

Enterobacter sp. S45에 의한 Inulin fructotransferase의 생산

강수일¹ · 김수일*

서울대학교 농업생명과학대학 농화학과 및 농업생물신소재연구센터, ¹농업 개발연구소

Production of Inulin Fructotransferase (Depolymerizing) from *Enterobacter* sp. S45

Kang, Su-II¹ and Su-II Kim*

Department of Agricultural Chemistry and Research Center
for New Bio-materials in Agriculture

¹Institute of Agricultural Science and Development, College of
Agriculture and Life Science, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

Abstract — A bacterial strain, producing extracellular inulin fructotransferase which converts inulin into di-D-fructofuranose dianhydride (DFA) was isolated from soil and presumed as *Enterobacter* sp. The DFA isolated on Bio-gel P2 column was identified as DFA III by high performance liquid chromatography and ¹³C-nmr spectroscopy. The enzyme production was induced by inulin and markedly enhanced by the addition of corn steep liquor and NH₄H₂PO₄ for nitrogen source. Under optimum condition, the enzyme activity in the culture broth reached at maximum, 0.22 unit/ml after cultivation for 72 hour.

Sucrose에 fructose가 β-2,1 결합으로 중합되어 있는 inulin의 효소분해산물은 대부분 식물의 저장 및 발아과정 중에서 먼저 발견되었으며 fructose만의 중합체인 F₂, F₃ 등의 inulooligosaccharides, GF₂, GF₃ 등의 fructooligosaccharides 및 fructose 두 분자가 탈수결합, 환상을 한 di-D-fructofuranose dianhydrides(DFA) 등이 보고되고 있다(1-4). 이들 oligosaccharide들은 비소화성 당으로 근래 장내 *Bifidus*균의 증식인자로 인식되는 등 여러가지 유용한 생리활성을 보유한 것으로 알려지고 있어 미생물 효소를 이용한 이들의 생산연구가 진행되고 있다(5, 6). 이중 DFA는 inulin으로부터 분자내의 fructose전이 반응에 의해 두개의 fructose가 두 곳에서 탈수 결합하여 생성되는 것으로 dioxane ring을 가지고 있어 fructooligosaccharide보다 더 안정하다(7). 이는 inulin의 산가수분해물에서 처음 발견되었으나(8), 이를 생산하는 효소인 inulin fructotransferase(depolymerizing)(E.C. 2.4.1.

93)는 1972년 Tanaka 등에(9) 의해 *Arthrobacter urea-faciens*에서 처음으로 보고되었으며 이후 inulin fructotransferase에 의해서 생산되는 DFA는 1,2' : 2,3' 결합을 가진 DFA III(9-11) 이외에 1,2' : 2,1' 결합을 가진 DFA I(12-15) 및 최근에는 2,6 : 1,2 결합을 가진 DFA V도 보고되고 있다(16). 따라서 이들 효소는 inulin에 대한 작용 특이성에 있어서도 다르며 또한 효소활성에 대한 금속이온의 영향 등 일반 효소의 특성도 상이하게 보고되고 있다(11-13, 17, 18).

본 연구에서는 일차적으로 inulin으로부터 DFA를 생산하는 균주를 선발하고, 생산된 DFA를 분리, 동정하였으며 이에 관련된 효소인 inulin fructotransferase의 생산조건을 조사하였다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 동정

토양으로부터 inulin fructotransferase 생산균주를 분리하기 위하여 inulin이 탄소원으로 사용된 inulin 고체배지(19)에서 자라는 균주를 1차선발하였으며 이

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

들 선발된 균주들을 inulin 액체배지에 접종, 30°C 에서 24시간 진탕배양한 후 배양액의 DFA 존재 여부를 TLC로 검정하였다. 분리한 DFA 생산균주의 동정은 Bergey's manual of systematic bacteriology(20)에 따라 행하였다.

DFA의 분리와 동정

DFA는 분리한 균주의 96시간 배양액을 효소액으로 사용하여 5% inulin 용액(0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.5)과 40°C 에서 24시간 반응, 가수분해하여 생산하였다. 효소에 의해 생산된 DFA는 Bio-gel P2 column(Bio-Rad사, 1.2×210 cm)에 주입, 물로 65°C 에서 6 ml/hr로 용출, 1 ml/tube로 분획하였다. 각 분획은 총당을 정량한 후 TLC 및 HPLC로 DFA의 순수도를 검정하였다. 순수분리된 DFA 분획은 농축한 후 ¹³C-nmr로 구조를 분석하였다.

효소 생산조건 검토

Inulin 액체배지(19)를 기본배지로 하여, 탄소원의 영향은 inulin 대신에 soluble starch, sucrose, glucose, 돼지 감자즙을 첨가하고 각각의 배지에 균을 접종, 30°C 에서 4일간 진탕배양한 후 배양상징액의 inulin fructotransferase 활성을 측정하여 검정하였으며, 유기질소원의 영향은 yeast extract 대신에 peptone, soybean meal, Bacto-beef, corn steep liquor를, 무기 질소원의 영향은 NaNO₃ 대신에 NH₄H₂PO₄, (NH₄)₂HPO₄, NH₄NO₃를 첨가하여 위와 같은 방법으로 조사하였다.

효소활성 측정

효소의 활성은 효소에 의해 inulin이 분해되어 생성되는 DFA III의 양을 HPLC 방법으로 정량하여 측정하였다. 효소반응은 0.1 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 행하였다. 효소활성단위 1 unit는 이 조건에서 효소액 1 ml가 1분에 1 μmole의 DFA III를 생성하는 것으로 정하였다.

분석방법

TLC는 하 등(21)의 방법으로 n-propanol : ethylacetate : water(2 : 2 : 1) 전개용매에서 2중 전개하고 urea-metaphosphoric acid로 발색하였고, 총당은 fructose를 표준으로한 anthrone법(22)으로 정량하였다.

HPLC에 의한 DFA III의 확인 및 정량은 TOSOH SC 8010 HPLC에서 Amide 80-TM(4.6×250 mm) column을 사용, Acetonitrile : Water(65 : 35) 용매를 유속 1.0 ml/min로 통과시켜 행하였으며 당검출은 RI detector를, 온도는 70°C 를 유지하였다. DFA III 표준물질은 Osaka Kyoiku 대학 Uchiyama 교수로부터 제공받았으며 표준곡선은 DFA III 0.1~2 mg/ml의 농도에서 작성하였고 이 범위에서 DFA III의 peak 면적과 농도는 직선적으로 비례하였다. 균 증식은 590 nm에서의 배양액의 흡광도를 측정하여 표시하였다. ¹³C-nmr spectrum은 Varian VXR-200(200 MHz) spectrometer를 이용, 내부표준물질로는 1,4-Dioxane을, 용매로는 D₂O를 사용하여 얻었다.

결과 및 고찰

균주의 분리 및 동정

토양시료로부터 1, 2차 선발과정을 통해 DFA를 생산하는 균주를 4개 분리할 수 있었으며(Fig. 1), 이들 중 No. 45 균주가 가장 빨리 inulin을 소모하여 이를 실험에 사용하였다. No. 45 균주의 60시간 배양 상징액을 효소액으로 하여 inulin을 가수분해한 반응물을 TLC로 검정한 결과 inulin은 DFA와 소량의 세 종류의 올리고당으로 변환되어서 본 균주는 inulin으로부터 DFA를 생산하는 효소인 inulin fructotransferase를 분비하는 것으로 판명되었다(Fig. 2). 본 균주의 특성을 조사한 결과 간상형, gram 음성이며 주생편모를 가진 facultative anaerobe로 glucose 및 lac-

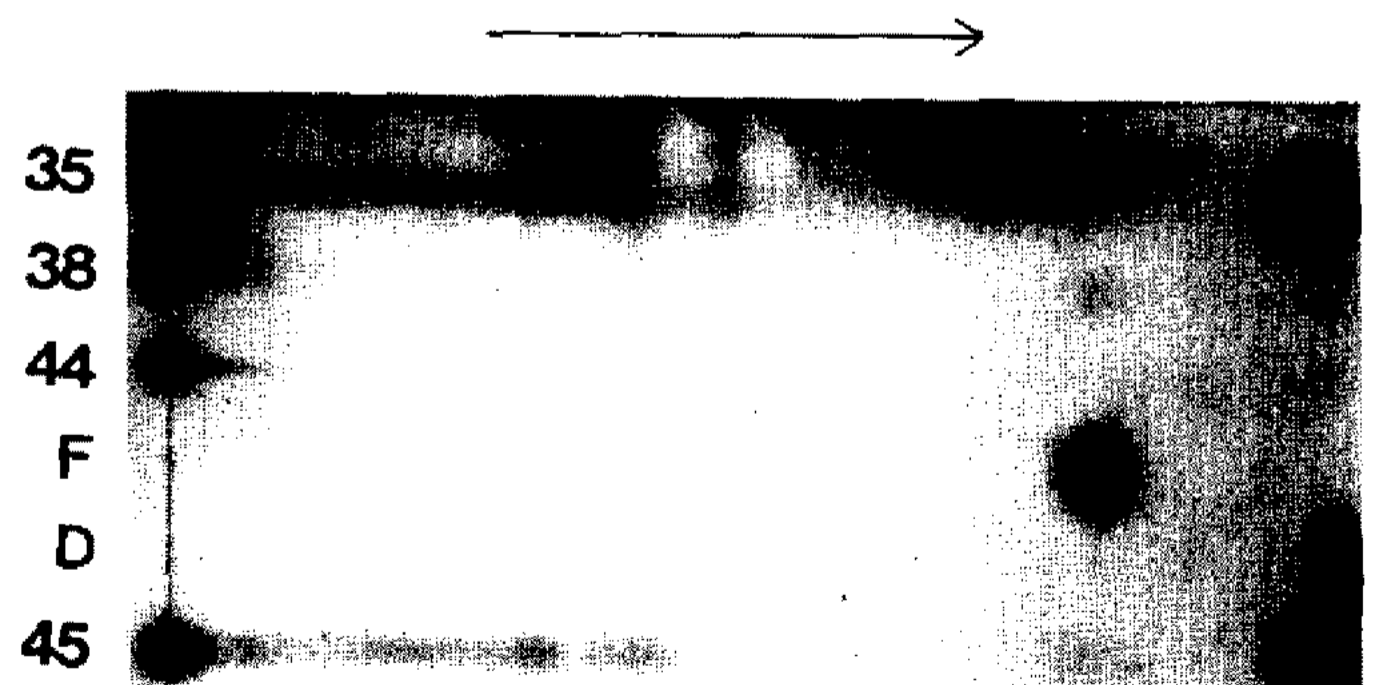


Fig. 1. TLC chromatogram of culture broth of 4 strains.

Incubation was carried at 30°C for 24 hr. Developing solvent was n-propanol:ethylacetate:water (2:2:1). Sugar spots were detected by urea-metaphosphoric acid method.

35, 38, 44, and 45: strain no. D: DFA III F: Fructose

tose를 발효하며 citrate를 이용하나 methyl red test 음성이며 oxidase가 없고 indole 검사는 음성이어서 본 균주는 잠정적으로 *Enterobacter* sp.로 추정하였다.

DFA의 분리 및 동정

No. 45 균주의 96시간 배양액과 inulin을 반응시킨 반응물을 Bio-gel P2 column chromatography로 정제한 결과 두개의 당 peak가 분리되었으며(Fig. 3) 이중 두번째 peak가 TLC 및 HPLC 분석결과 DFA III와 동일한 것으로 나타났다(data not shown). 이의 보다 정확한 동정을 위하여 두번째 peak를 농축한 후 ¹³C-nmr로 분석하였으며 그 결과 chemical shift가 보고된 DFA III(23)와 거의 일치하였다(Table 1). 따라서 본 균주가 분비하는 효소는 inulin으로부터 DFA III를 생산하는 inulin fructotransferase임을 확인할

수 있었다.

효소생산 조건

탄소원의 영향: Inulin 액체기본배지에 각종의 탄소원을 1.5%로 첨가하여 30°C, 96시간 진탕배양하고 효소의 활성을 측정한 결과 inulin을 사용할 때 효소활성이 0.066 U/ml로 가장 높았고 이에 비해 inulin을 함유한 돼지감자 추출물, sucrose, soluble starch에서는 inulin만을 탄소원으로 사용할 때와 비교하여 각각 약 60%, 21%, 12%의 활성을 보였다. Glucose를 사용시에는 균의 성장은 양호하였으나 효소는 생산되지 않았다. 그러므로 본 효소는 DFA III 생산 효소를 분비하는 *Arthrobacter* sp. H65-7 균주(7)에서

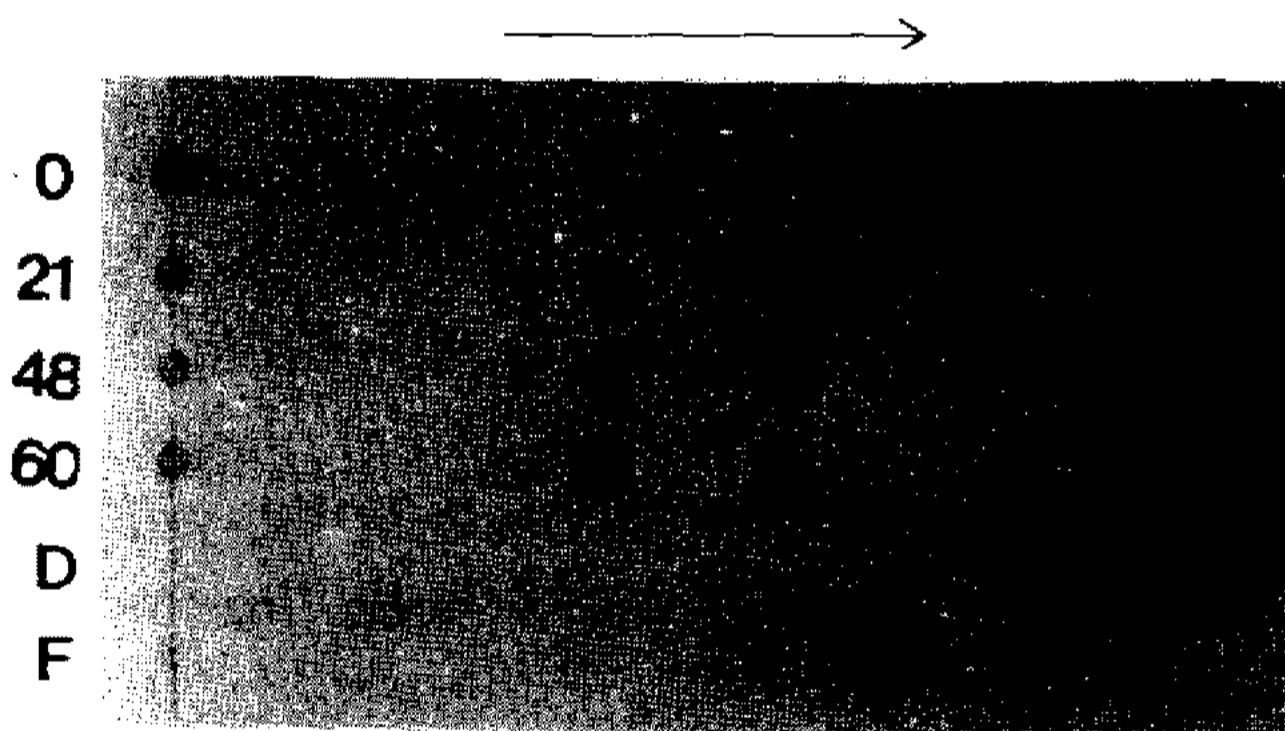


Fig. 2. TLC chromatogram of inulin hydrolysate reacted with culture broth.

The reaction was carried out at 40°C for the indicated period in a mixture containing 0.5 ml of 2% inulin dissolved in 100 mM sodium acetate buffer (pH 5.5), 0.5 ml of the culture broth of 60 hr.

D: DFA III F: Fructose 0, 21, 48, and 60: reaction time(hr)

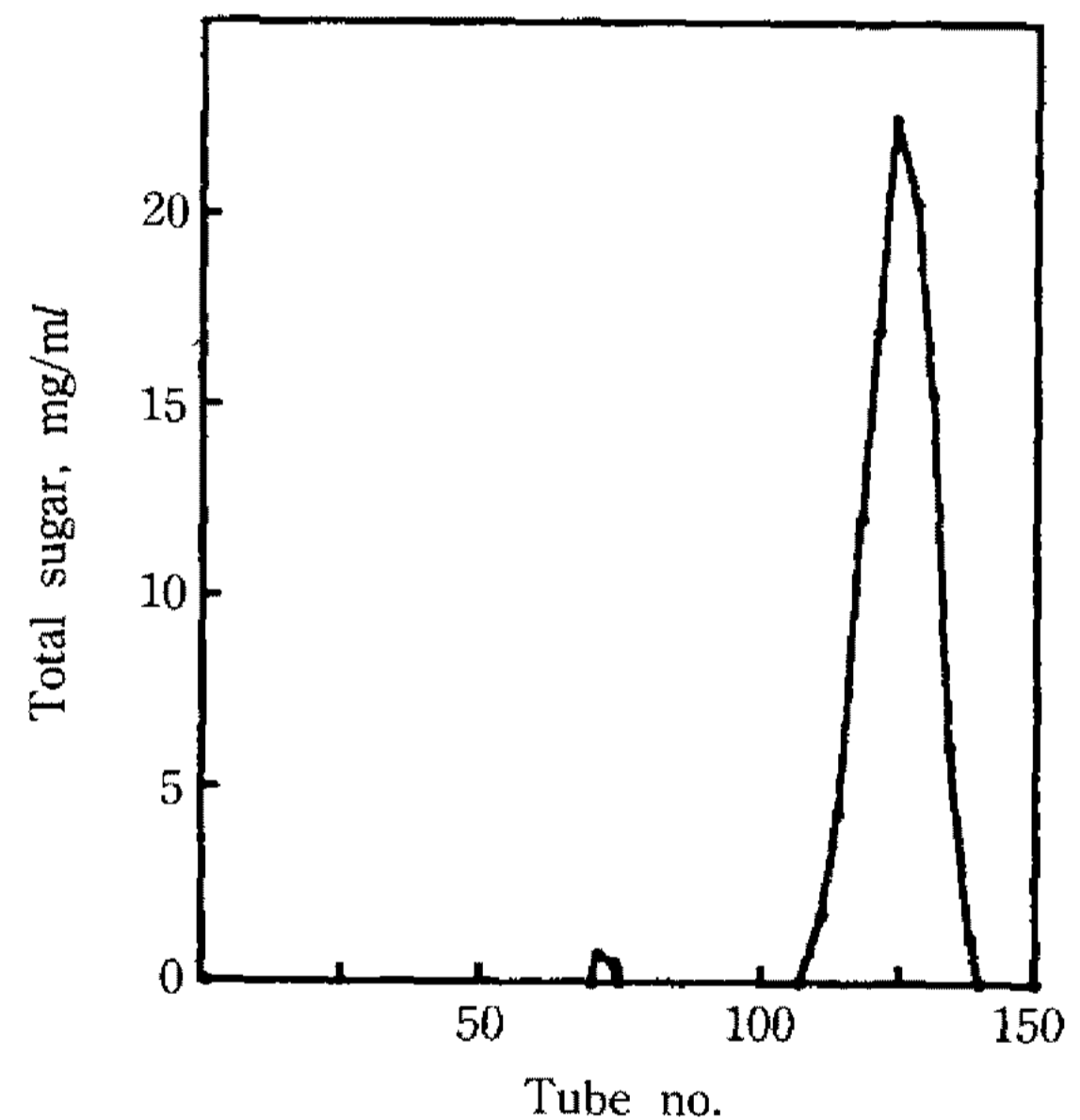


Fig. 3. Bio-gel P2 chromatogram of inulin hydrolysate reacted with culture broth.

Column size: 1.2×210 cm, flow rate: 6 ml/hr, fraction volume: 1 ml/tube, column temperature: 65°C

Table 1. ¹³C-nmr chemical shift of di-D-fructose dianhydride III

Assignment (carbon atom number)	Chemical shift of ¹³ C resonance of	
	α-D-fructofuranose	β-D-fructofuranose
2	105.9 (106.0) ^a	103.7 (103.8)
3	83.6 (83.6)	84.3 (84.4)
4	77.9 (77.9)	74.7 (74.8)
5	82.6 (82.6)	81.4 (81.4)
1	65.9 (65.8)	61.4 (61.4)
6	63.1 (63.2)	63.5 (63.5)

^aData in parenthesis are from ref. (23)

와 같이 inulin에 의해 유도되는 효소로 추정되었다.

유기질소원의 영향 : Inulin 액체기본배지에 각종 유기질소원을 1.0% yeast extract의 조단백질량과 동등한 수준으로 첨가하여 탄소원 영향실험과 동일한 방법으로 배양, 효소활성을 조사한 결과 corn steep liquor에서 기본배지의 약 2.5배인 0.168 U/ml로 효소생산이 가장 높았고 soybean meal 및 Bacto-beef에서는 각각 0.095, 0.074 U/ml로 yeast extract 사용시 (0.066 U/ml)보다 효소생산이 더 많았다. 이와는 반대로 *Arthrobacter* sp. H65-7 균주는 yeast extract를 사용했을 때 생산이 가장 높은 것으로 보고하고 있다 (7).

무기질소원의 영향 : Inulin 액체기본배지에 각종 무기질소원을 0.2% NaNO₃의 질소함량과 동일한 수준으로 첨가하여 본 균주를 배양 후 배양액의 효소활성을 조사한 결과 무기질소원으로는 NH₄H₂PO₄를 사용하였을 때 기본배지에서의 2.8배인 0.184 U/ml로 가장 높았으며 (NH₄)₂HPO₄와 NH₄NO₃ 사용시에도 각각 0.096, 0.079 U/ml로 NaNO₃ 첨가시(0.066 U/ml)보다 양호하였다.

이상의 결과를 종합하여 보면 본 실험조건하에서 본 균주의 DFA III 생산 효소의 배지조성은 탄소원으로는 inulin, 유기질소원은 corn steep liquor, 무기질소원으로는 NH₄H₂PO₄를 사용하는 것이 가장 좋은 것으로 판명되었다.

배양시간에 따른 효소생산

Yeast extract 및 NaNO₃ 대신 corn steep liquor, NH₄H₂PO₄를 포함한 inulin 액체기본배지(19)에 본 균주를 접종, 30°C 에서 flask 배양을 하면서 시간에 따른 배양액내의 효소활성, 총당, DFA III 생성량, 균체증식 및 pH의 변화를 조사하였으며 그 결과는 Fig. 4에 나타내었다. Inulin fructotransferase의 생산은 배양 24시간부터 증가하여 72시간에서 0.22 U/ml로 최고치를 나타내었다. 이러한 효소생산량은 지금까지 보고된 효소들과 비교해 볼 때 *Arthrobacter ureafaciens*(17)의 0.05 U/ml에 비해서는 많은 것이지만 *Arthrobacter globiformis* C11-1(10), *Arthrobacter ilicis*(11), *Arthrobacter* sp. H65-7(7)에서는 0.99~90 Units/ml로 보고되고 있다. 균증식은 매우 빨라서 24~36시간에서 steady state에 도달하였으며 균증식에 따라 총당 감소도 같은 양상을 보여 36시간에서 2.35 mg/ml로 급격히 감소하였다. DFA III는 배양초기에 생산, 12시간에서 7.6 mg/ml로 최고값을 보였

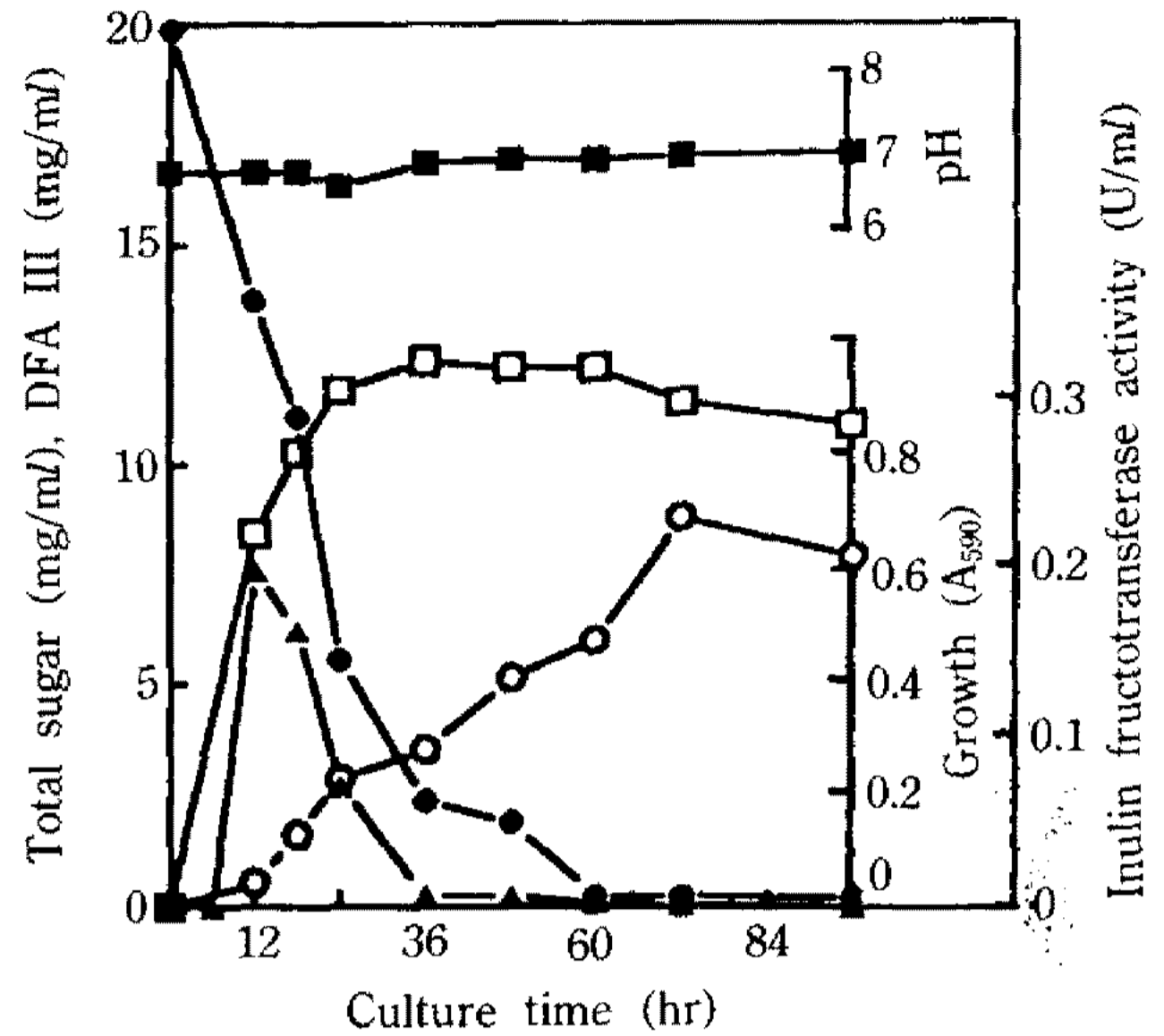


Fig. 4. Time course of inulin fructotransferase production by *Enterobacter* sp. S45.

○; inulin fructotransferase activity, ●; total sugar, ■; pH, □; growth, ▲; DFA III

으나 총당이 현격히 감소된 36시간에서는 거의 존재하지 않았다. 이는 본 균주가 DFA III를 생산하는 능력도 있지만 또한 이를 이용하는 활성도 동시 보유한다는 것을 시사하는 것으로 생각된다. 이러한 DFA III의 배양도중 생성 및 소멸에 대한 결과는 Yokota 등(7)의 *Arthrobacter* sp. H65-7에서도 보고된 바 있으며 또한 Tanaka 등(24)은 *Arthrobacter ureafaciens*의 균체마쇄물에서 DFA III를 inulobiose를 거쳐 fructose로 분해하는 효소활성이 존재함을 보고하고 있어 본 균주에서도 세포내에 DFA III를 분해하는 효소가 존재할 것으로 추정하였다.

요 약

토양에서 inulin으로부터 di-D-fructofuranose di-anhydride(DFA)를 생산하는 inulin fructotransferase를 생산하는 균주로 *Enterobacter* sp. S45를 선발, 분리하였다. 본 효소에 의하여 생산되는 DFA는 ¹³C-nmr과 HPLC로 분석한 결과 fructose 두 분자가 β1,2' : α2,3' 결합을 한 DFA III로 동정되었다. 본 균주는 탄소원으로 inulin, 유기질소원으로 corn steep liquor, 무기질소원으로 NH₄H₂PO₄를 사용할 때 효소생산이 가장 많았으며 이 조건하에서 72시간 배양으로 최대 효소생산을 보였다. 균 배양중 배양액내에 DFA III가 생성되었다가 소멸되는 것으로 보아 균체내에 DFA III를 분해, 이용하는 효소가 존재한다고 추정되었다.

감사의 말

본 연구는 한국과학재단 지정 농업생물신소재연구센터 1991년도 연구비 지원에 의해 수행된 것으로 이에 감사드리며 또한 DFA 표준물질을 제공하여준 Osaka Kyoiku 대학 Uchiyama 교수에게도 고마움을 표합니다.

참고문헌

- Bacon, J.S.D. and J. Edelman. 1951. The carbohydrates of the jerusalem artichoke and other compositae. *Biochem. J.* **48**: 114-126.
- Pollock, C.J. and N.J. Chatteron. 1988. Fructans in The Biochemistry of Plants. Academic Press. New York. **14**: 109-140.
- Whistler, R.L. and C.L. Wmart. 1973. Fructans in higher plants in Polysaccharide Chemistry. Academic Press. New York. 276-310.
- Uchiyama, T. 1983. Formation of di-D-fructose anhydride from inulin by the root of *Lycoris radiata* Herbert. 1983. *Agric. Biol. Chem.* **47**(2): 437-439.
- Hidaka, H., T. Eida, T. Takijama, T. Tokunaga and Y. Tasluro. 1986. Effect of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health. *Bifidobacteria Microflora.* **5**: 37-50.
- Hidaka, H. 1983. Fructooligosaccharide, a newly developed food material for health. *Kogaku to Seibutsu.* **21**: 291-293.
- Yokota, A., S. Hirayama, K. Enomoto, Y. Miura, S. Takao and F. Tomita. 1991. Production of inulin fructotransferase (depolymerizing). by *Arthrobacter* sp. H65-7 and preparation of DFA III from inulin by the enzyme. *J. Ferment. and Bioeng.* **72** (4): 258-261.
- Jackson, R.F. and S.M. Goergen. 1929. *Bur. Stand. J. Res.* **3**: 27-38.
- Tanaka, K., T. Uchiyama and A. Ito. 1972. Formation of di-D-fructofuranose 1,2': 2,3' dianhydride from inulin by an extracellular inulase of *Arthrobacter ureafaciens*. *Biochim. Biophys. Acta.* **284**: 248-256.
- Haraguchi, K., M. Kishimoto, K. Seki, K. Hayashi, S. Kobayashi and K. Kainuma. 1988. Purification and properties of inulin fructotransferase (depolymerizing) from *Arthrobacter globiformis* C 11-1. *Agric. Biol. Chem.* **52**(1): 291-292.
- Kawamura, M., S. Takahashi and T. Uchiyama. 1988. Purification and some properties of inulin fructotransferase (depolymerizing) from *Arthrobacter ilicis*. *Agric. Biol. Chem.* **52**(12): 3209-3210.
- Seki, K., K. Haraguchi, M. Kishimoto, S. Kobayashi and K. Kainuma. 1989. Purification and properties of a novel inulin fructotransferase (DFAI-producing) from *Arthrobacter globiformis* S14-3. *Agric. Biol. Chem.* **53**(8): 2089-2094.
- Matsuyama, T. and K. Tanaka. 1989. On the enzyme of *Aspergillus fumigatus* producing difructose anhydride I from inulobiose. *Agric. Biol. Chem.* **53**(3): 831-832.
- Matsuyama, T., K. Tanaka, M. Mashiko and M. Kamamoto. 1982. Enzymic formation of di-D-fructose 1,2': 2,1' dianhydride from inulobiose by *Aspergillus fumigatus*. *J. Biochem.* **92**: 1325-1328.
- Tanaka, K. K. Sonobe, T. Uchiyama and T. Matsuyama. 1979. Enzymic formation of di-D-fructose 1,2': 2,1' dianhydride by *Aspergillus fumigatus*. *Carbohydrate Res.* **75**: 340-344.
- Matsuyama, T., K. Tanaka and T. Uchiyama. 1991. Isolation and identification of the *Aspergillus fumigatus* difructose dianhydride. *Agric. Biol. Chem.* **55**(5): 1413-1414.
- Uchiyama, T., S. Niwa and K. Tanaka. 1973. Purification and properties of *Arthrobacter ureafaciens* inulase II. *Biochim. Biophys. Acta.* **315**: 412-420.
- Uchiyama, T. 1975. Action of *Arthrobacter ureafaciens* inulase II on several oligofructans and bacterial levans. *Biochim. Biophys. Acta.* **397**: 153-163.
- Kawamura, M., T. Uchiyama, T. Kuramoto, Y. Tamura and K. Mizutani. 1989. Formation of a cycloinulooligosaccharide from inulin by an extracellular enzyme *Bacillus circulans* OKUMZ 31B. *Carbohydrate Res.* **192**: 83-90.
- Krieg, N.R. 1984. Bergey's manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1. Williams and Wilkins Press. Baltimore/London.
- 하영주, 최언호, 김수일. 1989. *Streptomyces* sp. S56 으로부터 endo형 inulase의 생산. *산업미생물학회지.* **17**: 593-599.
- Weiner, J. 1978. Determination of total carbohydrate in beer. *J. Inst. Brew.* **84**: 222-223.
- Uchiyama, T. 1982. Anomeric configurations of di-D-fructose anhydride, produced by inulin fructotransferase. *Carbohydrate Res.* **101**: 138-140.
- Tanaka, T., T. Uchiyama, H. Kobori and T. Tanaka. 1975. Enzymic hydrolysis of di-D-fructofuranose 1,2':2,3' dianhydride with *Arthrobacter ureafaciens*. *J. Biochem.* **78**(6): 1201-1206.

(Received January 5, 1993)