

Kluyveromyces marxianus var. *marxianus* IFO 1735에 의한 Inulin Fructotransferase의 생산 및 이용에 관한 연구

김재근* · 坂井拓夫¹

계명전문대학교 식품영양과, ¹大阪府立大學 農學部 應用生物化學科

Studies on the Production of Inulin Fructotransferase by *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* IFO 1735 and Its Application. Jae-Keun Kim* and T. Sakai¹. Department of Food and Nutrition, Keimyung Junior College, Taegu 705-037, Korea, Department of Applied Chemistry, University of Osaka Prefecture, Osaka 591, Japan - *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* isolated as an inulin-assimilating microorganism produces inulin fructotransferase (inulaseII) which catalyses the conversion of inulin into di-D-fructofuranose 1, 2' : 2, 3' dianhydrde (DFAIII). The DFA produced by the organism was isolated by using active carbon column, and identified as DFAIII by high performance liquid chromatography. The culture medium giving maximum inulaseII production was found to consist of 1% sucrose and 0.75% yeast nitrogen base (YNB). The inulaseII production was induced by inulin or sucrose as a carbon source and increased by addition of YNB as a nitrogen source. Optimal initial pH of the culture medium, culture temperature and medium volume for the enzyme production were pH 4.7, 30°C and 140 ml, respectively. Under the optimal conditions described above, the enzyme activity in the culture supernatant reached 4.2 units/ml after cultivation for 36 h. The DFAIII was accumulated at 13.25 mg/ml after 48 h of culture in the *Jerusalem artichoke* tuber medium.

Sucrose에 약 35개의 D-fructose가 β -2,1 결합으로 중합되어 있는 inulin은 *Jerusalem artichoke*(*Helinthus tuberosus* L), *Compositae*, *Campanulaceae* family 및 *chicory*와 같은 식물의 저장 탄수화물이다(1-3). 특히 돼지감자는 괴경의 약 80%가 inulin으로 이루어져 있고(4) 기후와 토양에 대한 적응력과 번식력 및 내병성, 내충성이 강하여 단위 면적당 생산성이 높아(5) 과당(6), 후락토올리고당(6, 7) 및 에타놀(8, 9) 등의 생산에 잠재적인 생산작물로 기대되고 있다. inulin의 효소분해산물은 대부분 식물의 저장 및 발아과정 중에서 최초로 발견되었으며 fructose만의 중합체인 F₂, F₃ 등의 inulooligosaccharides, GF₂ (ketose), GF₃ (Nystose), GF₄ (fructofranosyl nystose) 등의 fructooligosaccharides 및 fructose 두 분자가 탈수 결합, 환상을 한 di-fructofuranose dianhydrides(DFA) 등이 보고되고 있다(2, 10-12, 26).

이들 oligosaccharide들은 비만, 당뇨, 충치의 예방효과(7, 13)와 *bifidus*유용균의 증식인자(7, 13, 14)로 인식되는 등 여러 가지 생리활성을 가지는 기능성당으로, 설탕의 50% 감미도(13)를 가지는 설탕 대체 감미료로 이

용 될 전망이다.

이 중 DFA는 inulin으로부터 분자내의 fructose가 두 곳에서 탈수 결합하여 생산되는 것으로 dioxane ring을 가지고 있어 fructooligosaccharide보다 안정하다(13). 이는 원래 inulin의 산 가수분해 산물중에서 발견된 이래, 미생물 효소분해에 의해서 DFAI(15-18), DFAIII(20-22), DFAV(23)의 3종류가 발견되어 있다. 이 중 D-fructose 두 분자가 1,2':2,3'결합으로 된 di-fructofuranose 1,2':2,3'dianhydride (이하 DFAIII로 칭함)는 1972년 Tanaka 등(19)이 *Arthrobacter ureafaciens*가 생성하는 inulin fructotransferase(depolymerizing) (EC 2.4.1.93) (이하 InulaseII로 칭함)의 작용에 의해 inulin으로부터 생성되었음을 처음 보고하였다. 그 후 1974년 Shirasawa 등(23)은 *Arthrobacter ureafaciens*를, 1991년 Yokoda 등(13)은 *Arthrobacter* H65-7를, 그리고 1993년 강과 김(24)은 *Enterobacter* sp. S45를 배양액으로 부터 각각 DFAIII를 분리·정제하였다.

DFAIII를 생산하는 효소인 inulaseII의 생성조건(13, 24)과 정제 및 특성(20, 21-25) 등이 보고되어져 있다. 그러나 연구 대상 균주가 대부분 *Arthrobacter* sp.에 국한되어 있다(19-21, 23, 25). 따라서 본 논문에서는 inulin 기본 액체배지에서 성장하면서 inulaseII를 분비하는 효모를 선별한 후 inulaseII의 생성조건 및 이용성을 검토하여 그 결과를 보고하고자 한다.

*Corresponding author

Tel. 82-53-620-2639, Fax. 82-53-627-7225

E-mail: lsx@kw.keimgung-c.ac.kr

Key words: *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*, Inulin fructotransferase, di-D-fructofuranose 1,2':2,3' dianhydride (DFAIII)

재료 및 방법

Inulase II 생성균의 분리 및 선별

오사카 부립대학 부속농장에서 채취한 토양은 멸균수로 3단 희석한 현탁액 100 μ l를, 동 대학 발효제어화학연구실의 보존균액을 50 μ l를 각각 5 ml의 GYP액체배지 (glucose 2%, yeast extract 1%, peptone 2%, pH 5.5)에 접종하여 30°C에서 48시간 진탕배양(120 rpm)하였다. 이들 배양액 100 μ l를 inulin을 유일한 탄소원으로 하는 분리용 배지(inulin 1%, YNB 0.7%, agar 1.5%, pH 5.0)에 접종, 30°C에서 배양하여 colony 생성이 비교적 양호한 균주를 1차 선별하였다. 선별된 균주들을 inulin-YNB 액체배지에 접종하여 30°C에서 48시간 진탕배양한 후 배양액의 DFAIII 존재 여부를 paper chromatography로 검정하고 그 중에서 DFAIII 생성능이 가장 우수한 균주를 공시균으로 선정하였다.

배지 및 배양방법

Inulin 합성배지는 증류수 및 0.1M sodium acetate buffer(pH4.7) 동량 혼합액 1 l에 YNB 7.5 g을 넣어 녹인 후, inulin 20 g을 넣어 60°C에서 가열용해하였다. sucrose 합성배지의 경우는 같은 방법으로 YNB 7.5 g 녹인 것에 sucrose 10 g을 넣어 제조하였다.

돼지감자 열수추출액의 조제는 1995년 11월 경북 영덕군에서 채취한 돼지감자(*Helianthus tuberosus* L)의 괴경 50 g(건조중량)에 증류수 550 ml를 넣어 100°C에서 1시간 추출하여 얻은 340 ml의 추출액을 1N HCl로 pH4.7로 조절·제조하였다. 우엉뿌리 열수추출액의 조제는 대구, 대명시장에서 구입한 50 g(건조중량)를 상기와 같은 방법으로 추출하여 얻은 380 ml를 pH4.7로 조절하여 제조하였다. 이상 4종류의 배양액을 각각 500 ml 후라스크에 140 ml씩 넣어 120°C에서 20분간 가압멸균하였다. 상기 멸균배지에 1%의 종배양액(1.0×10^9 cells/ml)을 접종하여 30°C에서 진탕배양(120 rpm)하였다.

배양액으로부터 DFAIII 분리

빵효모에 의한 발효성 당의 제거 및 활성탄 column chromatography

Inulin-YNB 배지 100 ml에 종균 10 ml를 접종, 30°C에서 24시간 진탕배양하였다. 상기 배양액 280 ml에 hyflo super-cel 2.8 g를 가하고 여과하여 균체를 제거한 후 그 여액을 10분간 열처리하여 효소를 실활시켰다.

이어 균체 제거 배양액 200 ml를 취하여 ketohexose량을 resorcinol-HCl법(27)으로 측정하였다. 110 mg의 빵효모(일동 효모공업 주식회사 제품)를 혼합하여 37°C에서 2시간 보존함으로 발효성 당을 제거하였다. 발효성

당을 제거한 용액에 2 g의 hyflo super-cel을 가하여 상기와 같은 방법으로 효모균체를 제거, 180 ml의 여액을 얻었다. 이어 45°C에서의 감압·농축액 22 ml를, 50% ethanol 1 l 및 증류수 1.5 l로 세척된 활성탄 column(4.1 \times 39 cm)에 흡착시켜 1.8 l의 증류수로 잔류 단당류를 제거한 후 5% ethanol 750 ml로 DFAIII를 용출시켰다. 유속은 116 ml/hr로 하였으며 test tube당 6.6 ml씩 분획하였다. 각 용출액의 ketohexose의 양은 상기법으로 측정하였다.

효소 생산조건 검토

Inulin-YNB 액체배지를 기본배지로 하여, 탄소원의 영향은 inulin 대신 0.75%의 각종 탄소원을 첨가하고 공시균을 접종, 30°C에서 48시간 진탕배양한 후 배양상징액의 inulaseII 활성을 측정하였다. 질소원의 영향은 YNB 대신 1.0%의 각종유기 및 무기질소원을 첨가하여 위와 같은 방법으로 조사하였다.

효소활성 측정

효소활성은 inulin이 분해되어 생성되는 DFAIII의 양을 HPLC 방법으로 정량하여 측정하였다. 효소반응은 0.1 M sodium acetate buffer(pH5.5)에 녹인 2% inulin 0.5 ml에 배양액을 효소액으로 하여 0.5 ml를 첨가한 후 37°C에서 9일간 반응시켜 행하였다. 효소활성단위 1unit는 이 조건에서 효소액 1 ml가 1분에 1 μ mole의 DFAIII를 생성하는 것으로 정하였다.

분석방법

DFAIII를 생성하는 inulaseII 생산균주를 분리하기 위하여 paper chromatography 방법으로 행하였다. 효소반응생성물을 100°C에서 5분간 열처리하여 변성된 단백질을 원심분리로 제거하였다. 이 원심상징액 30 μ l를 여지(Toyo No. 51B)에 점적하여 실온에서 4시간 전개하였다. 전개용매는 n-butanol : pyridine : water(6:4:3, v/v)로 하였으며 각 당의 검출은 알카리성 질산은 용액을 사용하였다.

ketohexose의 양은 resorcinol-HCl 방법(26)으로 정량하였으며 생성 환원당을 DNS법(27)을 이용하여 측정하였다. HPLC에 의한 DFAIII의 확인 및 정량은 ION-pack KS-802 HPLC에서 carbohydrate analysis column (8 \times 300 mm)을 사용, water용매로 유속 0.7 ml/min로 통과시켜 행하였으며 당 검출은 shodex RI SE-11 detector를, 온도는 80°C를 유지하였다. DFAIII 표준곡선은 DFAIII 0.5~5 mg/ml의 농도에서 작성하였다. 균 증식은 혈구계수반(Haematometer)을 사용하여 측정하였다. 단백질 정량은 bovine serum albumin을 표준 단백질로 하여 Lowry법(28)에 따라 측정하였다.

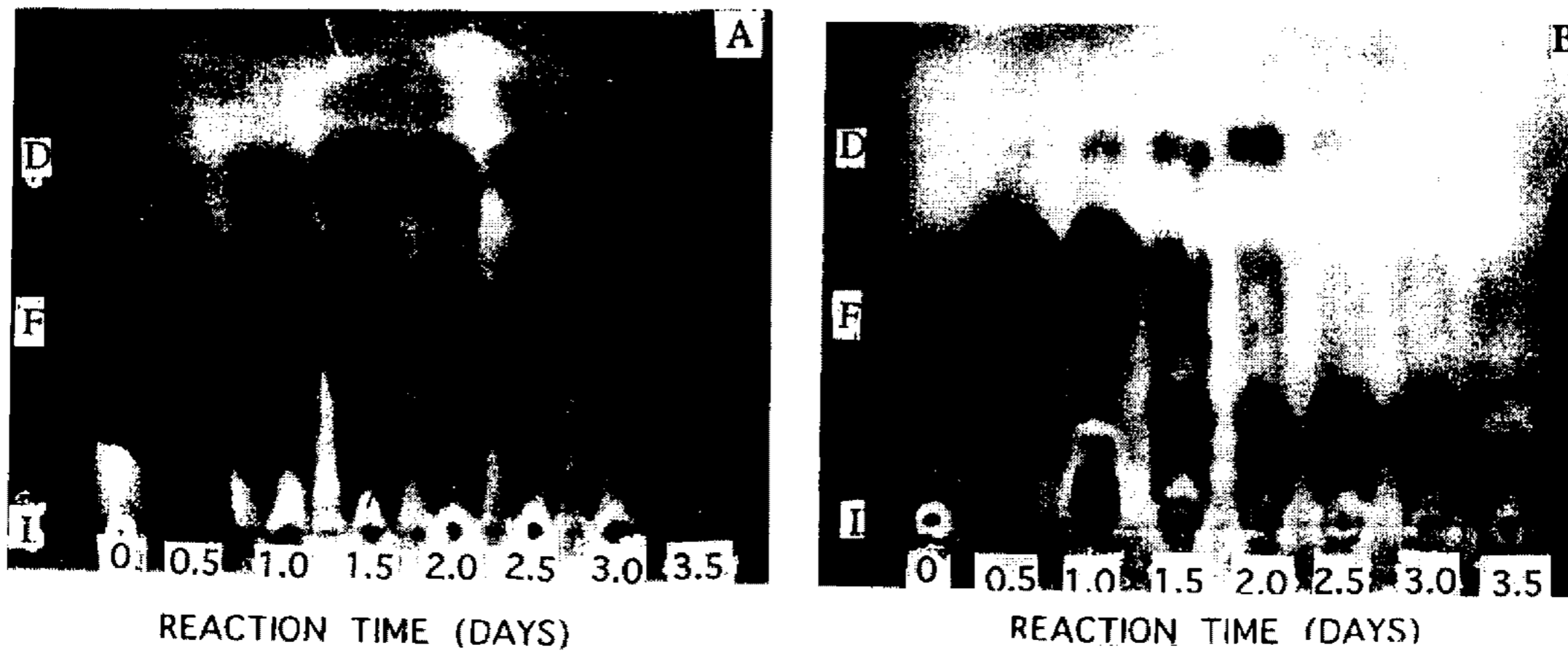


Fig. 1. Paper chromatograms of the reaction products produced by the Inulin fructotransferase from *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* IFO 1735 (A) and *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* IFO 1777 (B). I: inulin, F: fructose, D: DFAIII.

시 약

Di-d-fructofuranose dianhydride(DFAIII)는 화광 순약 주식회사 제품을, inulin, 3, 5-dinitrosalicylic acid 및 bovine serum albumin 등은 Sigma 제품을, 기타 일반 시약류는 시판 1급품을 각각 사용하였다.

결과 및 고찰

균주의 분리 및 선별

토양시료 및 보존균주로부터 DFAIII를 생산하는 효모를 분리하기 위하여 paper chromatography 법으로 검정한 결과, Fig.1. 에서와 같이 2종의 효모가 선별되었으며 이들 중 *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* IFO 1735가 DFAIII의 생산을 더욱 뚜렷하게 생성·유지시켰으므로 본 균주는 inulin 분자내의 fructose 전이 반응을 촉매하는 효소인 inulin fructotransferase (inulaseII)를 분비하는 것으로 판명되었다(Fig 1).

DFA III의 분리

전술의 배양조건에서 24시간 배양한 배양 여액 200 ml를 빵효모에 의해 발효성 당을 제거한 후 활성탄 column chromatography 및 HPLC에 의해 DFAIII의 순수분리 여부를 검정한 결과 retention time 16.524분에서 단일 peak가 출현되었으며(Fig. 2B), DFAIII의 회수율은 5.5% 이었다(Table 1).

효소생산 조건

탄소원의 영향 효소활성 최적 탄소원을 조사하기 위하여 각종 탄소원을 0.7%의 YNB를 함유한 기본배지에 0.75%씩 첨가하여 pH 5.0, 30°C에서 배양한 후 생육도 및 효소활성을 각각 측정하여 Table 2에 나타난 바와 같이 공시균의 생육정도는 inulin, fructose, glucose에서

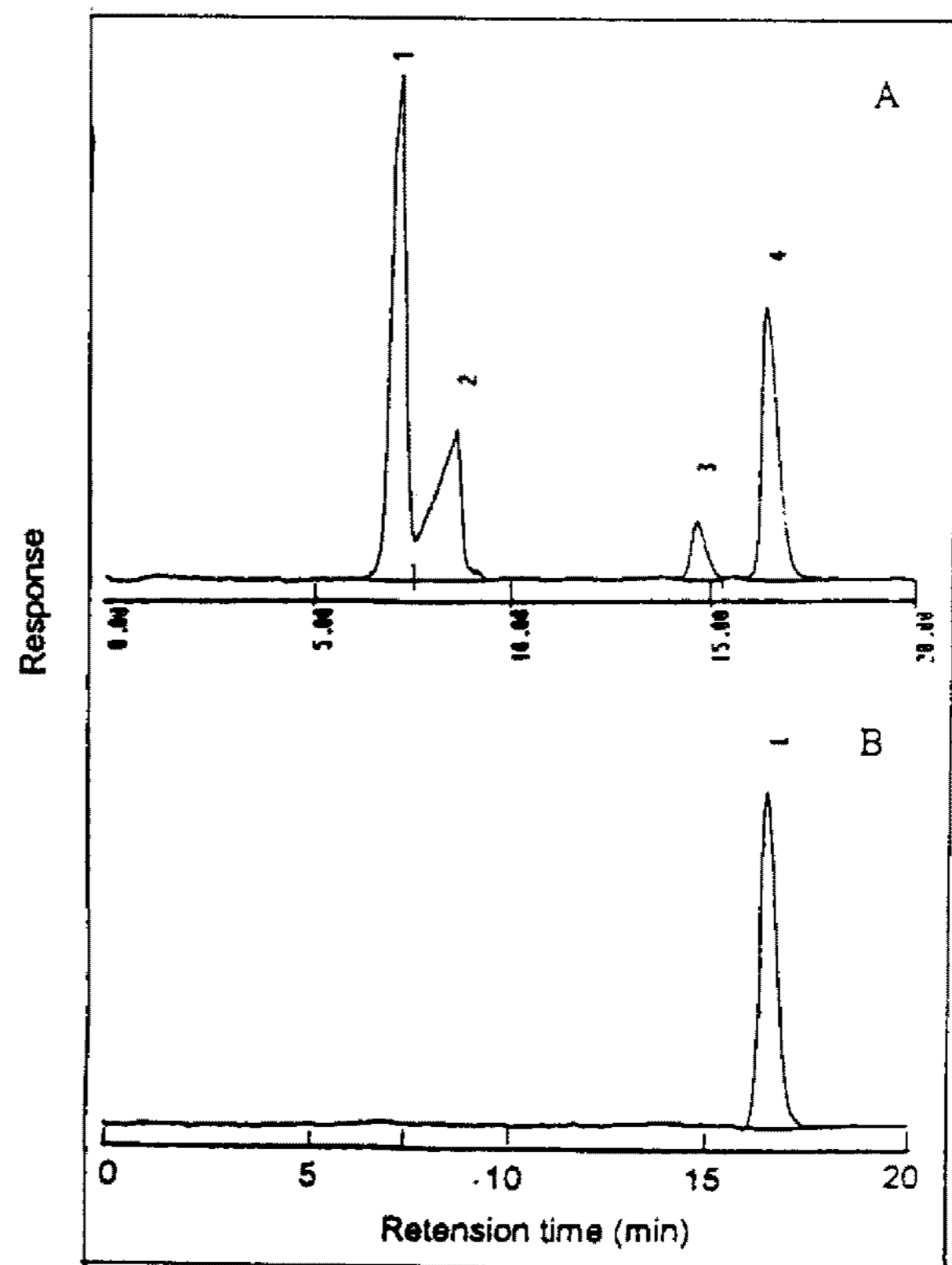


Fig. 2. HPLC chromatogram of the culture broth incubated for 24 hrs at 30°C in the basal medium containing 1% sucrose and 0.75% YNB(A) and of the active carbon column eluate of the culture broth(B). A-1, 0.1 M sodium acetate buffer(pH4.7); A-2, fructose; A-3, not determined; A-4, DFAIII; B-1, DFAIII.

비슷한 수준으로 높았으나 acetic acid에서는 전혀 생육하지 못하였다.

InulaseII 활성도는 sucrose에서 1.999 unit/ml로 가장 높게 나타났으며 이는 inulin 보다 약 1.6배 높은 활성도 이었다. 이들의 최적농도를 조사한 결과 Table 3에서와 같이 sucrose는 1%에서, inulin은 2%에서 거의 같은 수

Table 1. Separation and yield of DFAIII

	Culture broth and eluate (ml)	Ketohexose (mg/ml)	Total (mg)	Yield (%)	DFAIII (mg/ml)	Total (mg)	Yield (%)
A	880	0.120	105.6	100	3.85	3388	100
B	46	0.086	2.429	2.3	4.05	186.3	5.5

A: Culture broth incubated for 24 hrs at 30°C in the basal medium containing 1% sucrose and 0.75% YNB. B: Eluate from the active carbon column on which the culture broth had been charged.

Table 2. Effect of carbon sources on inulaseII production by *K. marxianus* var. *marxianus* IFO 1735

Carbon source (0.75%)	pH after culture	Cell growth (cells/ml)	Inulase II activity (units/ml)	Protein (mg/ml)	Specific activity (units/mg)
Control	7.20	6.50×10^7	8.908	0.096	8.427
Inulin	2.70	3.45×10^8	1.213	0.090	13.478
Inulin ^a	6.40	4.57×10^8	1.118	0.108	10.352
Xylan	7.10	1.85×10^8	0.880	0.203	4.335
Solulbe starch	7.10	3.82×10^7	1.023	0.095	10.768
Cellulose	6.95	5.30×10^7	1.095	0.078	14.038
Levan	2.95	3.20×10^8	0.738	0.115	6.417
Raffinose	3.30	2.00×10^8	1.047	0.225	4.653
Sucrose	3.15	3.40×10^8	1.999	0.129	15.496
Maltose	6.95	1.40×10^8	1.018	0.200	5.090
Lactose	2.90	8.60×10^7	1.666	0.140	11.900
Cellobiose	6.72	6.00×10^7	1.428	0.208	6.865
Glucose	2.82	4.10×10^8	1.618	0.140	11.557
Fructose	3.00	2.70×10^8	0.952	0.178	5.348
Fructose ^a	6.00	4.60×10^8	1.523	0.258	5.903
Xylose	3.25	1.80×10^8	0.976	0.650	1.501
Glycerol	5.75	3.14×10^8	0.714	0.109	6.550
Acetic acid	4.88	ND	ND	ND	ND

Cultivation was carried out for 2 days at 30°C in the basal medium containing 0.7% YNB as a nitrogen source and 0.75% various carbon sources with the initial of pH 5.0. ^aCaCO₃ was added to the production medium at a concentration of 15 g/l. ND: Not detected.

Table 3. Effect of the concentration of sucrose and inulin on inulase II production by *K. marxianus* var. *marxianus* IFO 1735

Carbon sources concentration (%)	Sucrose				
	pH after culture	Cell growth (cells/ml)	Inulase II activity (units/ml)	Protein (mg/ml)	Specific activity (units/mg)
Control	6.63	3.20×10^7	ND	0.060	ND
0.25	5.20	5.71×10^7	ND	0.063	ND
0.50	2.75	6.79×10^7	0.809	0.085	8.340
0.75	2.94	7.00×10^7	1.071	0.074	12.600
1.00	2.94	7.25×10^7	2.141	0.110	16.992
1.50	2.68	7.60×10^7	2.379	0.150	13.912
2.00	2.80	8.00×10^7	0.761	0.148	4.530
Carbon sources concentration (%)	Inulin				
	pH after culture	Cell growth (cells/ml)	Inulase II activity (units/ml)	Protein (mg/ml)	Specific activity (units/mg)
Control	6.63	3.20×10^7	ND	0.060	ND
0.25	6.83	5.03×10^8	0.528	0.090	5.388
0.50	4.46	6.77×10^8	0.666	0.093	7.161
0.75	4.20	11.54×10^8	0.808	0.080	10.101
1.00	3.52	10.50×10^8	0.833	0.073	11.411
1.50	3.58	9.56×10^8	0.952	0.070	13.600
2.00	3.61	8.35×10^8	1.213	0.085	14.271

Cultivation was carried out for 2 days at 30°C in the basal medium containing 0.7% of YNB as a nitrogen source and various concentrations of sucrose or inulin incubated in the table. The initial pH of the medium was adjusted to 5.0. ND: Not detected.

Table 4. Effect of nitrogen sources on inulaseII production by *K. marxianus* var. *marxianus* IFO 1735

Nitrogen sources	pH after culture	Cell growth (cells/ml)	Inulase II activity (units/ml)	Protein (mg/ml)	Specific activity (units/mg)
Organic (1.0%)				0.088	
Control	7.23	7.61×10^7	ND	0.600	ND
Yeast extract	4.65	1.12×10^8	1.380	0.200	2.300
YNB	2.90	5.56×10^7	1.075	0.970	5.375
Corn steep liquor	5.05	5.85×10^7	0.905	0.158	0.933
Malt extract	6.25	3.17×10^7	ND	0.756	ND
Polypepton	4.80	2.03×10^7	ND	0.600	ND
Meat extract	6.25	1.17×10^8	ND		ND
Inorganic (0.2%)				0.088	
Control	7.23	7.61×10^7	ND	0.050	ND
NaNO ₄	7.75	5.19×10^7	ND	0.160	ND
NH ₄ H ₂ PO ₄	5.30	1.08×10^7	ND	0.148	ND
(NH ₄) ₂ HPO ₄	4.95	3.65×10^7	ND	0.115	ND
NH ₄ NO ₃	6.05	5.41×10^7	ND	0.098	ND
KNO ₃	6.75	5.56×10^7	ND	0.139	ND
NH ₄ Cl	6.60	4.88×10^7	ND		ND

Cultivation was carried out for 2 days at 30°C in the basal medium containing a 0.75% of inulin as a carbon source and various concentration of nitrogen sources as described in the table. The initial pH of the medium was adjusted to 5.0. ND: Not detected.

Table 5. Effect of the concentration of YNB on inulase II production by *K. marxianus* var. *marxianus* IFO 1735

YNB concentration (%)	PH after culture	Cell growth (cells/ml)	InulaseII activity (units/ml)	Protein (mg/ml)	Specific activity (units/mg)
Control	5.15	1.82×10^7	ND	0.395	ND
0.05	4.88	2.08×10^7	1.628	0.188	8.606
0.10	4.89	2.35×10^7	2.736	0.158	17.316
0.20	4.90	4.73×10^7	3.141	0.098	32.051
0.30	4.89	4.75×10^7	3.212	0.088	36.500
0.50	4.85	7.00×10^7	3.188	0.073	43.671
0.75	4.80	1.29×10^8	3.850	0.075	51.333
1.00	4.68	6.89×10^7	3.379	0.083	40.711
1.50	4.73	6.80×10^7	3.141	0.083	37.843
2.00	4.77	6.27×10^7	3.188	0.098	32.531

Cultivation was carried out for 24h at 30°C in the basal medium containing 10.% of sucrose as a carbon source and various concentrations of YNB. The initial pH of of the medium was adjusted to 4.7. ND: Not detected.

준의 비활성도를 나타내며 가격이 비교적 저렴한 sucrose를 최적 탄소원으로 선정하였으며 이들의 농도를 증가시켜 첨가함으로 inulaseII생성을 높게 나타내고 있어 본 균주에 의한 inulaseII생산은 이들에 의해 유도됨을 알 수 있었다. 이는 *Arthobacter* sp. H65-7(13)과 *Enterobacter* sp. S45(24)에 의한 inulaseII생성은 inulin첨가로 유도된다는 보고와는 상이한 결과이었다.

질소원의 영향 각종 질소원을 무기 및 유기로 분류하여 inulaseII생산에 미치는 효과를 조사해 본 결과 무기 질소원 첨가시 균체는 증식되었지만 효소생산에는 현저한 저해효과를 나타내었다(Table 4). 유기질소원의 경우 inulin 액체기본배지에 각종 유기 질소원을 1%씩을 첨가하여 효소활성을 측정 한 결과, Table 4에 나타난 바와 같이 YNB에서의 비활성도(5.375 unit/mg)가 가장 높게

나타났으며 이는 yeast extract(2.300 unit/mg)보다 약 2배 높은 비활성도이었다. *Arthrobacter* sp. H65-7(13) 및 *Enterobacter* sp. S45(24)의 경우 yeast extract와 corn steep liquor에서 각각 효소생산이 가장 높았다는 보고와는 다소 차이가 있었다. 한편 YNB농도에 따른 효소량의 차이를 조사한 바 Table 5에서와 같이 YNB 0.75% 첨가시 가장 높은 효소생산량을 얻을 수 있었으며 2% 이상에서는 균체증식 및 효소생산량이 오히려 감소되었다. 따라서 공시균에 의한 inulaseII 생산의 최적 질소원농도는 0.75%로 선정하였다.

pH 및 배양온도의 영향

Sucrose 1.0%, YNB 1.0%를 함유한 배지의 초발 pH에 따른 효소생성능을 검토한 결과 Table 6과 같이 공시

Table 6. Effect of initial pH on inulase II production by *K. marxianus* var. *marxianus* IFO 1735

Initial pH	pH after culture	Cell growth (cells/ml)	Inulase II activity (units/ml)	Protein (mg/ml)	Specific activity (units/mg)
3.6	2.33	4.9×10^8	2.141	0.107	20.009
4.2	2.33	3.6×10^8	2.380	0.080	29.738
4.7	3.13	3.7×10^8	3.212	0.083	38.700
5.0	2.58	4.1×10^8	3.070	0.090	34.100
5.2	2.60	4.9×10^8	2.904	0.095	32.256
5.5	2.85	4.5×10^8	2.666	0.108	24.676
5.7	4.70	2.9×10^8	2.274	0.130	19.096
6.2	3.10	2.4×10^8	2.236	0.169	13.217
7.0	4.50	2.6×10^8	1.952	0.162	12.070

The culture medium contained 1.0% of sucrose and 1.0% of YNB and pH as described in the table 6 was adjusted with 1N NaOH or HCl, Cultivation was carried out for 2 days at 30°C.

Table 7. Effect of cultural temperature on inulase II production by *K. marxianus* var. *marxianus* IFO 1735

Temperature (°C)	pH after culture	Cell growth (cells/ml)	Inulase II activity (units/ml)	Protein (mg/ml)	Specific activity (units/mg)
20	4.50	6.0×10^7	ND	0.083	ND
25	4.15	8.9×10^7	3.902	0.083	47.012
30	4.25	9.6×10^7	3.997	0.075	53.293
35	4.25	7.5×10^7	3.950	0.080	49.375
40	4.40	6.0×10^7	3.569	0.083	43.000

Cultivation was carried out for 24h at temperature described in Table 7 in the basal medium containing 1.0% of sucrose and 1.0% of YNB with the initial pH of 4.7. ND: Not detected.

Table 8. Effect of aeration on inulase II production by *K. marxianus* var. *marxianus* IFO 1735

Medium (ml)	pH after culture	Cell growth (cells/ml)	Inulase II activity (units/ml)	Protein (mg/ml)	Specific activity (units/mg)
20	4.23	1.35×10^8	2.022	0.310	6.523
50	4.18	2.10×10^8	1.903	0.269	7.074
80	4.22	2.53×10^8	3.783	0.119	31.790
110	4.28	1.96×10^8	3.783	0.070	54.043
140	4.28	1.44×10^8	4.021	0.068	59.132
170	4.28	1.38×10^8	3.807	0.066	57.682
210	4.28	1.24×10^8	3.759	0.066	56.955
250	4.28	1.00×10^8	3.450	0.068	50.735

The strain was cultured in 500 ml of shaking flask with the indicated volume of medium containing 1.0% of sucrose and 1.0% of YNB (pH 4.7) at 30°C for 24h with shaking (120 strokes/min, amplitude 5 cm).

균의 증식도 및 효소생성이 pH 4.2에서 5.2까지의 범위에서 양호하였으며 초발 pH 4.7에서 가장 양호하였다. 또한 온도에 의한 영향을 조사한 결과 Table 7에서와 같이 25에서 40°C까지 넓은 온도 범위에서 효소생성이 양호하였으며 배양온도 30°C에서 그 비활성도가 가장 양호하였다.

통기성의 영향

효소생성에 미치는 통기성의 영향을 조사하기 위하여 500 ml 진탕후라스크에 배지량을 20에서 250 ml로 달리 하여 분주하고 전배양액은 배지량에 비례하여 접종한 후

30°C, 24시간 배양한 결과 Table 8에서와 같이 80에서 210 ml의 배지량에서 효소생성능이 비슷한 수준으로 양호하였으며 배지량 140 ml에서 가장 높은 비활성도를 나타내었다.

금속이온의 영향

Inulase II 생산에 가장 좋은 효과를 나타내었던 최적 농도의 탄소원 및 질소원을 각각 첨가한 기본배지에 각종 금속염을 Table 9와 같은 농도로 첨가하여 30°C에서 24시간 진탕배양한 결과 $MnCl_2$ 를 10 mM 농도로 첨가했을 때 특이적인 저해작용을 나타내었으며 그 외의 금속

Table 9. Effect of metal ions on inulase II production by *K. marxianus* var. *marxianus* IFO 1735

Metal ion		pH after culture	Cell growth (cells/ml)	Inulase II activity (units/ml)	Protein (mg/ml)	Specific activity (units/mg)
Control		4.24	8.70×10^7	3.902	0.075	52.027
KCl	1 mM	4.25	1.12×10^8	3.854	0.070	55.057
	10 mM	4.22	1.19×10^8	3.474	0.075	44.826
CaCl	1 mM	4.25	1.10×10^8	3.878	0.080	48.475
	10 mM	4.20	8.38×10^7	3.640	0.110	33.091
FeSO ₄	0.1 mM	4.25	1.18×10^8	3.902	0.095	41.074
	1.0 mM	4.22	7.63×10^7	4.283	0.113	37.903
MgSO ₄	1 mM	4.21	7.35×10^7	3.878	0.063	61.556
	10 mM	4.13	9.70×10^7	3.664	0.093	39.398
MnCl ₂	1 mM	4.20	8.13×10^7	3.783	0.124	30.508
	10 mM	4.70	2.50×10^7	0.952	0.125	0.448

Cultivation was carried out for 24h at 30°C in the basal medium containing 1.0% of sucrose and 0.75% of YNB with the initial pH of 4.7.

Table 10. The optimum medium compositions for the inulase II production by *K. marxianus* var. *marxianus* IFO 1735

Ingredient	Concentration (%)
Sucrose	1.00
YNB	0.75
0.1 M Sodium acetate buffer (pH4.7)	50
H ₂ O	50

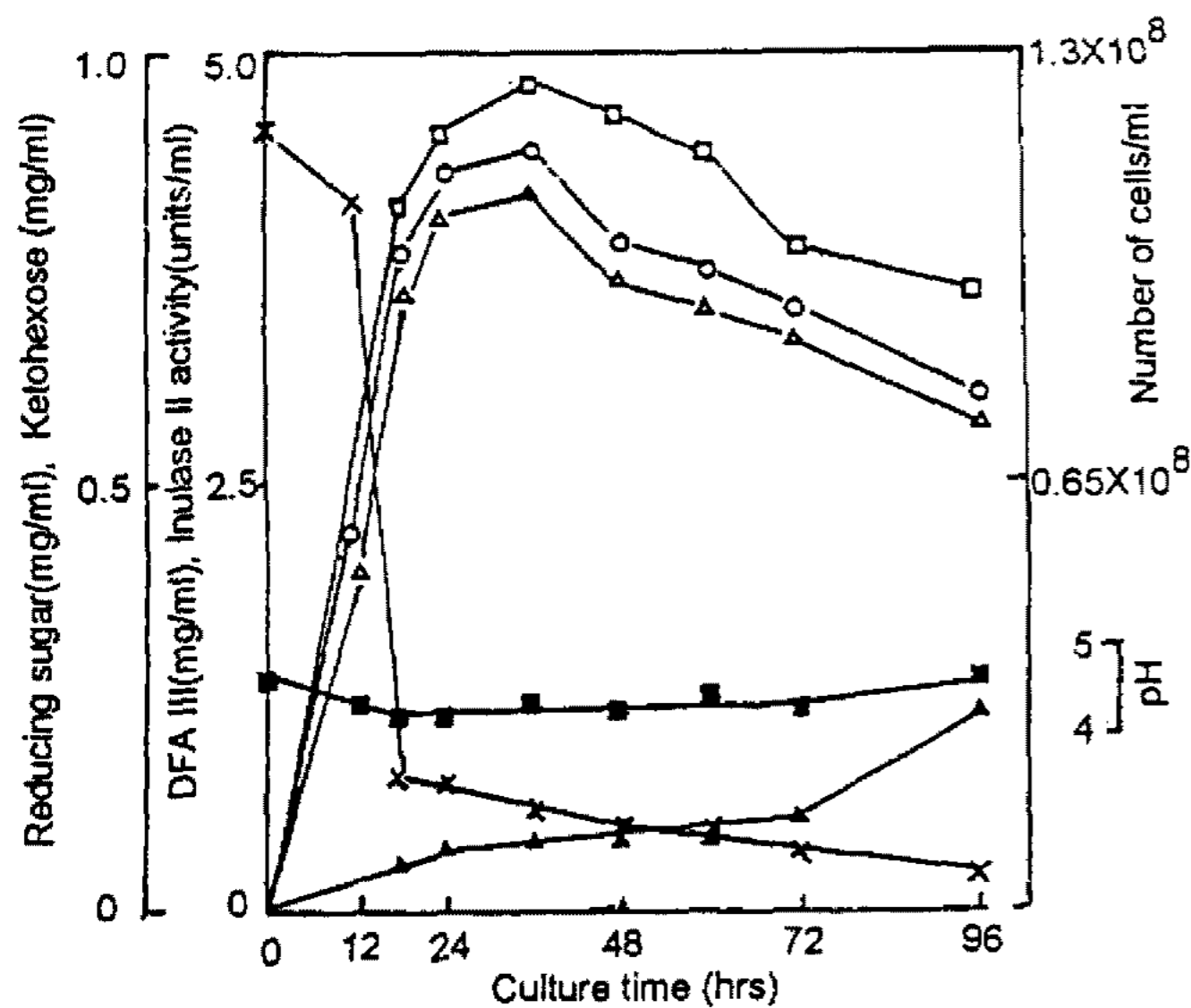


Fig. 3. Time course of inulase II production under the optimum conditions.

Cultivation was carried out for 4 days at 30°C under the optimum conditions described in the table 10. Δ : inulase II activity, □ : cell growth, × : ketohexose, ▲ : reducing sugar, ○ : DFA III, ■ : pH.

염에 의해서는 별다른 영향을 나타내지 않았다.

배양시간

상기의 최적 배지조성(Table 10)의 배지 140 ml에 공시균을 접종하여 30°C에서 배양하면서 배양시간별 효소 생산성을 검토한 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 균체성

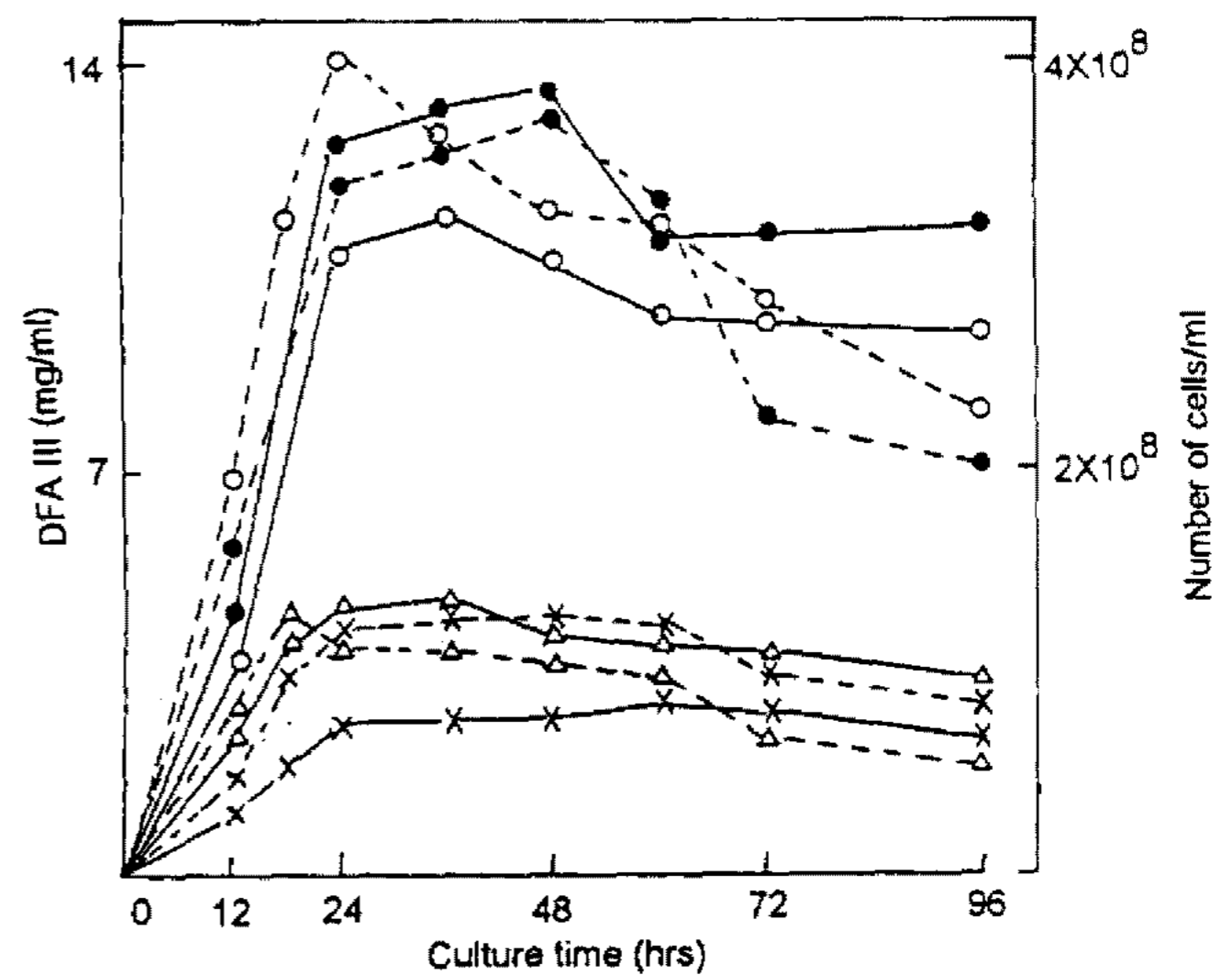


Fig. 4. Time course of DFA III production and cell growth in the four different media.

●—● ; Jerusalem artichoke tuber medium, DFA III produced, ○—○ ; Jerusalem artichoke tuber medium, cell growth, ○—○ ; Burdock root medium, DFA III produced, △—△ ; Burdock root medium, cell growth, △—△ ; Sucrose-YNB medium, DFA III produced, △—△ ; Sucrose-YNB medium, cell growth, ×—× ; Inulin-YNB medium, DFA III produced, ×—× ; Inulin-YNB medium, cell growth.

장은 36시간 경과했을 때 정지기에 도달하였으며 효소의 활성도는 4.2 unit/ml로 대수기 말기에 가장 활성이 높았고 정지기에 들어가면서 급격히 감소함을 알 수 있었다.

돼지감자 추출액에 응용

최적 배지조성 및 배양조건에서 생성된 공시균을 돼지감자 추출액에 이용하기 위하여 inulin 함유, sucrose 함유 합성배지 및 돼지감자, 우엉뿌리 추출액의 천연배지를 사용하여 pH 4.7, 30°C에서 각각 배양하면서 배양시간별 DFA III 생성능을 비교 검토한 결과 Fig. 4에서 나타낸 바와 같이 돼지감자 추출액의 천연배지에서 공시균의 48시간 배양으로 13.25 mg/ml의 DFA III를 생성하였

는데 이는 inulin 함유 합성배지에서 보다 약 5배 높은 생산량이었다. 한편, *Enterobacter* sp. S45(24)와 *Arthrobacter* sp. H65-7(13)에 의한 최대량의 DFAIII 생성시간은 모두 12시간 배양으로 DFAIII의 양이 각각 7.6 mg/ml, 5.0 mg/ml이었다고 보고하고 있다. 따라서 공시균의 inulaseII를 돼지감자 추출액에 이용함으로써 상당량의 DFAIII를 생산할 수 있어 설탕 대체감미료 생산효소로서의 이용 가능성이 기대된다.

요 약

Inulin을 di-D-fructofuranose 1,2' : 2,3' dianhydride (DFAIII)로 전환시키는 inulin fructotransferase (inulaseII)를 생산하는 균주로 *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*를 선별하였다.

공시균의 inulaseII의 생성을 위한 최적 배지조성은 1.0%의 sucrose 및 0.75%의 YNB이었으며 최적 배양조건은 초기 pH, 배양온도 및 배지량은 각각 4.7, 30°C 및 140 ml이었다. 상기 최적 조건으로 36시간 배양하였을 때 효소 생산량이 가장 높아 배양액 ml당 약 4.2 unit를 나타내었다. 본 효소의 이용성을 검토한 결과 돼지감자 추출액을 이용한 천연배지의 경우 상기 최적 배양조건에서 48시간 배양으로 DFAIII 생산량이 가장 높아 배양액 ml당 13.25 mg을 나타내었다.

감사의 말

본 연구는 1994년도 교육부 한국학술진흥재단 연구비에 의해 수행된 논문의 일부로서 이에 깊은 감사를 드리며 또한 Osaka 부립 대학 응용생화학과 발효제어화학실의 Sakai 교수에게도 고마움을 표합니다.

참고문헌

- Whister, R. L. and C. L. Smart. 1953. *Polysaccharide Chemistry*. Pp. 27: 27-288. Academic Press. New York.
- Bacon, J. S. D. and J. Edelman. 1951. The carbohydrates of the *Jerusalem artichoke* and other *compositae*. *Biochem. J.* **48**: 114-126.
- Edelman, J. and T. G. Jefford. 1968. The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in *Helianthus tuberosus*. *New phytol.* **67**: 517-531.
- Ryu, Y. W., C. H. Kim, and S. I. Kim. 1984. Ethanol production from *Jerusalem artichoke* tubers (*Helianthus tuberosus* L.) by *Kluyveromyces fragilis*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **12**: 51-55.
- Ryu, Y. W., C. H. Kim, and S. I. Kim. 1983. Selection of yeast strains for alcohol production from *Jerusalem artichoke* tubers (*Helianthus tuberosus* L.). *J. Kor. Agric. Chem. Soc.* **26**: 119-124.
- Lee, S. H., M. K. Kim, M. S. Chung, Y. S. Jeong, and T. B. Uhm. 1993. Screening of the endoinulase-producing fungi by using antibody. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**(1): 18-22.
- 최동성, 고하영. 1995. 식품기능화학. Pp. 265-270 지구문화사.
- Kim, J. H., B. K. Hur, C. S. Bae, and H. S. Kim. 1990. Ethanol fermentation characteristics of *K. marxianus* on *Jerusalem artichoke* tuber extract. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **5**: 75-80.
- Hong, Y. and E. H. Choi. 1994. Screening and identification of wild stains for the production of high concentration of alcohol from *Jerusalem artichoke* Tubers. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**(6): 707-712.
- 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. Wmarr. 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. *Agric. Biol. Chem.* **47**(2) : 437-439.
- 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. Bioeng.* **72**(4): 258-261.
- Park, J. H., J. Y. Yoo, O. H. Shin, H. K. Shin, S. J. Lee, and K. H. Park. 1992. Growth effect of branched oligosaccharides on principal intestinal bacteria. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**(3): 237-242.
- 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. Enzyme 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. Enzyme formation of di-D-fructose 1, 2' : 2, 1' dianhydride by *Aspergillus fumigatus*. *Carbohydrate Res.* **75**: 340-344.
- 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*. *Biochem. Biophys. Acta* **284**: 248-256.
- Haraguchi, K., M. Kishimoto, K. Seki, K. Hayashi, S. Kobayashi, and K. Kainuma. 1988. Purification and pro-

- properties of inulin fructotransferase (depolymerizing) from *Arthrobacter globiformis* C 11-1. *Agric. Biol. Chem.* **52**(1): 291-292.
21. Kawamura, M., S. Takahashi, and T. Uchiyama. 1988. Purification and some properties of inulin fructotransferase (depolymerizing) from *Arthrobacter ilicis*. *Agric. Biol. Chem.* **52**(1): 3209-3210.
 22. Matsuyama, T., K. Tanaka, and T. Uchiyama. 1991. Isolation and identification of the *Aspergillus fumigatus* di-fructose dianhydride. *Agric. Biol. Chem.* **55**(5): 1413-1414.
 23. Shirasawa, E., T. Uchiyama, and K. Tanaka. 1974. Preparation of Di-D-fructofuranose 1, 2' : 2, 3' dianhydride by the cultivation of *Arthrobacter ureafaciens* in the inulin-containing synthetic and vegetable media. *J. Ferment. Technol.* **52**(3): 164-170.
 24. Kang, S. I. and S. I. Kim. 1993. Production of Inulin fructotransferase (Depolymerizing) from *Enterobacter* sp. S45. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**(1): 36-40.
 25. Uchiyama, T., S. Niwa, and K. Tanaka. 1973. Purification and properties of *Arthrobacter ureafaciens* Inulase II. *Biochem. Biophys. Acta* **315**: 412-420.
 26. Roe, J. H., J. H. Epstein, and H. P. Goldstein. 1949. A photometric method to the determination of inulin in plasma and urine. *J. Biol. Chem.* **179**: 839.
 27. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
 28. Lowry, O. H., N. J. Rosenbrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.

(Received 10 November 1996)