

Enterobacter sp. S45 생산 inulin fructotransferase의 정제 및 특성

강수일* · 김수일

서울대학교 농업생명과학대학 농화학과 및 농업생물신소재 연구센터

*농업개발연구소

초록 : *Enterobacter* sp. S45로부터 inulin fructotransferase를 생산, 정제하고 효소적 특성을 조사하였다. 배양상징액의 0.4~0.8 포화(NH₄)₂SO₄ 침전물인 조효소는 DEAE-cellulose column chromatography 및 fast protein liquid chromatography로 정제하였으며 효소의 회수율은 0.9%였고 약 148배의 정제도를 보였다. 정제된 효소는 전기영동상으로 단일 band였으며 분자량은 SDS-PAGE에 의해 42,800으로 나타났다. 이 효소의 최적 pH는 5.5, 최적 온도는 50°C였으며 Mg²⁺이온은 효소활성을 30% 증가시키나 Hg²⁺, Cu²⁺ 및 Fe³⁺이온들은 활성을 강력히 저해하였다. Inulin에 대한 km 값은 1.4 mM, Vmax 값은 0.196 μmole/min이었다. 본 효소는 inulin을 fructose 말단으로부터 fructose 두 분자씩 절단, 환상형인 DFA를 생성하며, 그 결과 inulin 분해산물인 GF, GF₂, GF₃, GF₄ 등도 검출되었다. 중합도에 따른 효소활성을 조사해 본 결과 이 효소는 중합도 4(GF₃) 이상의 fructo 올리고당에만 작용하여 GF₃는 DFA III와 GF로, GF₄는 DFA III와 GF₂로 변환시켰다. 또한 본 효소는 sucrose, raffinose 및 melezitose를 기질로서 이용하지 못하므로 invertase 및 α-glucosidase 활성이 없는 것으로 나타났다(1993년 2월 23일 접수, 1993년 4월 6일 수리).

Inulin fructotransferase(EC 2.4.1.93)는 inulin으로부터 di-D-fructofuranose dianhydride(DFA)를 생산하는 효소로 주로 미생물에서 보고되고 있다. DFA는 두 분자의 fructose가 환상으로 결합한 것으로 1,2' : 2,3' 결합을 한 DFA III, 1,2' : 2,1' 결합을 가진 DFA I 및 2,6' : 1,2' 결합을 한 DFA V 등 세 종류가 발견되고 있다.¹⁻³⁾ 이중 DFA III는 dioxane ring을 가지고 있어 다른 fructo 올리고당들보다 더 안정하며 설탕에 비해 50%의 당도를 가지고 있고 또한 fructo 올리고당들처럼 장내 *Bifidobacterium*의 증식인자로 작용할 것으로 기대되고 있다.⁴⁾ Inulase II라고도 명명되고 있는 inulin fructotransferase는 주로 *Arthrobacter* sp.에서 발견되었으며 DFA III를 생산하는 효소는 *Arthrobacter ureafaciens*,^{5,6)} *A. globiformis*,⁷⁾ *A. ilicis*,⁸⁾ *Arthrobacter* sp. H65-7⁹⁾에서, DFA I을 생산하는 효소는 *Arthrobacter globiformis* S14-3(2)에서 분비되는 것으로 보고되고 있다. 그외에 *Aspergillus fumigatus*에서는 DFA V를 생산하는 것으로 보고하고 있으나³⁾ 관련 효소에 대한 논문은 아직 없다.

이들 효소의 전체적 특성은 inulin을 fructose 말단으로부터 fructose를 두 분자씩 절단, 환상형 결합을 형성

하는 것으로 결과적으로는 DFA 및 inulin의 분해물인 소량의 fructo 올리고당들을 생산하는 것으로 추정되고 있다. 그러나 이들 효소는 작용온도, pH, 기질특이성 등이 서로 다르게 보고되고 있다.⁵⁻⁹⁾ 본 연구에서는 inulin으로부터 DFA III를 생산하는 *Enterobacter* sp. S45를 선 발하고 효소의 생산조건을 조사한 전보¹⁰⁾에 이어 상기 균주에 의하여 생산되는 inulin fructotransferase를 정제하고 이 효소의 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

효소생산

전보¹⁰⁾에서 분리, 동정한 *Enterobacter* sp. S45를 inulin 액체배지를 사용, 5 l 발효조에서 30°C, 300 rpm으로 교반하면서 72시간 배양하여 효소를 생산하였다. 이때 통기조건은 1.5 vvm(volume of air per volume of liquid medium)이었고, AZ 20R 0.01%를 소포제로 사용하였다. 조효소는 원심분리하여 균체를 제거한 배양상징액의 0.4~0.8 포화(NH₄)₂SO₄ 침전물로 하였다.

Key words : Inulin fructotransferase (EC 2.4.1.93), *Enterobacter* sp. S45, di-D-fructofuranose 1,2' : 2,3' dianhydride (DFA III)

Corresponding author : S. I. Kim

DEAE-cellulose column chromatography

50 mM Tris-HCl(pH 7.2) buffer에 평형시킨 DEAE-cellulose column(2.8×20 cm)에 조효소액을 주입, 700 ml의 동일 buffer로 용출 후 다시 NaCl이 0.1, 0.3, 0.4, 0.5 M 함유된 동일 buffer로 단계적으로 용출하였다. 용출속도는 0.7 ml/min, 7 ml/tube로 분획하였으며 각 분획은 280 nm에서 흡광도와 효소활성을 측정하였다.

Fast Protein Liquid Chromatography(FPLC)

50 mM NaCl을 포함한 20 mM sodium acetate buffer (pH 6.0)로 미리 평형시켜둔 Superose® 12 gel column (Pharmacia)에 DEAE-cellulose chromatography로 정제한 효소액 200 µl(4 mg protein/ml)를 주입하여 gel filtration을 행하였다. 0.7 ml/min의 유속으로 동일 buffer로 용출하였다.

Polyacrylamide gel 전기영동

Davis¹¹⁾의 방법을 이용, 12.5% acrylamide gel 농도에서 Tris-HCl buffer(pH 8.48)를 사용하였고 발색은 coomassie brilliant blue R-250으로 하였다. SDS-polyacrylamide 전기영동은 Laemmli¹²⁾의 방법을 따랐으며 단백질 분자량 측정용 marker로는 Sigma제, bovine albumin, egg albumin, pepsin, trypsinogen, lysozyme 등을 사용하였다.

효소의 일반적 성질

작용 최적 pH는 pH 4.0~6.5 범위의 0.1 M citric acid-Na₂HPO₄(McIlvaine) buffer를 사용하여 40°C 에서 1시간 반응 후 각 pH에 대한 효소 활성을 측정하여 구하였으며 최적 온도는 pH 5.5에서 반응 온도를 35~60°C 범위에서 5°C 간격의 각 온도에 대한 효소활성을 조사하여 구하였다.

금속이온의 영향실험은 CoCl₂·6H₂O, MgCl₂·6H₂O, CuCl₂·2H₂O, HgCl₂, FeCl₃·6H₂O, BaCl₂·2H₂O, NiCl₂를 각각 1 mM 농도로, chelating agent로는 EDTA(disodium salt)를, 환원제로는 dithiothreitol과 L-cysteine을 각각 1 mM이 되게 효소액에 첨가하여 30°C 에서 1시간 방치한

후 각각의 효소의 활성을 조사하여 결정하였다.

기질 특이성은 sucrose, GF₂(1-kestose), GF₃(1-nystose), GF₄(1-F-fructofuranosyl nystose), raffinose, mellezitose의 2% 용액을 기질로 사용하여 40°C 에서 24시간 반응시킨 후 TLC로 반응산물을 분석하여 조사하였으며 inulin의 시간에 따른 가수분해 양상은 2% inulin 0.5 ml에 정제 효소액 0.5 ml을 가해 40°C 에서 36시간 동안 반응시키면서 일정 시간별로 반응물을 취해 thin layer chromatography(TLC)로 분석하여 조사하였다.

Km 및 Vmax 값은 inulin을 1~10% 농도로 하여 각 기질 농도별로 40°C 에서 1시간 반응하여 DFA III 생성량을 측정, 초기 속도를 구하고 이로부터 Lineweaver-Burk plot을 작도하여 구하였다. 이때 inulin의 분자량은 5,000으로 계산하였다.¹³⁾

분석방법

효소의 활성은 전보¹⁰⁾의 방법에 따라서 효소에 의해 inulin이 분해되어 생성되는 DFA III의 양을 HPLC 방법으로 정량하여 측정하였다. 효소반응은 1 M sodium acetate buffer(pH 5.5)에 녹인 2% inulin 0.5 ml에 배양액을 효소액으로 하여 0.5 ml를 첨가한 후 40°C 항온수조에서 1시간 반응시켜 행하였으며 효소활성단위 1 unit는 이 조건에서 효소액 1 ml가 1분에 1 µmole의 DFA III를 생성하는 것으로 정하였다. 단백질량은 bovine serum albumin(fraction V)을 표준으로하여 Lowry 등¹⁴⁾의 방법을 일부 수정하여 측정하였다. TLC는 하 등¹⁵⁾의 방법을 사용하였다.

결과 및 고찰

효소의 생산 및 정제

발효조 배양액은 0.22 U/ml의 효소활성을 보유하고 있었으며 배양액의 (NH₄)₂SO₄ 40~80% 포화침전물인 조효소는 비활성도가 0.47 U/mg protein으로 배양상정액에 비해 10.7배 정제되었으며 이때 회수율은 56.1%이었다(Table 1). 조효소를 DEAE-cellulose column chromatography로 정제한 결과 280 nm에서의 단백질 peak가

Table 1. Purification of inulin fructotransferase

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)	Fold
Culture broth	3377.6	148.3	0.0439	100.0	1
(NH ₄) ₂ SO ₄ (40~80%)	176.2	83.2	0.47	56.1	10.7
DEAE-cellulose	9.5	10.0	1.05	6.7	23.9
FPLC	0.2	1.3	6.5	0.9	148.1

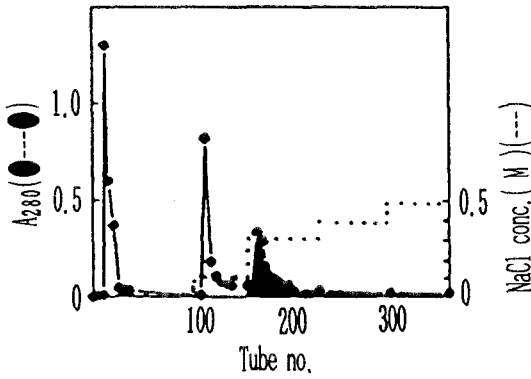


Fig. 1. DEAE-cellulose chromatogram of crude inulin fructotransferase from *Enterobacter* sp. S45. Size of column: 2.8×20 cm, elution with a stepwise gradient of 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2) containing 0, 0.1, 0.3, 0.4, 0.5 M NaCl. The fractions showing inulin fructotransferase activity were indicated with shaded region

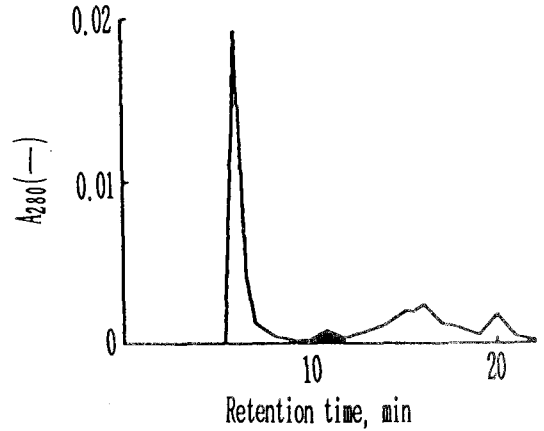


Fig. 3. Fast protein liquid chromatogram of inulin fructotransferase. Elution with 20 mM sodium acetate buffer (pH 6.0) containing 50 mM NaCl. The fraction showing inulin fructotransferase activity was indicated with shaded region

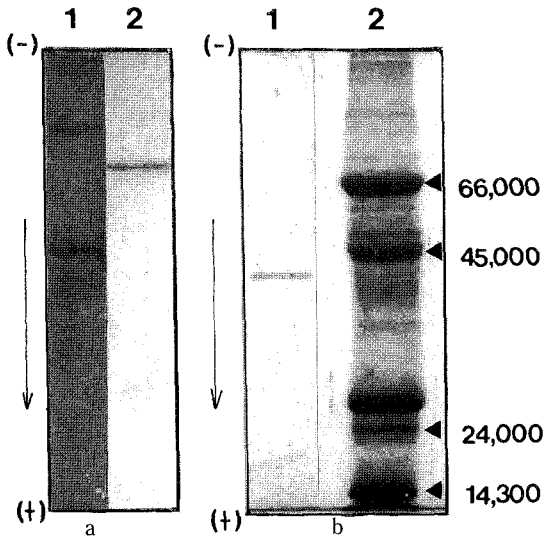


Fig. 2. (a) 12.5% polyacrylamide gel electrophoresis of the DEAE-cellulose eluate (lane 1) and inulin fructotransferase purified on FPLC (lane 2). (b) SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of inulin fructotransferase purified on FPLC (lane 1). Lane 2, molecular weight marker

3개 나타났으며 0.3 M NaCl 용액에서 용출되는 peak와 0.4, 0.5 M NaCl 용액에서 용출되는 분획에서 효소활성을 가지는 것으로 나타났다(Fig. 1). 효소활성을 가지는 분획을 모아 농축한 후 효소활성 및 단백질을 정량한 결과 비활성도가 2.0 U/mg protein으로 배양상징액보다 13.9 배 정제되었고 이때 회수율은 6.7%이었다(Table 1). 효

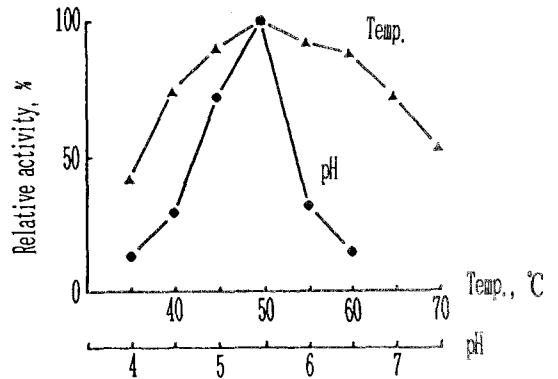


Fig. 4. Effect of pH and temperature on inulin fructotransferase activity. For effect of pH, the enzyme reaction was carried out at 40°C. For effect of temperature, the enzyme reaction was carried out at pH 5.5. ●-●, pH; ▲-▲, Temperature

소활성을 가지는 분획은 전기영동결과 3개의 주단백질 band를 보이고 있어(Fig. 2a, lane 1) 이 효소분획을 순수하게 분리하기 위하여 Superose® 12 column을 사용한 FPLC를 행하였다. 그 결과 4개의 단백질 peak가 분리 되었으며 이중 두번째 peak가 효소활성을 보유하고 있었다(Fig. 3). FPLC에 의해 정제된 효소액의 비활성도는 6.2 U/mg protein으로 배양상징액보다 148배 정제되었고, 회수율은 0.9%이었다(Table 1). 효소활성을 가지는 분획은 전기영동상 단일 band로 나타났으며(Fig. 2a, lane 2), 분자량을 측정된 결과 SDS 전기영동상으로 약 42,800으로 추정되었다(Fig. 2b, lane 1). 지금까지 알려진 *Arth-*

robacter sp.의 inulin fructotransferase들의 분자량은 50,000,^{7,8)} 80,000,⁶⁾ 100,000⁹⁾ 등으로 보고되고 있다.

효소의 일반적 성질

효소 작용 pH는 pH 4.0~6.5의 범위에서 효소활성을 측정하여본 결과 최적 pH는 5.5이었고 pH 5.0~6.5에서 최대활성의 85% 이상의 활성을 나타내어 다른 균주에서 발표된 효소(6~9)와 비슷한 양상을 보이고 있다(Fig. 4). 작용온도는 최적 pH인 5.5에서 온도를 35~60°C 범위에서 5°C 간격으로 변화시키면서 조사해본 결과 50°C에서 최대의 활성을 보였으며 그 이상의 온도에서는 활성이 급격히 감소하였다(Fig. 4). 이러한 온도에 의한 효소활성의 급격한 변화는 다른 균주의 효소보다 심한 것으로 *Arthrobacter ureafaciens*에서는 60°C에서도 최대활성의 75% 이상을 보유하는 것으로 보고하고 있다.⁶⁾

금속이온 및 화학물질의 영향은 효소액에 7가지 금속이온과 EDTA, dithiothreitol 및 L-cysteine 등을 1 mM로 첨가하여 30°C에서 1시간 정치시킨 후 효소활성을 측정한 결과 Mg²⁺ 이온은 효소활성을 30% 정도 증가시켰으나 Hg²⁺, Cu²⁺ 및 Fe³⁺ 이온들은 효소활성을 크게 저해(79~93%)하였으며 특히 Fe³⁺ 이온에 의해서는 효소활성이 완전히 실패되었다(Table 2). 이러한 금속이온의 효소활성에 미치는 영향은 효소를 생산하는 균주마다 달라서 *Arthrobacter ureafaciens*⁶⁾의 효소는 Mg²⁺ 이온에 의해서는 영향을 받지 않았으나 Cu²⁺ 및 Hg²⁺ 이온에 의해서는 강력히 저해받아 본 효소와 비슷한 성질을 나타낸 반면 *Arthrobacter ilicis*⁹⁾와 *Arthrobacter* sp. H65-

7⁹⁾의 효소는 여러 금속이 온도에 별 영향을 받지 않는 것으로 보고되고 있다.

Inulin에 대한 km과 Vmax 값은 inulin 평균 분자량을 5,000¹³⁾으로 하고 Lineweaver-Burk plot을 이용하여 구한 결과 각각 1.4 mM, 0.196 μmole/min이었다.

기질 특이성

본 효소는 sucrose, raffinose, melezitose를 분해하지 못하는 것으로 나타나 *Streptomyces* sp. S56에서 분비되는 endoinulase¹⁵⁾와 같이 invertase 및 α-glucosidase 활성이 없는 것으로 나타났다. 또한 GF₂, GF₃, GF₄를 기질로 사용하여 본 효소를 작용시킨 결과 GF₂는 분해하지 못하고 GF₃는 sucrose와 DFA III로, GF₄는 GF₂와 DFA III로 각각 분해하였다(Fig. 5). 이러한 결과로 본 효소는 inulin을 분해시 fructose 말단으로부터 β-1,2' 결합을 하고 있는 fructose를 두 분자씩 절단함과 동시에 분자내 과당전이 반응에 의해 2,3' 결합을 하여 DFA III를 생산하는 것으로 추정된다. GF₂는 분해하지 못하므로 본 효소는 적어도 중합도 4(GF₃) 이상인 inulin이 기질로 사용될 수 있는 것으로 나타났다. Invertase 및 α-glucosidase 활성은 *Arthrobacter*속^{5,9)}에서 생산되는 효소에서 없는 것으로 발표되고 있으며 GF₂-GF₄의 기질이용성을 보면 *Arthrobacter ureafaciens*⁵⁾ 분비 효소는 본 효

Table 2. Effects of metal ions and some chemicals on inulin fructotransferase activity

Materials(1 mM)	Relative activity(%)
Control	100
Co ²⁺ *	73
Mg ²⁺	130
Cu ²⁺	7
Hg ²⁺	19
Fe ³⁺	0
Ba ²⁺	95
Ni ²⁺	94
EDTA	81
DTT	84
L-cysteine	72

*The metals were used as the chloride salts. Enzyme solution was preincubated with each metal ion or chemicals for 1 hr at 30°C. The activity without metal ions or chemicals is shown as 100%.

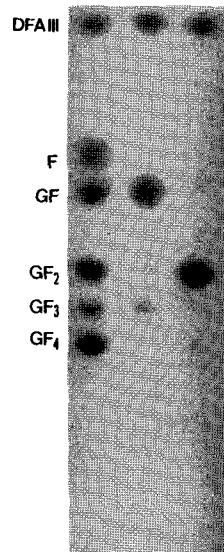


Fig. 5. TLC analysis of the reaction products from inulin with inulin fructotransferase. The enzyme reaction was carried out at 40°C for 24 hr in a reaction mixture containing 0.5 ml/ of enzyme solution, 0.5 ml/ Of 2% inulin dissolved in 0.1 M sodium acetate buffer (pH 5.5). S, standard.

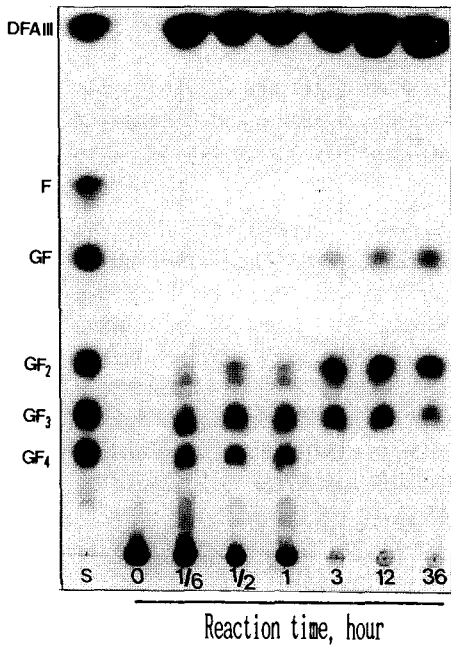


Fig. 6. TLC analysis of the enzyme reaction products on GF₃ and GF₄. The enzyme reaction was carried out at 40°C for 24 hr in a reaction mixture containing 0.5 ml of enzyme solution, 0.5 ml of 2% sugar substrate dissolved in 0.1 M sodium acetate buffer (pH 5.5). S: standard

소와 같은 기질 특이성을 보이나, 이와는 달리 *Arthrobacter* sp. H65-7⁹⁾에서 생산되는 효소는 상기 fructo 올리고당들을 모두 분해하지 못하며 중합도가 훨씬 높은 inulin만을 기질로 이용할 수 있는 것으로 보고하고 있어 본 효소와 다른 기질특이성을 가지고 있는 것으로 생각된다.

작용 양상

시간에 따른 효소의 inulin 분해양상은 분해산물을 TLC로 검정하여 조사하였다. 반응 10분에는 DFA III 및 GF₂, GF₃ 및 GF₄ 외에도 중합도가 5이상인 inulin 분해산물이 나타났으며 30분부터는 중합도가 5 이상인 당들이 점차로 분해되면서 DFA III의 양이 증가함과 동시에 GF₂, GF₃ 및 GF₄ 등의 양도 함께 증가하였다. 그러나 inulin이 거의 분해된 3시간 이후부터는 중합도가 큰 GF₄가 먼저 분해되어 소멸되었고 12시간 이후부터 GF₃가 분해되기 시작하여 GF를 생산하였다. DFA III는 반응시간에 따라 그 양이 계속 증가하는 것으로 나타났다 (Fig. 6). 이는 본 inulin fructotransferase가 inulin의 fructose 말단으로부터 DFA III로 생산한다는 것을 증명하는 것으로서 생각된다. 본 효소는 inulin 반응산물로서

DFA III와 GF, GF₂, GF₃를 생산하였으나 *Arthrobacter ureafaciens*⁵⁾와 *Arthrobacter* sp. H65-7⁹⁾ 효소의 경우에는 GF가 생산되지 않는 것으로 보고되고 있으며 *Arthrobacter* sp. H65-7⁹⁾의 효소는 GF₂도 생산되지 않는 것으로 보고되고 있다. 이러한 효소간의 차이는 효소반응시간이나 첨가한 효소의 양의 차이에 기인할 수 있으나 반응시간이 24시간 및 72시간인 것에 비하면 근본적으로 효소의 성질 차이에 그 원인이 있다고 생각된다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 지정 농업생물신소재 연구센터 1992년도 연구비 지원에 의해 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Tanaka, K., Uchiyama, T. and Ito, A.: *Biochim. Biophys. Acta.*, 284 : 248(1972)
2. Seki, K., Haraguchi, K., Kishimoto, M., Kobayashi, S. and Kainuma, K.: *Agric. Biol. Chem.*, 53(8) : 2089 (1989)
3. Matsuyama, T., Tanaka, K. and Uchiyama, T.: *Agric. Biol. Chem.*, 55(5) : 1413(1991)
4. Yokota, A., Hirayama, S., Enomoto, K., Miura, Y., Takao, S. and Tomita, F.: *J. Ferment and Bioeng.*, 72(4) : 258(1991)
5. Uchiyama, T.: *Biochim. Biophys. Acta.*, 397 : 153 (1975)
6. Uchiyama, T., Niwa, S. and Tanaka, K.: *Biochim. Biophys. Acta.*, 315 : 412(1973)
7. Haraguchi, K., Kishimoto, M., Seki, K., Hayashi, K., Kobayashi, S. and Kainuma, K.: *Agric. Biol. Chem.*, 52(1) : 291(1988)
8. Kawamura, M., Takahashi, S. and Uchiyama, T.: *Agric. Biol. Chem.*, 52(12) : 3209(1988)
9. Yokota, A., Enomoto, K. and Tomita, F.: *J. Ferment and Bioeng.*, 72(4) : 262(1991)
10. 강수일, 김수일: *한국산업미생물학회지*, 21(1) : 36 (1993)
11. Davis, B. J.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121 : 404(1964)
12. Laemmli, U. K.: *Nature(London)*, 227 : 680(1970)
13. McDonald, E. J.: *Adv. Carbohydr. Chem.*, 2 : 253 (1946)
14. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. C. and Randall, R. J.: *J. Biol. Chem.*, 193 : 265(1951)
15. 하영주, 최언호, 김수일: *한국산업미생물학회지*, 17 : 593(1989)

Purification and properties of inulin fructotransferase (Depolymerizing) from *Enterobacter* sp. S45

Su-Il Kang* and Su-Il Kim (Department of Agricultural chemistry and Research center for New Bio-materials in Agriculture, *Institute of Agricultural science and Development, College of Agriculture and Life science, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea)

Abstract : Inulin fructotransferase from *Enterobacter* sp. S45 was purified with DEAE-cellulose column chromatography and fast protein liquid chromatography. The purified enzyme gave a single band on polyacrylamide gel electrophoresis. The molecular weight was estimated to be 42,800 by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The optimal pH and temperature for the enzyme reaction were pH 5.5 and 55°C, respectively. Mg^{2+} activated the enzyme activity, but Fe^{3+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} significantly inhibited. After exhaustive digestion of inulin by the enzyme, DFA III, sucrose, 1-kestose and nystose were produced. Sucrose, 1-kestose, raffinose and melezitose can't be used as substrates by the enzyme, but nystose and 1-F-fructofuranosyl nystose were hydrolysed. The K_m and V_{max} for inulin of the enzyme were 1.4 mM and 0.196 $\mu\text{mole}/\text{min}$, respectively.