했을 때 PI 효소가 약 27%, PII가 약 40% 정도 실활되었다 (Fig. 5 참조). 이와같은 결과는 Nakamura 등이 보고한 *Penicillium* sp. inulinase(16) (PI, PII, PIII 세 효소 모두가 60°C, 10분 가열에 의해 약 80% 실활)와 *Asp.* sp inulinase(14, 15) (60°C, 30분 가열에 의해 55% 이상의 실활)의 내열성에 비하면 비교적 높은 열안정성을 가진 효소라고 판단, 공업적 이용에 매우 유리한 효소라고 생각된다. 그러나 *Asp. niger* 효소와 *Asp. ficuum* 효소인 Novozyme 230 inulinase(17) (60°C, 120분 가열에 의해 10% 정도 실활)에 비하면 열안정성이 다소 떨어진다고 하겠다.

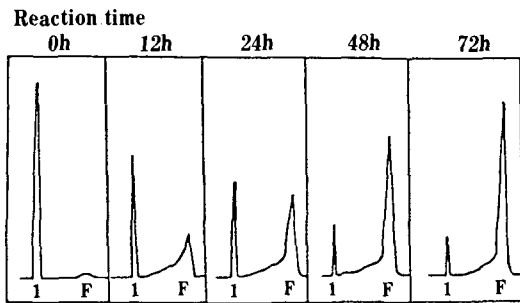


Fig. 6. Chromatograms of hydrolysate of inulin with *Pseudomonas* sp. inulinase P I.

I: Inulin (retention time 5.74 min)

F: Fructose (retention time 16.67 min)

Inulin 가수분해 및 분해산물 분석

2% inulin 용액에 PI, PII 효소 각각 2ml (30 units/ml)을 첨가, 50°C에서 반응시키면서 경시적으로 반응생성물을 분석해 본 결과 Fig. 6과 같이 반응 시간 경과와 더불어 최종생성물인 fructose의 생산량은 비례적으로 증가하여 반응 72시간에는 PI 경우가 70%, PII가 약 56%의 기질분해율을 보여 PI 효소가 PII 효소보다 효과적임을 알 수 있었다. 또한 전보(2)의 Fig. 10에서 설명한 바와 같이 PI 효소는 반응초기부터 fructose 이외에 각종 oligo 당을 생성하였다. 따라서 본 연구실에서 분리 *Pseudomonas* sp.로 동정된 토양 분리군이 생성하는 PI, PII 효소는 세균 inulinase로서는 매우 드물게 endo type의 inulinase임을 확인할 수 있었다.

요 약

토양 분리군 *Pseudomonas* sp.가 생산하는 inulinase를 분리·정제하여 얻은 단일 단백질 효소 PI과 PII는 탄수화물 함량이 각각 15%와 2.4%인 당 단백질 형태의 endo-inulinase로서 두 효소가 모두 촉매활성에 필수적인 tryptophan 잔기를 가지고 있었다. 분자량은 PI 210,000, PII 170,000으로 측정되었다. 1 mM β CMB 존재에 의해 두 효소가 약 80% 정도의 활성저해를 보였으나 5 mM cysteine 또는 1 mM dithiothreitol을 첨가하면 효소활성이 거의 완전 회복되는 특성을 나타내었다.

최종 가수분해산물인 fructose (1 mM)에 의해 PI, PII 효소가 각각 15% 정도의 활성저해를 받는 반면 Co^{2+} 이온은 50~60%의 높은 활성화 효과를 보였다. 두 효소는 pH 4.0~7.5 사이에서 매우 안정하였으며, 열에 대하여서도 비교적 안정하여 60°C, 120분 가열에 의해 PI이 약 27%, PII가 약 40%의 실활을 나타낼 뿐이다.

또한 60 units의 효소를 사용, 2% inulin을 50°C에서 72시간 가수분해 시켰을 때 PI 약 70%, PII 약 56%의 기질 분해율을 보였다.

사 사

본 연구는 한국과학재단의 연구비로 수행되었으며 이에 깊은 감사를 표하는 바입니다.

참고문헌

1. Lee, T.K., H.C. Sung, Y.J. Choi, and H.C. Yang: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **15**, 176 (1987).
2. Lee, T.K., Y.J. Choi and H.C. Yang: *Kor. J. Microbiol. Bioeng.*, **16**, 259 (1988).
3. Nakamura, T., S. Hoashi, and S. Nakatsu: *Nippon Nogei-Kagaku Kaishi*, **52**, 105 (1978).
4. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, Farr, A.L. and Randall, R.J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
5. Debois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, Robers, P.A. and Smith, F.: *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1956).
6. Andrews, P.: *Biochem. J.*, **96**, 595 (1965).
7. Carraway, K.L. and D.E. Koshland: "Methods in Enzymology", Vol. 25, p616, Academic press, New York. (1972).
8. Schnackerz, K.O. and E.A. Noltman: *Biochemistry* **10**, 4837 (1971).
9. Patty, L. and Smith, et al.: *J. Biol. Chem.*, **250**, 557 (1975).
10. Berrocal, F. and J. Carreras: *Comp. Biochem. Physiol.* **76B**, 795 (1983).
11. Luntblad, R.L. and C.M. Noyes: "Chemical Reagents for Protein Modification", CRC press, Florida. Vol. II, p47 (1984).
12. Habeeb, A.F.S.A.: "Methods in Enzymology": Academic press, New York. Vol. **25**, 457 (1972).
13. Cleland, W.W.: *Biochemistry* **3**, 480 (1964).
14. Nakamura, T., S. Maruki, Nakatsu, S. and Veda, S.: *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*, **52**, 581 (1978).
15. Nakamura, T., T. Kurukawa, Nakatsu, S. and Ueda, S.: *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*, **52**, 159 (1978).
16. Nakamura, T. and S. Nakatsu: *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*: **51**, 681 (1977).
17. Zittan, L.: *Starch*, **33**, 373 (1981).
18. Uhm, T.B.: p.H.D. Thesis (1987) Korea Advanced Institute of Science and Technology.
19. Workman, W.E. and Day, D.F.: *FEBS Letters* **160**, 16 (1983).

(Received October 11, 1988)