

Arthrobacter sp. A-6의 배양과 Chicory 뿌리 추출물에서 Di-Fructofuranose Dianhydride(DFAIII)의 생산

김기은* · 신창훈¹ · 최용진¹ · 김찬화¹

*서경대학교 생물공학과, ¹고려대학교 생명공학원

Chicory 뿌리에서 *Arthrobacter* sp. A-6를 배양하여 inulin fructotransferase를 생산하였을 때 균주의 성장속도, 효소의 생산성을 검토하였다. 가공된 치커리 뿌리는 inulin fructotransferase의 crude enzyme solution으로 처리하였을 때 생산되는 di-fructofuranose dianhydride(DFA III)의 양을 chicory 뿌리의 가공방법에 따른 차이를 비교하였다. 우선 standard 배지에서 생산된 효소액으로 10%의 inulin이 포함된 standard inulin-용액을 처리하면, 1.14 mg/ml의 DFA III가 생산되었다. Chicory 뿌리의 전처리방법에 따라, 같은 조건으로 반응을 진행시키는 실험을 통해 각 배지에서의 생산효율을 비교하였다. Chicory 뿌리를 washing과 extraction과정을 거치지 않고 그대로 반응시켰을 경우, 2.29 mg/ml의 DFA III가 생산되어 생산성이 가장 높았는데, 이는 세척과정에서 inulin이 유실되지 않으므로, 기질로 작용하는 inulin의 양이 가장 높은 데 기인하는 것으로 생각된다.

Key words □ *Arthrobacter* sp. A-6, chicory-root, di-fructofuranose, inulin fructotransferase

서 론

Inulin은 glucose에 35~40개의 D-fructose단위 분자가 $\beta(1\rightarrow2)$ glycosidic 결합(18)으로 이루어진 직쇄상의 다당분자로서 chicory, Jerusalem artichoke(*Helianthus tuberosus* L.), Compositae 및 Campululaceae family와 같은 식물의 저장 탄수화물이다(1,3,19). Inulin의 효소분해산물은 대부분 식물의 저장 및 발아과정에서 처음 발견되었으며 fructose의 중합체인 F2, F3 등의 inulooligosaccharides와 GF2(ketose), GF3(nystose), GF4(fructofuranosyl nystose)등의 fructooligosaccharide 및 fructose 두 분자가 탈수 결합, 환상을 한 di-fructofuranose dianhydride(DFAs)들이 보고되었다(1,11,12,17,20).

이러한 올리고당들은 비만, 당뇨, 충치의 예방효과와 Bifidus 유균의 증식인자로 작용하고, 이외에 여러 가지 생리활성이 있는 것으로 알려져 있다. 감미도는 설탕의 약 50%정도이고, 인체에 무해하므로 설탕 대신 감미료로 이용될 수 있을 것으로 전망되고 있다. 이들 올리고당중 특히 DFA 종류는 inulin이 가수분해되고, 두 개의 fructose분자가 탈수결합과 dimerization과정을 통해 생성된다. 이러한 DFA에는 dioxan ring이 있으므로 다른 fructooligosaccharide와 비교하여 화학적으로 더 안정한 구조라 할 수 있다(4,5,6,9). di-fructofuranose I(DFA), di-fructofuranose III(DFA III), di-fructofuranose V(DFA V)등이 미생물의 발효과정을 통하여 생성된다는 내용은 이미 다수의 논문에서 발표되었다(14,21).

본 연구에서 목적되는 생산물인 DFA III는 D-fructose 두 분자의 1,2':2,3'결합으로 이루어져 있다. Tanaka 등(14)은 *Arthrobacter ureafaciens*가 생성하는 inulase II(inulin fructotransferase(depolymerizing, E.C. 2.4.1.93))의 작용에 의해 생성된다는 내용을 처음 보고하였고, 그 이후 많은 연구를 통해 *Arthrobacter*, *Enterobacter* 및 효모들도 DFA III를 생산할 수 있다는 내용이 발표되었다(7,13,15,16). 본 연구에서는 이러한 Inulase II와 DFA III를 경제성있게 대량 생산하는 공정을 개발하고자 하였다. 따라서 강원도에서 다량 재배되어 차류로 가공되고 폐기물로 발생되는 치커리 뿌리를 배지로 사용하였다. 여기에 *Arthrobacter* sp. A-6를 배양하면서, 이에 생산되는 inulase II를 이용하여 DFA III를 생산하였다.

재료 및 방법

재료 및 사용 균주

본 실험에 사용된 *Arthrobacter* sp. A-6는 고려대학교 생명공학원 최용진 교수의 연구실에서 분양받았으며, chicory의 뿌리는 강원도 인제군 치커리 농장에서 기증 받았다. 배지에 사용한 시약은 Sigma사, 기타 총당 정량에 사용되는 황산 및 phenol 등 실험에 사용된 시약들은 모두 1급 이상을 사용하였다.

배지 제조

Chicory 뿌리 extract에서 *Arthrobacter* sp. A-6의 성장을 측정하기 위하여 우선 chicory 뿌리 10 g에 증류수 100 ml를 첨가한 후 4°C에서 24시간 방치한 후 8,000xg에서 원심분리(Beckman, Avanti TM J25)를 실시하여 상정액은 버리고 침전물에 다시 증

*To whom correspondence should be addressed
Tel: 82-2-940-7154, Fax: 82-2-919-0345
E-mail: gkeun@bukak.seokyeong.ac.kr

류수 100 ml을 첨가하여 용해되는 성분은 제거하였다. 이를 100 °C에서 30분 가열하여 60 μ m mesh의 여과지에서 여과하였다. 이때 여액의 부피가 100 ml가 되게 증류수를 첨가하였다. 이렇게 획득한 배지를 “washed extract”라 명명한다. 또 동일한 양의 chicory의 뿌리에 증류수 100 ml을 첨가하여 100°C에서 30분 가열하여 같은 방법으로 여과하였다. 이때도 역시 여액의 부피가 100 ml이 되게 증류수를 첨가하였다. 이렇게 획득한 배지를 “non-washed extract”라 한다. 표준배지의 성분은 1 l당 inulin 25.0 g, tryptone 1.0 g, (NH₄)₂SO₄ 1.4 g, KH₂PO₄ 2.0 g, CaCl₂ 0.3 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.3 g, tween-80 40 ml, FeSO₄ · 7H₂O 5.0 mg, MnSO₄ · H₂O 1.6 mg이다(10).

미생물 성장곡선

각 배지에서 성장곡선을 측정하기 위하여, 균주를 Luria-Bertani(LB)broth에 접종하고, 24시간 37°C에서 전배양하여 대수기에 있는 세포를 1%씩 25 ml 배지가 있는 250 ml의 삼각플라스크에 접종하고 200 rpm으로 교반하였다. 그 후 0, 6, 12, 24, 36, 48, 60시간에서 1 ml씩 배양액을 취하여 590 nm에서 turbidity를 측정하였고, 이를 다시 건체량으로 환산하여 성장곡선을 작성하였다.

총당정량

세포의 성장에 따른 탄수화물 기질의 감소를 측정하기 위하여 배양액 내의 총당량의 변화를 관찰하였다. 각 시간대별로 배양액을 취하고, 15,000xg에서 원심분리하여 세포를 제거한 배양액을 총당 정량에 사용하였다. 총당정량은 phenol-sulfate(2)법을 사용하였으며, 표준물질로는 fructose를 사용하였다.

비성장속도(specific growth rate, μ)

성장곡선과 배양액에 존재하는 세포 성장 기질의 양을 비교하여 비성장속도(specific growth rate) μ 를 구하였다. 이때 사용된 식(8)은

$$\frac{dX}{dt} = \mu X, X = X_0 \text{ at } t = 0 \text{ 이다.}$$

(단 X 와 X_0 는 각각 시간 t 그리고 $t=0$ 에서의 세포 농도)

또한 성장 반응과정을 보다 잘 설명하기 위하여 양론적으로 관련 지워진 수율을 계산하였다.

$$Y_{X/S} = -\frac{\Delta X}{\Delta S}$$

(단 ΔX : 세포의 농도 변화이며, ΔS : 배지내 기질의 변화량)

효소 활성 측정

각 기질에서 생성된 inulin fructotransferase의 활성을 각 시간대별로 측정하였다. 즉 각 시간대별로 채취한 배양액을 15,000 rpm에서 원심분리한 상정액을 조효소액으로 사용하였다. 이 조효소액 50 ml와 미리 준비된 기질(10% standard inulin, pH 6.0, 0.05 M phosphate buffer)을 60°C에서 15분간 반응을 시켰다. 반

응 후 즉시 끓는 물에서 5분간 중탕하여 반응을 중단한 후 이를 HPLC(Water Co., Massachusetts, USA)를 사용하여 정량분석하였다. 분석에는 column으로 μ Bondapak NH₂ 125Å 10 μ m(3.9x300 mm)을, RI detector를 사용하였고, elution buffer로는 acetonitrile과 water를 75:25의 비율로, 1.0 ml/min의 elution rate의 조건에서 시행되었다. 이때 사용된 DFA III는 고려대학교 최용진 교수 연구실에서 기증받은 것을 사용하였다. 1분에 1 μ M의 DFA III를 생성하는 효소량을 1 U/ml라 정의하였다.

기질 반응성 측정

Standard 배지에서 생성된 효소를 이용하여, 기질의 변화에 따른 DFA III 생성량을 측정하여 chicory 뿌리로부터 가장 효과적인 생성방법을 찾는 실험을 실시하였다. 이때 사용된 기질로는 우선 치커리뿌리 10 g에 0.05 M phosphate buffer 100 ml을 첨가한 후 4°C에서 24시간 방치하여 8,000xg에서 원심분리를 실시한 후 상정액은 버리고 침전물에 다시 phosphate buffer(pH 6.0, 0.05 M) 100 ml을 첨가하였다. 이렇게 준비된 기질을 “washed-non extract”라 하였고, 동일한 방법으로 준비한 후 100°C에서 30분간 가열하여 60 μ m의 mesh에서 filtration을 실시하였다. 이때 filtrate의 부피가 100 ml가 되게 phosphate buffer를 첨가하였다. 이렇게 획득한 기질을 “washed extract”라 하였다.

또한, chicory뿌리 10 g에 phosphate buffer 100 ml을 첨가하여 이를 “non washed-non extract”라 명명하였고, 동일하게 준비하여 100°C에서 30분 가열하여 60 μ m의 mesh에서 filtration을 실시하였다. 이때 여액의 부피가 100 ml가 되도록 phosphate buffer를 첨가하였다. 이렇게 획득한 기질을 “non washed-extract”라 하였다.

효소반응을 위한 기질로는 10% standard inulin(pH 6.0, 0.05 M phosphate buffer)용액을 사용하였다. 이렇게 준비된 5종류의 sample 950 ml에 표준 inulin 배지(재료 및 방법 참조)에서 생성된 조효소액 50 μ l를 첨가하여 60°C에서 30분간 반응을 시킨 후 100°C에서 5분간 중탕하여 반응을 종료하였다. 이를 HPLC분석을 통하여 DFA III 생산량을 비교하였다.

결과 및 고찰

성장곡선 및 Inulin fructotransferase의 생산

각기 다른 배지, non-washed extract, washed extract, standard medium에서 배양한 균주의 성장곡선은 Fig. 1과 같다. 성장 곡선의 경우, standard와 washed extract 배지에서는 12시간 이후부터, non-washed extract에서는 24시간 이후부터 대수기가 시작되었다. 이는 standard-와 washed-extract 배지에서는 대부분의 탄수화물 기질이 inulin인 반면, non-washed extract 배지의 경우, 실제 생산공정을 생각하여 치커리의 세척과정이 생략되었으므로(세척시 생성되는 폐수문제 등을 고려하여 생산공정중 생성되는 오폐수량을 감소하기위한 측면에서), inulin 외에도 여러 종류의 당류, 올리고당과 홑 등 이물질이 다량 섞여있으므로, 순수한 이눌린 배지에서 배양된 종균들의 적응기간이 다른 배지의 경우보다 긴 것으로 사료된다.

Fig. 1에서와 같이 초기 washed extract와 non-washed extract에 함유되어있는 총 당량이 현저하게 차이가 나는 것은, 치커리의 세척과정에서 뿌리에 존재하는 수용성 당과 저온의 물에 잘 녹는 inulin이 다량 제거되었기 때문인 것으로 사료된다. 배지내의 총당량 변화는 Fig. 1에서와 같이 세포의 성장에 따라 감소하였었다.

Table 1에서는 균체의 비성장속도(μhr^{-1}), 균체의 수율($Y_{X/S}$) 및 효소의 수율($Y_{E/S}$)등을 계산하였다. *Arthrobacter* sp.의 비성장속도는 standard배지에서 0.26으로 가장 높았고, 균체의 수율역시 standard 배지에서 0.57로 가장 높았으나, 효소생산수율은 washed extract 배지에서 1.51으로 가장 높았다.

각 배지에서 생성된 효소의 활성은 Fig. 2에 나타난 바와 같이 non-washed extract 배지에서 18.0 U/ml로 가장 높은 활성을 보였고, standard 배지에서 2.3으로 가장 낮았다. 이를 60시간에서 비교하면 non-washed extract 배지에서의 효소활성 18.0 U/

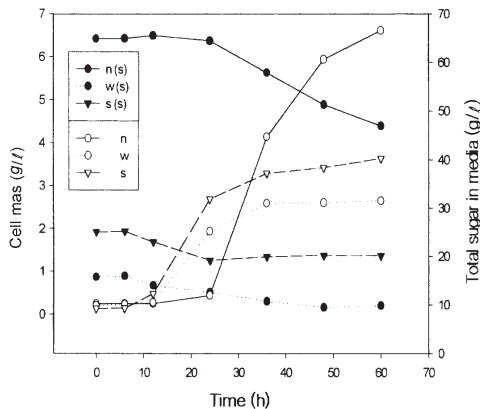


Fig. 1. The growth curve of *Arthrobacter* sp. A-6 in the media prepared with various sources of inulin and the total amount of residual carbohydrate in the media. n, Cell concentration in non-washed extract; w, Cell concentration in washed extract; s, Cell concentration in standard medium; n(s), Total carbohydrate in the non-washed extract, w(s), Total carbohydrate in the washed extract; s(s), Total carbohydrate in the standard medium.

Table 1. Specific growth rate and yield of cell mass and enzyme in various preparations of chicory root

Medium	Specific Growth Rate (μ, hr^{-1})	Yield of Cell Mass ($Y_{X/S}, \text{g/g}$)	Yield of Enzyme ($Y_{E/S}, \text{g/g}$)
Non-Washed Extract ^{a)}	0.25	0.22	0.26
Washed-Extract ^{b)}	0.34	0.40	0.57
Standard ^{c)}	0.97	1.51	0.39

a) Non-washed extract; chicory roots were extracted in 100°C water for 30 minutes without prewashing

b) Washed extract; chicory root were washed in 4°C water for 24 hours and extracted in 100°C water for 30 minutes

c) Standard ; inulin 25.0 g, trypton 1.0 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.4 g, KH_2PO_4 2.0 g, CaCl_2 0.3 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g in 1 l D.W.

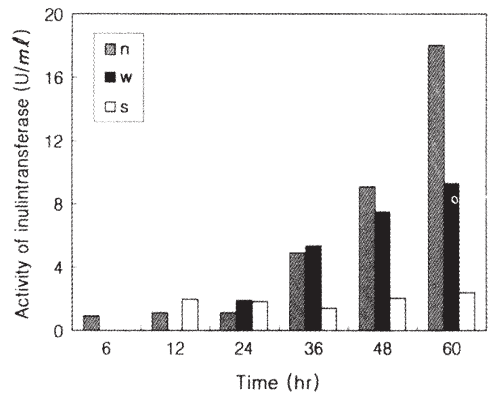


Fig. 2. Activity of inulin fructotransferase in each medium prepared with various sources of inulin. n, non-washed medium(chicory roots, extracted with 100°C water for 30 min without prewashing). w, washed medium(chicory roots; washed with 4°C water for 24 hours and extracted in 100°C water for 30 min.); s, standard medium; inulin 25.0 g, trypton 1.0 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.4 g, KH_2PO_4 2.0 g, CaCl_2 0.3 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g in 1 l D.W.

ml으로 washed extract 배지에서의 활성인 9.3 U/ml 보다 약 2배, standard배지에서의 활성인 2.3보다 약 8배 가량의 높은 활성을 보였다.

특히, non-washed extract 배지와 washed extract 배지에서의 효소활성은 시간의 경과에 따라 대수적으로 증가함을 보였는데, 이는 효소의 활성과 배양시간의 효율을 비교할 연구과제를 제시한다. 이는 standard배지에는 탄소원으로 inulin만 포함되어있는데 비해, washed-와 non-washed- 배지에는 inulin 외에 당당류와 올리고당류가 다양하게 존재하고, 특히 washed-배지와 비교해 non-washed-배지에서 효소의 활성이 더 높게 나타난 것은 non-washed 배지의 경우 흡에서 분리, 배양된 *Arthrobacter* sp.가 자라기에 적당한 성분들이 더 많이 함유되어있는 데 원인이 있는 것으로 사료된다.

비성장속도와 세포 수율, 효소의 생산량을 비교 고찰할 때 기질을 사용하여, 세포가 성장하는 세포의 수율이나, 비성장속도는 standard 배지에서 가장 높은 반면, 효소의 수율에 있어서는 washed extract 배지에서의 경우가 가장 좋은 것으로 나타났다. 그러나 세척과정과 효소의 수율을 고려할 때 산업적인 DFA III의 생산에 있어서는 non-washed extract배지를 사용하여 균주를 배양하는 것이 가장 경제적이라 하겠다.

기질 반응성 측정

Standard 배지에서 생산된 조효소액을 이용하여 각기 다른 기질과 반응시켜 DFA III 생성량을 비교하였는데 그 결과는 Fig. 3과 같다. 이 결과는 4 mg/ml의 standard DFA III를 기준으로 HPLC 분석결과 피크의 면적에 대한 상대적인 값을 통하여 생성된 DFA III값을 추정한 것이다. 이때 10% standard inulin(pH 6.0, 0.05M phosphate buffer)과 30분간의 반응에 의한 DFA III 생산량은 1.14 mg/ml 이었고, “non washed-non extract” 기질에

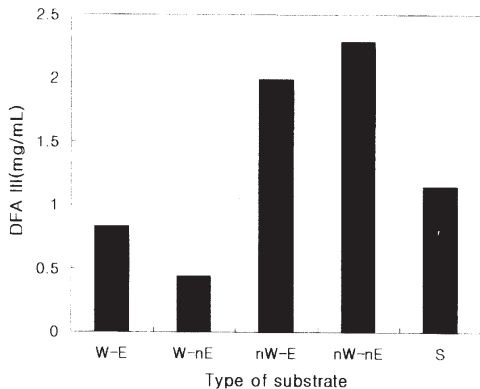


Fig. 3. The amount of DFA III produced with various preparations of chicory roots. W-E, cold water washing with hot water extraction, W-nE, cold water washing without hot water extraction; nW-E, hot water extraction without cold water washing, nW-nE, without cold water washing and without hot water extraction; s, standard medium; inulin 25.0 g, trypton 1.0 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.4 g, KH_2PO_4 2.0 g, CaCl_2 0.3 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g in 1 l D.W.

서는 2.29 mg/ml로 standard inulin과의 반응에서보다 약 2배 이상의 높은 생산량을 보였다. 가장 낮게 나타난 것은 0.44 mg/ml의 생성을 보인 “washed-non extract” 기질이었다. 이 결과에서 냉각수에 의한 세척과정에서 제거되는 수용성 당 중 상당량이 효소와 반응할 수 있는 inulin일 것으로 추정할 수 있다. 효소 활성이 더 높은 “non-washed extract” 배지에서 생산된 조효소액을 이용하면 Fig. 3의 결과보다 많은 양의 DFA III를 생산할 것으로 판단된다.

참고문헌

- Bacon, J. S. D and J. Edelman. 1951. The carbohydrates of the Jerusalem artichoke and other compositae. *Biochem. J.* 48, 114-126.
- Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith. 1956. *Anal. Chem.* 28, 350.
- 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.
- Haraguchi, K., M. Kishimoto, K. Seki, K. Hayashi, S. Kobayashi, and K. Kainuma. 1988. Purification and properties of inulin fructotransferase from *Arthrobacter globiformis* C11-1. *Agric. Biol. Chem.* 52, 291-292.
- Kang, S. I. and S. I. Kim. 1993. Production of inulin fructotransferase by *Enterobacter* sp. S45. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 21, 36-40.
- Kawamura, M., S. Takahashi, and T. Uchiyama. 1988. Purification and some properties of inulin fructotransferase (depolymerizing) from *Arthrobacter ilicis*. *Agric. Biol. Chem.* 52, 3209-3210.
- Kobayashi, S. 1989. Production and properties of difructose anhydride. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* 63, 1136-1140.
- Mandelstam, J., M. Kenneth, and D. Ian. 1982. *Biochemistry of Bacterial Growth*. Halsted Press. New York, p. 109-123.
- Park, J. B., Y. M. Kwon and Y. J. Choi. 1995. Production of inulin fructotransferase by *Arthrobacter* sp. A-6. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 68-74.
- Park, J. B. and Y. I. Choi. 1996. Purification and characterization of inulin fructotransferase (depolymerizing) from *Arthrobacter* sp. A6. *J. Microbiol. Biotechnol.* 6, 402-406.
- Pollock, C. J. and N. J. Chatteron. 1988. Fructans in the biochemistry of plants. Academic Press. New York. 14, 109-140.
- 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.
- Shoichi, K., H. Kazumoto, K. Mamoru, N. Kazushi, H. Keikichi, K. Keiji, and K. Misuru. 1988. Food ingredients containing difructose dianhydrides. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* JP 63,269,962 (88,269,962) (CI.A23L1/236).
- Tanaka, K., T. Uchiyama, and A. Ito. 1972. Formation of di-D-fructose 1,2': 2,3' dianhydrate from inulin by an extracellular inulase of *Arthrobacter ureafaciens*. *Biochem. Biophys. Acta* 284, 248-256.
- Tosha, K. and Akio. 1993. Lipid-reducing agents containing difructose derivative and breeding animals using them. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* JP 05,168,419(93,168,419) (CI.A23K1/16).
- Tsutomu, K. and N. Akio. 1991. Sweetening compositions containing Di-D-fructofuranose 1,2':2,3' dianhydride and menthol. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* JP 03,67,560(91,67,560) (CI.A23L1/236).
- Uchiyama, T. 1983. Formation of β -D-fructose anhydride from inulin by the root of *Lycoris radiata* Herbert. *Agric Biol. Chem.* 47, 437-439.
- Waterhouse, A. L. 1993. Glossary of fructan terms In: Science and Technology of Fructan. Suzuki, M., Chatterton, N.J., (eds) CRC Press, Boca Raten, FL, USA.
- Whistler, R. L. and C. L. Smart. 1953. *Polysaccharide Chemistry*. Academic Press. New York, 270-288.
- Whistler, R. L. and C. L. Smart. 1973. Fructans in higher plants in polysaccharide Chemistry. Academic Press. New York. 276-310.
- Yokota, A., S. Hirayama, K. Enomoto, Y. Miura, S. Takao, and F. Momita. 1991. Purification of inulin fructotransferase (depolymerizing) by *Arthrobacter* sp. H65-7 and preperation of DFAIII from inulin by the enzyme. *J. Ferment. Biotechnol.* 72, 258-261.

(Received February 7, 2000/Accepted March 6, 2000)

ABSTRACT : Cultivation of *Arthrobacter* sp. A-6 and Production of DFA III(Di-Fructofuranose Dianhydride) from Chicory Root Extract

Gi-Eun Kim*, **Chang-Hun Shin¹**, **Yong-Jin Choi¹**, and **Chan-Wha Kim¹**(*Department of Bioengineering, Seokyeong University, Seoul 138-704, Korea, ¹Graduate School of Biotechnology, Korea University Seoul 138-701, Korea)

Arthrobacter sp. A-6 was cultivated and DFA III(di-fructofuranose dianhydride) was produced with inulin fructotransferase from the chicory root. The specific growth rate, yield of cell mass and yield of enzyme from the culture in variable chicory root extracts were studied and the results compared. Standard inulin solution(10%) was treated with the crude enzyme solution of inulin fructotransferase from the cell culture, 1.14 mg/ml of DFA III was produced. The enzyme reactions were processed with various preparations of chicory root extracts in the same conditions. The highest yield of DFA III production(2.29 mg/ml) was obtained from the chicory roots without washing or extraction. The yield of DFA III from the washed chicory roots without extraction was at lowest(0.44 mg/ml). The production process of inulin fructotransferase and DFA III from the chicory root without prewashing or extraction steps were more efficient.