

Streptomyces sp. S56 endoinulase의 고정화 및 성질

김수일 · 장호진

서울대학교 농업생명과학대학 농화학과, 농업생물신소재연구센터

초록: *Streptomyces* sp. S56 endoinulase를 DEAE-cellulose에 고정화하였고 고정화 효소의 일반 특성을 유리효소와 비교하였으며 돼지감자 추출물 및 inulin의 고정화 효소에 의한 가수분해 조건을 조사하였다. 고정화 효소의 최적 작용 pH는 4.5~5.5로 유리효소보다 효소작용 pH가 산성으로 이동되었으며 작용 안정 pH는 6으로 유리효소와 동일하나 전반적으로 고정화에 의하여 pH 안정성은 저하되었다. 반면 온도 안정성은 고정화에 의하여 크게 증가되어 50℃, 1시간 처리에서도 70% 이상의 활성을 가지고 있었으며 또한 최적온도도 유리효소보다 높게 나타났다. 기질친화성은 고정화에 의하여 5배 정도 낮아지나 반응 최고속도는 반대로 2배 이상 증가되었다. 돼지감자 추출물 및 inulin은 고정화 효소에 의하여 48시간 내에 각각 총당의 63%, 78%를 가수분해, fructose 및 inulobiose를 주로 생산하였다(1992년 8월 25일 접수, 1992년 10월 2일 수리).

효소의 산업적 이용에서 대두되는 문제의 하나는 효소반응중 효소의 불안정성에 따른 활성감소나 또는 효소의 연속사용 불가능에 따라 많은 양의 고가 효소가 필요하다는 점이며 이러한 단점을 극복하기 위한 방법으로서 효소의 고정화가 연구되어 왔으며 실제 산업적으로 이용되고 있기도 하다. 고정화의 방법은 물리적방법과 화학적방법으로 대별될 수 있으며 각각이 장단점을 가지고 있다.^{1,2)} Inulase의 고정화 실험은 *Kluyveromyces*에서 분비하는 inulase를 tygon tube 및 aminoethylcellulose에 고정시키거나,^{3,4)} *Debaryomyces* 분비 효소를 DEAE-cellulose에 흡착, 고정화하는 보고⁵⁾가 있으며 그외에 inulase를 분비하는 미생물 세포를 직접 고정화하여 알콜생산이나⁶⁾ fructose생산⁷⁾에 이용하는 연구가 발표되었다. 그러나 이들 inulase는 모두 inulin을 말단에서부터 fructose를 하나씩 절단하는 exo형으로, inulin 내부의 β -2,1 결합을 절단하여 fructo-oligosaccharide를 생산하는 endoinulase에 대한 보고는 아직 없다. 본 연구에서는 *Streptomyces*속에서 분비하는 endoinulase의 생산,⁸⁾ 정제 및 성질⁹⁾에 대한 실험에 이어 본 endoinulase를 고정화하고 고정화효소의 특성을 유리효소와 비교하였으며 고정화 효소에 의한 돼지감자 추출물 및 inulin의 가수분해에 대한 실험을 행하였다.

재료 및 방법

Key words: Endoinulase, immobilization, *Streptomyces*
Corresponding author: S. I. Kim

효소의 생산 및 고정화 조건 검토

하 등⁸⁾의 방법에 따라 본 실험실에서 보관중인 *Streptomyces* sp. S56으로 부터 endoinulase를 생산하고 ammonium sulfate 포화 침전법으로 얻은 조효소를 효소 고정화 실험에 사용하였다. 효소의 고정화는 활성화된 DEAE-cellulose를 pH 4.0에서 8.0까지 0.5의 간격으로 각 pH buffer(pH 4~7; 0.01 M citrate- Na_2HPO_4 buffer, pH 8; 0.01 M sodium phosphate buffer)에 평형시킨 후 조효소 용액을 과잉으로 첨가, 4℃에서 1시간 이상 저어준 후 원심분리하여 상정액을 제거하고 침전물을 0.01 M sodium phosphate(pH 6.0) buffer로 3번 씻어 흡착되지 않고 남아있는 효소를 제거하여 제조하였다. 고정된 inulase의 양은 첨가한 효소의 총 활성에서 흡착되지 않은 효소활성을 제외한 값으로 하였다.

고정화 효소의 일반적 성질

최적 pH는 40℃, pH 3.0~7.5 범위에서, 최적온도는 pH 5.0, 30~70℃ 사이에서 각각 15분간 반응시킨 후 각각의 inulase 활성을 측정하여 결정하였다. pH에 대한 안정성은 pH 3.0~8.0의 범위에서 40℃에서 일정시간 incubation한 후 잔류활성을 측정하였고 열안정성은 40~65℃ 사이에서 일정시간 열처리한 후 잔류활성을 측정하여 조사하였다. 또한 Michaelis 상수 Km은 inulin을 농도별(1~16%)로 첨가하여 일정시간별 효소의

활성을 측정하여 초기속도를 구하고 이로부터 Lineweaver-Birk plot를 그려 구하였다.

Inulin의 가수분해

돼지감자 추출물은 돼지감자 분말 100g에 70℃ 증류수 1l를 첨가하여 추출한 후 100℃로 처리, 잔존효소를 불활성화한 후 활성탄으로 처리하여 맑은 용액을 얻어 준비하였으며 추출물의 총당 농도는 18 mg/ml 이었다. Inulin은 Sigma제품을 사용하였고 총당 농도가 27 mg/ml인 용액을 만들어 가수분해 실험에 사용하였다.

고정화 효소에 의한 돼지감자 추출물 및 inulin의 가수분해는 각 용액 50 ml에 고정화 inulase 약 0.7g을 넣고 40℃의 진탕배양기에서 3일간 반응시켜 행하였으며 이때 반응물의 pH는 5.5~6.0으로 유지되었다. 가수분해 정도는 일정시간별로 상정액을 채취하여 환원당 및 TLC 분석으로 조사하였으며 가수분해율은 생성된 환원당양 대 총당양의 백분율로 표시하였다.

분석 방법

유리 및 고정화 효소의 활성은 김 등¹⁰⁾의 방법에 따라 inulin이 분해되어 생산되는 환원당을 DNS 방법으로 정량하여 행하였으며 다만 고정화 효소의 활성도는 고정화물을 진공건조한 후 건조중량 g당 unit로 표시하였다. 단백질 및 총당의 정량은 전보⁸⁾와 같은 방법으로 측정하였다. 당조성은 n-propanol : ethylacetate : water(2 : 2 : 1)의 전개용매를 사용한 TLC에 의하여 분석하였다.⁸⁾

결과 및 고찰

효소 고정화

pH 4.0~8.0 사이의 각 pH에서 DEAE-cellulose에 고정된 효소의 양을 측정된 결과 pH 6.0에서 제일 많은 양의 inulase가 고정화되어 건조 DEAE-cellulose 1g당 40 U의 효소가 고정되었다(Fig. 1). pH 5.0 이하 및 8.0에서는 상대적으로 50% 이하의 고정화율을 보여주었으며 또한 pH 6을 기준으로 할 때 높은 pH에서 낮은 pH보다 고정화율이 높았다. Exoinulase의 경우이나 본 실험의 고정화정도를 tygon tube³⁾나 aminoethyl-cellulose⁴⁾를 사용할 때, 또는 다른 조건에서 DEAE-cellulose를 사용했을 때⁵⁾ 각각 11.5 및 39 U/g이 고정된 것과 비교하면 본 실험의 endoinulase의 고정화 정도가 높은 것으로 나타났다. 따라서 다음의 고정화 inulase에 대한 실험은 pH 6에서 고정화한 효소를 사용하여 실험하였다.

고정화효소의 일반적 성질

고정화효소의 pH에 따른 효소활성을 측정된 결과 최적 pH는 4.5~5.5로 나타나서(Fig. 2) 최적 pH가 5.5~6.5인

유리 endoinulase와 비교하면 더 산성에서 보다 활성을 보여주고 있으며 이런 경향은 pH 3~8인 전체의 범위에서 동일하게 관찰되었다. 따라서 본 inulase는 고정화에 의하여 효소작용의 pH가 산성쪽으로 1 정도 이동된 것을 알 수 있으며 이러한 현상은 Guiraud 등⁹⁾의 결과에서도 발표되고 있는 것으로 지지체인 DEAE-cellulose와 buf-

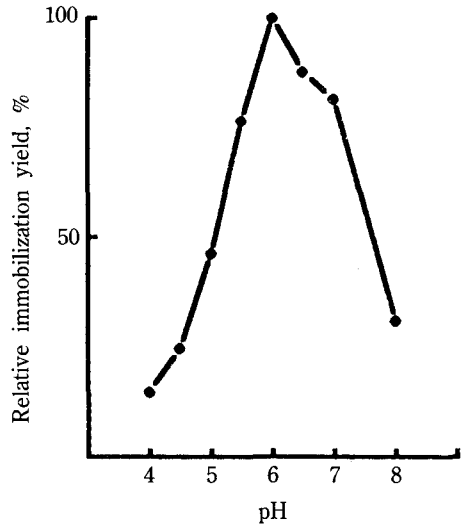


Fig. 1. Relative immobilization yield of endoinulase at various pH value. Immobilized inulase activity at pH 6 was taken as 100.

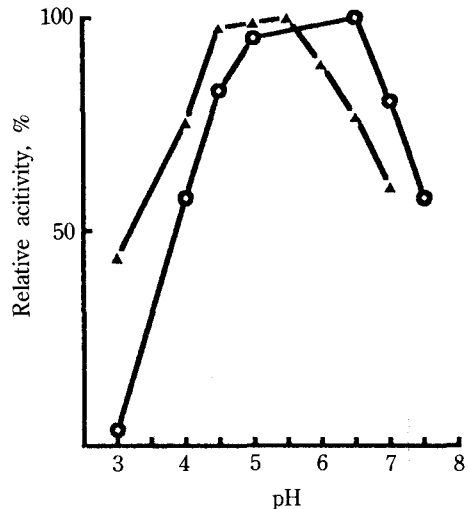


Fig. 2. Effect of pH on free and immobilized endoinulase.

▲—▲: Immobilized inulase, ○—○: Free inulase
Enzyme activity was measured at 40℃ for 15 min in the 0.01 citrate-Na₂HPO₄ buffer having indicated pH.

fer의 양전하 사이의 반발에 의한 것으로 보고되고 있다. 각 pH에서의 효소안정성을 비교한 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 고정화 inulase는 pH 5~6에서 매우 안정하여 1시간 후에도 70% 이상의 활성을 보유하였으며 특히 최적 pH인 6에서는 90%의 활성을 나타내고 있다. 그러나 작용 최적 pH 범위로 나타난 pH 4.5에서는 안정성이 급격히 저하하여 20분 처리로도 50%의 활성이 감소되었다. 전체

적으로 높은 pH(7~8)에 있어서, 낮은 pH(3.5~4)에서 보다 안전성이 더 높았으며(Fig. 3) 이러한 경향은 유리효소에서도 마찬가지였다(Fig. 4). 유리효소에서 고정화 효소보다 pH 안정성이 더 높아서 pH 5~8에서 1시간 후에도 70% 이상의 활성을 나타내며 pH 4.5에서도 60% 이상의 활성을 가지고 있다(Fig. 4). 보다 산성인 범위(pH 3~4.5)에서는 안전성이 급격히 감소하여 1시간 후에는 40% 이하의 활성만이 남아있고 pH 3에서는 10분 이내에 거의 불활성화되었다(Fig. 3). pH 7~8에서의 활성감소는 산성에서 보다는 적어 이 효소의 고정화 상태이거나 유리 상태인

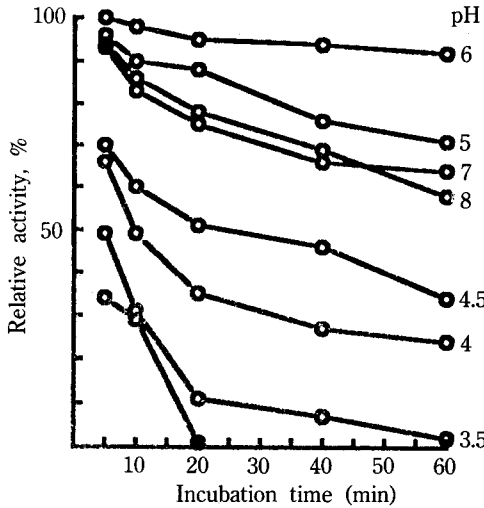


Fig. 3. pH stability of immobilized endoinulase. Enzyme activity was measured at 40, pH 5.0 for 15 min after incubation at 40 for 5 to 60 min in the 0.01 M citrate-Na₂HPO₄ bufer (pH 3~7) and sodium phosphate buffer (pH 8) buffer.

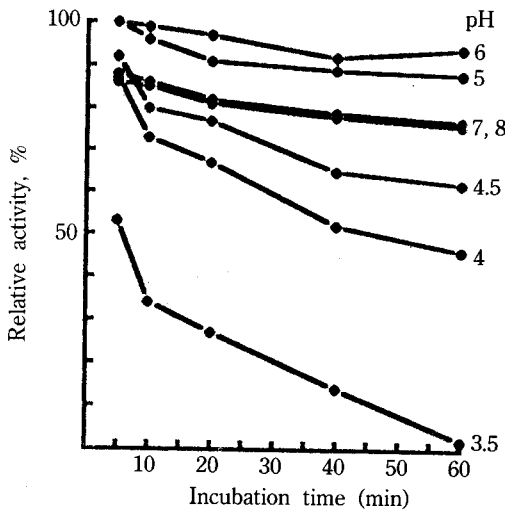


Fig. 4. pH stability of free endoinulase. Enzyme activity was measured with the same method as explained in Fig. 3.

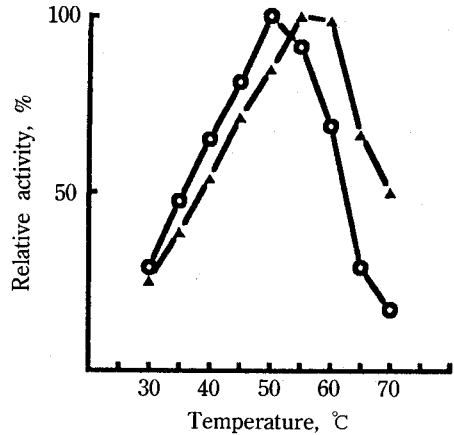


Fig. 5. Effect of temperature on free and immobilized endoinulase.

▲—▲: Immobilized, ○—○: Free
Enzyme activity was measured at pH 5.0 for 15 min at indicated temperature

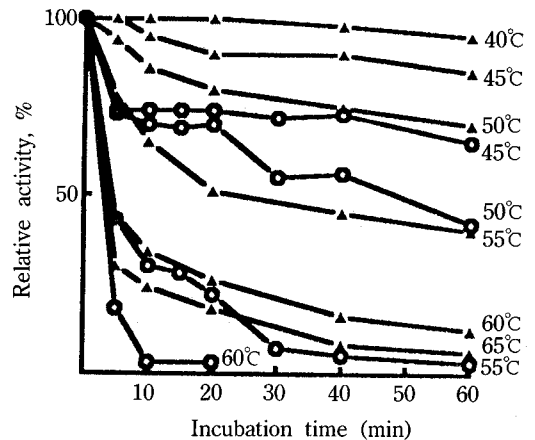


Fig. 6. Heat stability of free and immobilized endoinulase.

▲—▲: Immobilized, ○—○: Free

경우 모두 동일하게 최적 pH를 기준으로 할 때 낮은 pH보다 높은 pH에서 더 안정하였다.

30~70℃의 범위에서 온도에 따른 고정화 효소의 활성을 조사하여 본 결과 최적 온도는 55~60℃로 나타났으며, 이는 50℃의 유리효소보다 5~10℃가 높은 결과이다(Fig. 5). 이러한 고정화에 의한 최적온도 상승은 Guiraud 등⁹⁾에서도 보고되고 있으나 반대의 경우도 발표되고^{3, 11)} 있어 효소 및 지지체의 종류에 따라 다른 것으로 생각되었다.

고정화 효소의 열안정성은 40~65℃에서 5~60분간 열처리 후 효소의 잔류 활성을 측정하여 조사하였으며 그 결과 40~50℃에서 안정하여 1시간 처리 후에도 70~95%의 활성을 보유하고 있으며 또한 55℃에서도 50%의 활성이 남아있었다(Fig. 6). 유리효소의 열안정성은 이보다 훨씬 낮은 경향을 보이고 있다. 예를 들면 55℃ 처리에서 유리상태에선 30분 안에 거의 불활성화되는 것으로 나타났다. 따라서 본 효소는 고정화에 의하여 열안정성이 상당히 증대된 것을 알 수 있으며 이러한 결과는 *Kluyveromyces*가 분비하는 *exoimulase*의 고정화가 열안정성을 감소한다는 보고⁴⁾와는 반대되는 것이다.

고정화 inulase의 Km 및 Vmax값은 각각 1.8 mM, 0.743 μM/min로 유리효소의 경우와 비교하면(0.37 mM 및 0.294 μM/min) 고정화에 의하여 기질 친화성은 5배 정도 낮았으나 최고속도는 2배 이상 높아지는 것으로 나타났다. 이러한 Km값의 증가는 고정화에 의한 효소의 3차구조 변화 또는 효소활성 부위의 지지체에 의한 가리움 현상 등으로 설명될 수 있으며 다른 효소의 고정화에서도 보

고되고 있다.¹¹⁻¹³⁾

고정화 효소에 의한 inulin의 가수분해

고정화 효소에 의한 돼지감자 추출물 및 inulin의 최분식 반응기에서의 가수분해 정도를 시간에 따라 가수분해율 및 환원당량으로 표시하였다(Fig. 7). 돼지감자 추출물 및 inulin의 가수분해는 같은 48시간에 steady state에 도달하였으나 이 때의 가수분해율은 inulin이 78%로 전자의 63%보다 높게 나타났다. 가수분해율은 환원당/총당의 비로 나타낸 것으로써 가수분해물에는 fructose oligomer(F₂ 등)이나 또한 비환원당인 GF₂ 등이 같이 존재하므로 실제 가수분해율은 더 높을 것으로 생각된다. 각 가수분해물의 시간에 따른 당조성의 변화를 TLC로 조사하였으며 그 결과 돼지감자 추출물에서는 반응 3시간부터 반응물에는 존재하지 않았던 F₃, F₄가 검출되기 시작하였고 12시간에서는 F₂가 생성되었다(Fig. 8). 반응 시간이 경과함에 따라 중합도가 비교적 높은 oligosaccharide들(GF₃ 이상)은 점차

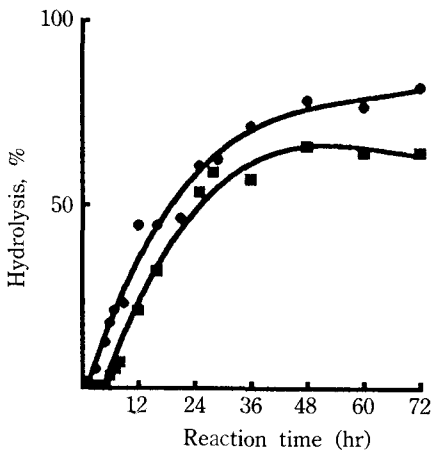


Fig. 7. Hydrolysis of jerusalem artichoke extract and inulin with immobilized endonulase.

Hydrolysis % = reducing sugar produced/total sugar × 100

●—●: Inulin, ■—■: Jerusalem artichoke extract

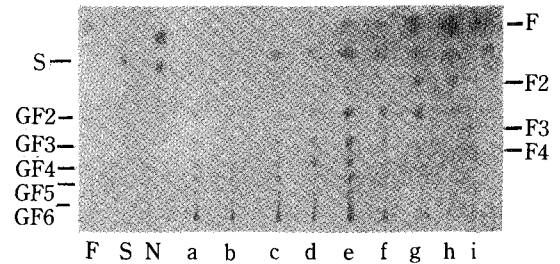


Fig. 8. Thin layer chromatogram of jerusalem artichoke hydrolysate with immobilized endoinulase.

F: Fructose, S: Sucrose, N: Neosugar(F, S, GF₂, GF₃), Reaction time (hr): a; 0, b; 0.5, c; 1, d; 3, e; 6, f; 12, g; 24, i; 48

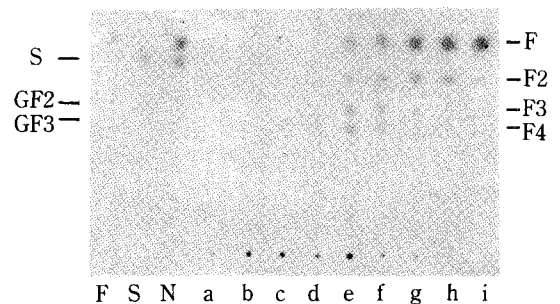


Fig. 9. Thin layer chromatogram of inulin hydrolysate with immobilized inulin.

F: Fructose, S: Sucrose, N: Neosugar(F, S, GF₂, GF₃), Reaction time (hr): a; 0, b; 0.5, c; 1, d; 3, e; 6, f; 12, g; 24, i; 48

감소하여 steay state에 도달하는 48시간에서는 대부분 fructose나 glucose로 분해되고 일부가 inulobiose인 F₂로 남아 있었다. Inulin의 경우에는 fructo-oligosaccharide (GF₂-GF₃)보다는 inulo-oligosaccharide(F₂~F₄) 등이 생성되며 그외는 돼지감자 추출물과 동일하게 fructose 및 inulobiose(F₂)로 분해되는 양상을 보이고 있다(Fig. 9). Sucrose는 돼지감자 추출물 및 inulin의 가수분해물에서 거의 발견되지 않았다. 이러한 결과는 inulin이 GF의 fructose 중합체이며 또한 endoinulase는 sucrose(GF)를 분해하는 invertase 활성이 거의 없으며 inulin내부의 β-2,1결합을 절단한다는 점을 고려할 때 상반되는 것으로서 이의 해명은 endoinulase 효소의 작용 기작이 규명되어야 가능할 것으로 보인다.

감사의 말

본 연구는 동력자원부 에너지관리공단의 대체에너지기술개발사업비 및 한국과학재단 지정 농업생물신소재 연구센터의 일부 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Abbott, B. J.: Adv. Appl. Microbiol., 20 : 203(1976)

2. Similey, K. I. and Strandberg, G. W.: Adv. Appl. Microbiol., 15 : 13(1972)
 3. 김우연, 변시명, 남백희: 한국식품학회지, 11 : 238 (1979)
 4. Kim, W. Y. and Byun, S. M.: Enz. Microbiol. Technol., 4 : 238(1982)
 5. Guiraud, J. P., Demeulle, S. and Galzy, P.: Biothe-nol. Letters, 3 : 683(1981)
 6. Bajpai, P. and Margaritis, A.: J. Gen. Appl. Microbiol., 31 : 305(1985)
 7. Workman, W. E. and Day, D. F.: Biotechnol. Bioeng., 24 : 1473(1984)
 8. 하영주, 최인호, 김수일: 산업미생물학회지, 17(1989)
 9. 김수일, 하영주: 산업미생물학회지, 50 : 551(1992)
 10. 김수일, 문항식: 한국농화학회지, 30 : 169(1987)
 11. Sato, T., Tosa, T. and Chibata, I.: Arch. Biochem Biophys., 147 : 788(1971)
 12. Maeda, H. and Suzuki, H.: Agric. Biol. Chem., 36 : 1581(1972)
 13. Dickensheets, P. A., Chen, L. F. and Tsao, G. T.: Biotechnol. Bioeng., 19 : 365(1977)

Immobilization and properties of *Streptomyces* sp. S56 endoinulase

Su-II Kim and Ho-Jin Chang (Department of Agricultural Chemistry and Research Center for New Bio-Materials in Agriculture, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea)

Abstract : Endoinulase from *Streptomyces* sp. S56 was immobilized by adsorption on DEAE-cellulose in 0.01 M citrate-sodium phosphate buffer, pH 6.0 and the properties of immobilized and free enzymes were investigated. The immobilized enzyme preparation, having 40 inulase activity units per dried matrix, revealed the maximal activity at pH 4.5~5.5 and 55~60 °C and were most stable at pH 6 and 45 °C. The immobilization caused a drop in optimum pH and affinity toward inulin, a slight increase in optimum temperature, an important increase in thermal stability and maximum reaction velocity. The immobilized endoinulase hydrolyzed the tuber extract of jerusalem artichoke and inulin, mainly into fructose and inulobise, degrading 63 and 78% of the total sugar respectively, within 48 hrs in batch reactor.