

Aspergillus sp. BY-54가 생산하는 Dextranase의 정제 및 특성

방병호 · 이진영
서울보건전문대학 식품영양과

Purification and Characterization of Dextranase from *Aspergillus* sp. BY-54

Byung-Ho Bang · Jin-Young Lee

Department of Food and Nutrition, Seoul Health Junior College, Seongnam 461-250, Korea

Abstract

Aspergillus sp. BY-54 which produced a strong dextran hydrolyzing enzyme was isolated from soil. Using this strain, the optimal cultural conditions, enzyme purification and characterization were studied. The results are as follows : The optimal concentration of dextran as carbon source was 1%, and the optimum temperature and the initial pH for enzyme production was 30°C, and 7.0, respectively. Dextranase was purified by DEAE-cellulose column chromatography with a linear gradient increase in NaCl. K_m value of dextranase was 0.222%, and several glucans containing various types of glucosidic linkages such as DEAE-sephadex, CM-sephadex and sephadex G-100 were almost digested to a large extent with this dextranase. The enzyme was strongly inhibited by sodium fluoride, $KMnO_4$ and p-CMB, while KCN caused 20% of activation.

Key words : dextranase, *Aspergillus* sp.

서론

*Penicillium*속 균의 배양액으로부터 dextran을 분해하는 활성을 띤 물질이 발견된 이후^{1,2)} dextranase에 관한 연구가 시작되었다. 지금까지 보고된 미생물에 의해 만들어지는 dextranase(E. C. 3. 2. 1. 11)는 dextran을 크기가 보다 작은 중합체로 무작위로 자르는 endodextranase^{3~5)}와 dextran의 말단으로 부터 glucose단위로 자르는 exodextranase⁶⁾로 분류된다.

Dextran은 일반적으로 많은 미생물로부터 설탕을 함유한 배지에서 만들어지며⁷⁾, 공업적으로 중요한 glucose의 중합체인 다당류의 일종이다. Dextran의 부분가수분해산물은 혈액증량제, 대용혈장 등으로 이용되는 반면에 구강에서 치석을 형성함으로써 충치의 원인이 되기도 한다^{8~9)}.

본 연구에서는 설탕공업과 충치예방에 효용이 큰

dextranase를 배양액으로 다량 분비하는 *Aspergillus* sp. BY-54 균주를 분리 선별하여 보다 저렴한 가격으로 효소를 생산하고자 전보¹⁰⁾에서 몇 가지 최적 생산 조건을 검토하였으며 여기에서는 효소를 부분 정제하여 효소의 몇 가지 특성을 조사하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 미생물과 배양

본 실험에 사용한 미생물은 *Aspergillus* sp. BY-54였다. 이 균주는 토양시료로부터 평판도말법으로 분리하여 dextranase을 강하게 분비하는 균으로 선별되었다¹⁰⁾ 효소생성을 위한 배지로 dextran 1%, NH_2NO_3 0.1%, K_2HPO_4 0.05%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, NaCl 0.05%로 조제하여 pH 6.8로 조절, 120°C에서 15분간 살균한 다음 곰팡이 포자를 1백금이 접종한 뒤 30°C에서 5일간 정치배양하여 배양액을 효소원액으로 사용하였다.

2. 효소활성

효소활성은 Dinitrosalicylic acid(DNS)법으로 분석하였다¹⁰⁾. 0.01M- McIlvaine buffer 용액에 기질로서 0.5% dextran 용액 0.5ml를 넣고, 여기에 효소 용액 0.1ml과 0.01M-McIlvaine buffer 0.4ml를 첨가하여 전 용량을 1ml로 하고 50°C에서 10분간 반응시킨 다음 1.0ml DNS시약을 첨가하여 반응을 정지시키고 5분간 가열하였다. 그리고 증류수 8ml를 첨가하여 희석한 다음 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

Dextranase의 1 unit는 위의 조건에서 1분당 1 μ M D-glucose에 상당하는 환원당의 생성으로 나타내었다.

3. 조정제

75% acetone 침전물을 3,500 rpm에서 원심분리하여 이 침전물을 0.01M-McIlvaine buffer(pH 7.0)로 equilibrate된 DEAE- cellulose column을 사용하여 조정제 하였다. 이 column의 크기는 20×180mm 이고 유속은 시간당 20ml로 되게 하여 5ml 씩 분취하여 각각을 분리하였다.

결과 및 고찰

1. 효소생성에 미치는 Dextran 농도의 영향

Dextranase생성에 미치는 탄소원으로서 초발 최적 농도를 알아보기 위하여 0.01%에서 5%까지 조제하여 30°C에서 5일간 정지 배양후 효소활성과 건조균체량을 측정한 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 1%이상에서 효소활성이 최대로 나타났으며 그 이상의 농도에서는 똑같은 활성을 보여주었다. 또한 균의 생육도 효소활성과 같은 곡선을 보여주었다.

2. 효소생성에 미치는 배양온도의 영향

배양온도를 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 및 40°C로 각각 달리하여 효소생성을 관찰한 결과는 Fig. 2에서 처럼 효소활성 및 균 생육에는 30°C가 가장 양호한 것으로 나타났다.

3. 효소 생성에 미치는 pH의 영향

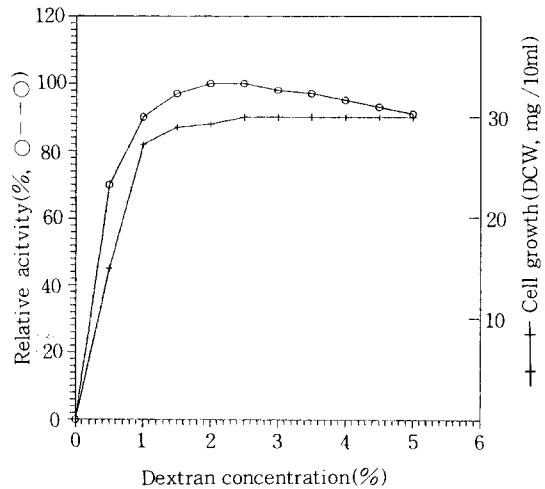


Fig. 1. Effect of dextran concentration in cultural medium on enzyme production.

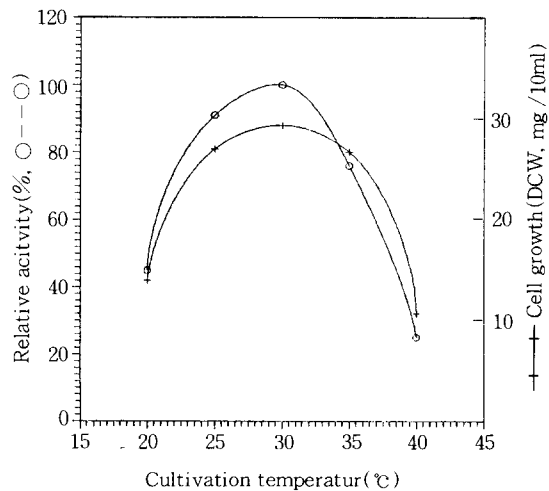


Fig. 2. Effect of cultural temperature on enzyme production.

초발 pH를 3에서 11까지로 조제한 후 30°C에서 5일간 정지배양하여 그 여액으로 효소활성을 측정하였다. 그 결과는 Fig. 3에서와 같이 효소활성은 pH 7에서, 균 생육에는 pH 6에서 가장 좋은 결과를 나타내었다.

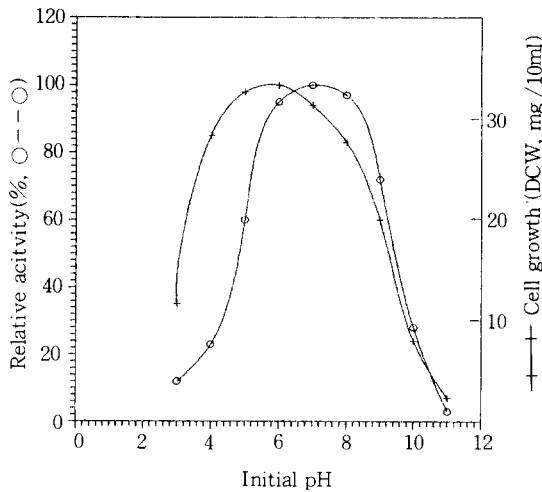


Fig. 3. Effect of initial pH on enzyme production.

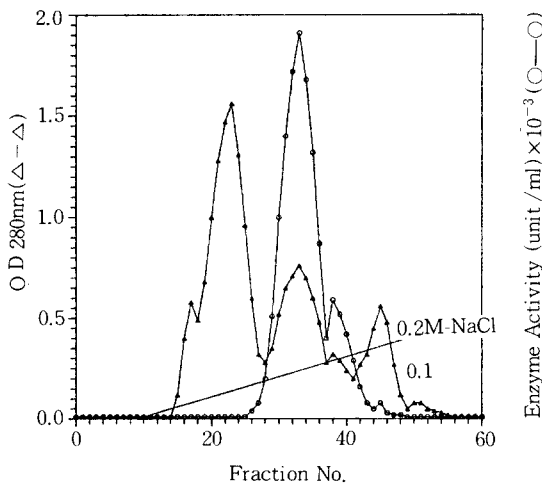


Fig. 4. DEAE-Cellulose column chromatography.

Charged sample : 75% acetone ppt(3500rpm 20min)
 column size (20×180mm)
 0.01M McIlvaine buffer (pH 7.0), Elution speed
 20ml/hr, Fraction Vol. 5ml /tube

4. Dextranase의 정제

Acetone 침전물을 0.01M-McIlvaine buffer로 용해시킨 다음 DEAE-cellose column chromatography에 흡착시켰다. 흡착된 효소는 상동 buffer와 0.2M-NaCl을 함유시킨 buffer로 linear gradient로 용출시켰다. 20ml/hr 유속에서 5ml 씩 fraction하고, 이 fraction 각각의 dextranase의 활성을 측정하였다 (Fig. 4).

이때 유출되어 나오는 단백질의 함량은 280nm에서의 흡광도를 측정하여 그 값으로 표시하고 각 fraction의 효소활성을 측정할 때 fraction 29~36번의 것을 모아 효소의 성질을 조사하였다.

5. 기질 특이성

효소의 기질로 dextran을 제외한 glucosidic lin-

Table 1. Substrate specificity of dextranase

Substrate	Relative activity(%)
Dextran	100
DEAE-Sephadex	90
CM-Sephadex	100
Sephadex G-100	102

Dextranase was mixed with 0.1% of each substrate and 0.01M-McIlvaine buffer(pH 7.0) and incubated for 10 min at 50°C

Table 2. Effect of inhibitors on dextranase activity

Chemicals	Relative activity(%)
None	100
EDTA-2Na	89
KCN	120
Thiourea	105
KMnO ₄	48
Sodium fluoride	12
Sodium azide	96
SDS	100
p-CMB	52
Iodoacetate	100

The inhibitors examined were previously dissolved in the dextran solution as the substrate and the final concentration of inhibitor was 1mM.

kage를 한 DEAE-sephadex CM-sephadex 및 Sephadex G-100을 사용하여 dextranase의 활성을 측정 한 결과 모두 다 거의 비슷한 활성을 나타내었다(Table 1).

6. 저해제의 영향

본 효소의 활성에 영향을 미치는 저해제의 영향을 검토한 결과는 Table 2와 같다. KCN은 오히려 activator로 작용하였으며 sodium fluoride, KMnO_4 및 p-CMB 등은 강한 저해 작용을 나타내었다.

7. Dextranase의 K_m 치

Dextran을 기질로 하여 dextranase의 반응속도에 대한 기질농도의 효과를 조사한 바는 다음과 같다 (Fig. 5). 그림에서와 같이 K_m 치는 0.222%로 나타났다.

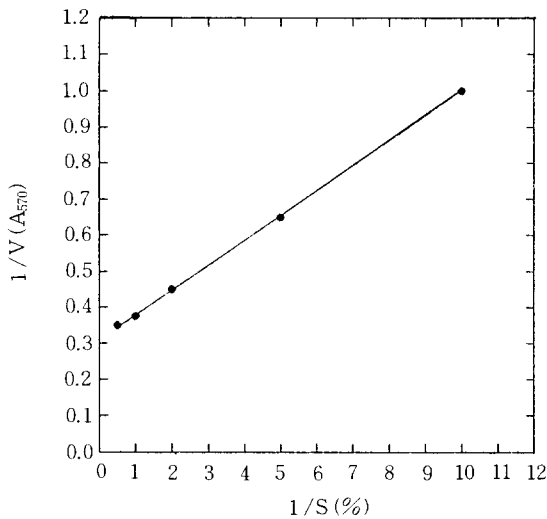


Fig. 5. Lineweaver-Burk plot for hydrolysis of soluble dextran.

요 약

토양 시료로부터 dextran을 강하게 분해하는 *As-*

pergillus sp. BY-54 균주는 분리 선별하고 이 균을 이용하여 dextranase 생성 최적 조건을 검토하였으며 또한 이 효소를 조정제하고 효소학적 특성을 조사한 결과는 다음과 같다.

탄소원으로서는 dextran의 최적농도는 1%이었으며, 효소생성 최적 온도는 30°C, 그리고 효소생성에 미치는 초발 pH는 7로 나타났다. *Aspergillus* sp. BY-54가 생성하는 dextranase를 DEAE-cellulose column chromatography 법으로 2단계 NaCl농도 구배로 용출함으로서 조정제하였다. Dextranase의 K_m 은 0.222%이었으며 glucosidic linkage를 한 DEAE-sephadex, CM-sephadex 및 Sephadex G-100을 기질로 하였을 때도 dextran을 기질로 한 경우와 비슷한 활성을 보였으며, 저해제로서 sodium fluoride, KMnO_4 및 p-CMB등은 본 효소를 강하게 저해하였다. KCN은 오히려 본 효소를 20%정도로 활성화시켰다.

참고문헌

1. Nordström, L. and Hultin, E. : *Sven. Kem. Tidskr.*, **60**, 283(1984)
2. Ingelman, B. : *Acta. Chem. Scand.* : 2803(1948)
3. Carlson, V. W. and Carlson, W. W. : *Science*, **115**, 43(1952)
4. Tsuchiya, H. M., Jeanes, A., Bricker, H. M. and Wilham, C. A. : *J. Bacterol.*, **64**, 513(1952)
5. Kobayashi, T. : *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **28**, 494(1954)
6. Zevenhuizen, L.P.T.M. : *Carbohydr. Res.* : **5**, 310 (1968)
7. Sidebotham, R. L. : *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, Vol. 30, ed. by R. S. Tipson and D. Horton, Academic Press, New York, N. Y., P. 371(1994)
8. Bowen, W. H. : *Brit. Deut. J.*, **124**, 347(1968)
9. Fitzgerald, R. J., Keyes, P. H., Stoudt, T. H. and Spinell, D. M. : *J. Am. Deut. Assoc.*,

76, 301(1968)

10. Bang, Byung-Ho : *Annual Bulletin of Seoul Health Junior*, 13, 9(1993)

(1994년 4월 28일 수리)