

Aureobasidium pullulans C-23 균주에 의한 Fructosyl Transferase 의 생산 최적 배양조건

조원태 · 임재운*

충북대학교 자연과학대학 미생물학과

Optimum Culture Conditions for the Production of Fructosyl transferase by *Aureobasidium pullulans* C-23

Cho, Won-Tae and Jai-Yun Lim*

Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Chungbuk National University, Cheong-ju 360-763, Korea

For optimal production of fructosyl transferase in *Aureobasidium pullulans* C-23, the effect of fermentation conditions for cell growth and fructosyl transferase production were investigated. Sucrose was excellent carbon source. Sucrose concentration for the optimum production of fructosyl transferase was 35%. Enzyme productivity was significantly increased by addition of ammonium oxalate and yeast extract. A time course study for the enzyme production by *Aureobasidium pullulans* C-23 was carried out. At 2 days incubation, the production of intracellular enzyme was maximum. The extracellular enzyme production was found to be increased up to 6 days.

Fructosyl transferase (EC 2.4.1.9)는 sucrose 를 가수 분해하고 유리되는 fructosyl group 을 sucrose 에 전이 하여 fructo-oligosaccharide 를 생성하는 효소이다. Fructo-oligosaccharide 는 fructosyl transferase 에 의해 전달된 fructose 가 sucrose 에 결합하는 위치와 sucrose 에 결합되어 있는 fructose 의 수에 의해 1-kestose, neo-kestose, nystose, fructosyl nystose 등으로 나눌 수 있다(1). 미생물이 생산하는 fructosyl transferase 의 연구는 1950 년대 *Aspergillus oryzae* (2), *Penicillium spinulosum* (3) 그리고 *Candida krusei* (4) 등이 생산하는 invertase 의 연구로부터 시작되었다. 그 이후로 *Claviceps purpurea* (5), *Phytophthora parasitica* (6), *Streptococcus mutans* (7) 그리고 *Fusarium oxysporum* (8, 9) 등에서 fructosyl transferase 의 기작과 fructo-oligosaccharide 의 구조 분석 등이 연구되었다. 최근 fructo-oligosaccharide 가 저감미, 저칼로리

(10) 건강식품으로 주목을 받게되면서 fructosyl transferase 의 생산성 증대에 관심을 갖게 되었다(11, 12). 본 연구에서는 300 점 이상의 미생물들을 자연계에서 분리하여 자연계의 미생물들 중 fructosyl transferase 를 생산하는 미생물이 얼마나 되는지를 조사하였고, 분리군들 중에서 효소의 생산성이 우수한 균주를 선발하여 (13) 효소 생산성 향상을 위한 배양의 조건들을 조사해 보았다.

재료 및 방법

사용균주

Czapek-Dox (sucrose 30-50%, NaNO₃ 0.5%, K₂HPO₄ 0.1%, MgSO₄ 0.05%, KCl 0.05%, FeSO₄ 0.001%) 배지를 사용하여 자연계로부터 분리한 *Aureobasidium pullulans* C-23 을 사용하였다(Fig. 1).

배양배지 및 배양방법

배양조건의 검토를 위한 기본배지로는 Czapek-Dox

Key words: Fructosyl transferase production, *Aureobasidium pullulans* var. melanigenum

*Corresponding author.

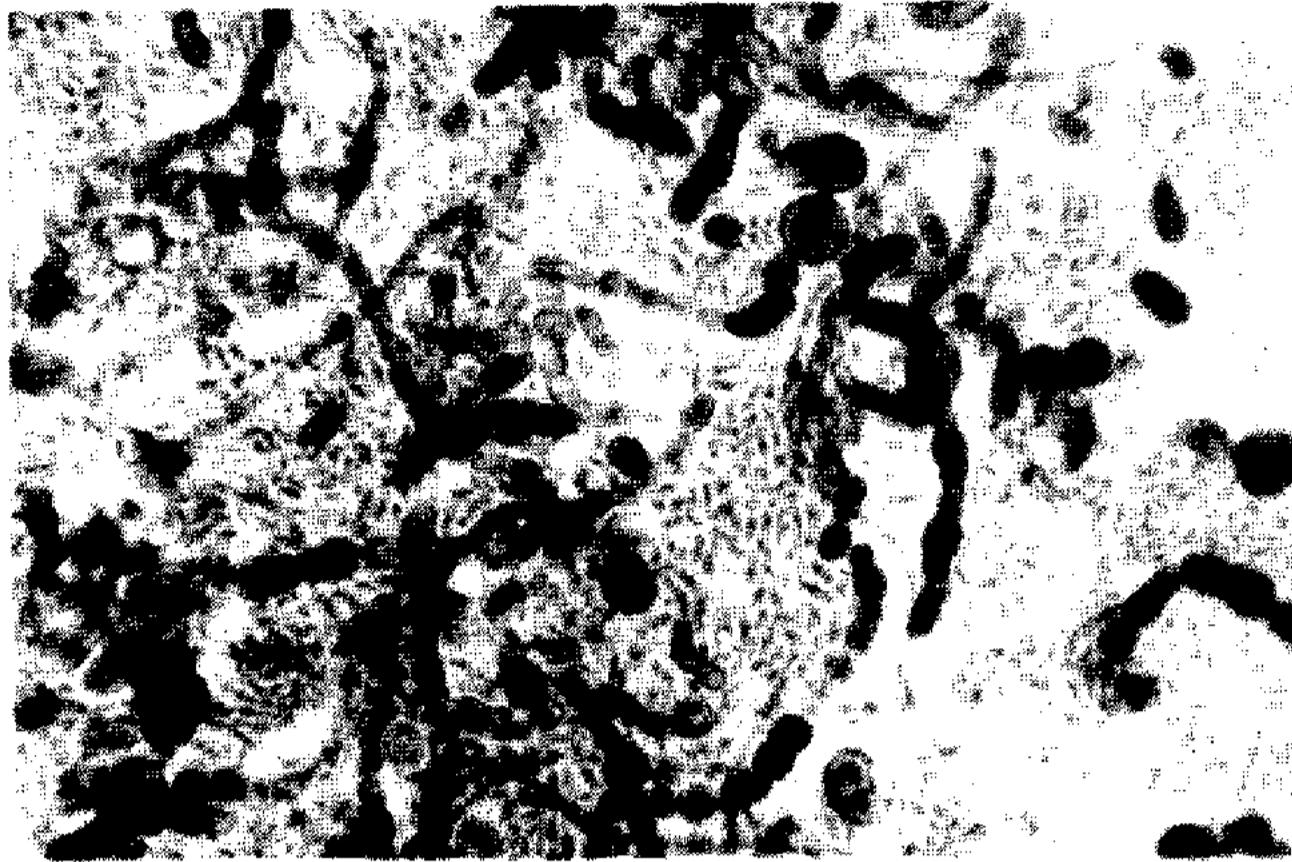


Fig. 1. Photomicrographs of *Aureobasidium pullulans* C-23.

(sucrose 5%, NaNO_3 0.5%, K_2HPO_4 0.1%, MgSO_4 0.05%, KCl 0.05%, FeSO_4 0.001%) 배지를 사용하였다. 배지의 초기 pH는 6.5, 온도는 30°C 로 shaking incubator (180 rpm)에서 3일간 배양하였다. 경시적 변화는 sucrose 15%, K_2HPO_4 0.5%, MgSO_4 0.05%, $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ 0.5%, KCl 0.05%, FeSO_4 0.001%, yeast extract 0.5%가 들어있는 배지를 사용하여 5l jar fermentor에서 수행하였다.

Cell growth의 측정

660 nm에서의 흡광도를 측정하여 결정하였다. 5l jar fermentor에서의 흡광도는 40 배 희석하여 측정하였다.

효소액의 조제

3일 동안 배양한 배양액을 원심분리 (3000 rpm 10분) 한 후 균체는 0.1 M (pH 5.5) sodium citrate buffer로 2회 세척하여 균체내 효소로 사용하였고, 상등액은 균체의 효소로 사용하였다.

효소 반응액의 조제 및 활성 측정

기질로는 80% sucrose 3.75 ml, 완충액으로는 0.1 M (pH 5.5) citrate buffer를 사용하였다. 효소반응은 55°C 의 water bath에서 5분 동안 preincubation 한 후 15분 동안 효소반응을 수행하였다. Fructosyl transferase의 활성은 효소액 1 ml가 1분 동안 $1\mu\text{mole}$ 의 glucose를 생성하는 효소량을 1 unit로 계산하였다.

당정량

효소 반응액 중의 환원당은 Somogyi-Nelson (14)법으로 정량하였고, glucose의 정량은 Glucose oxidase-peroxidase (Sigma diagnostic kit No.510)법에 따랐

다. 배양 중의 총당은 phenol-sulphuric acid (15)법에 따라 정량하였다.

Fructo-oligosaccharide의 분석

전개 용매로는 n-butanol : acetic acid : water = 4 : 1 : 2를 사용하였고, 전개는 12시간씩 2중 전개하였다. 발색은 urea spray reagent (16)를 사용하였다.

결과 및 고찰

Fructosyl transferase 생산균의 분리

Fructosyl transferase를 생산하는 균들이 고농도의 sucrose에서 배양했을 때 효소활성을 높게 나타낸다는 성질을 이용하여 Czapek-Dox agar plate에 sucrose를 30-50% 첨가한 후 자연계에서 폭넓게 검색하였다. 특히 fructosyl transferase의 기질인 sucrose가 풍부한 곳을 집중적으로 검색하였다. 분리된 300점의 미생물은 30°C 에서 4일간 배양한 후 효소활성을 측정해본 결과 분리균의 44%가 fructosyl transferase 활성을 갖고 있는 것을 발견하였다. 이들 분리균들 중 효소활성이 높은 균 13점을 1차 선발하였다. 선발된 균들은 주로 자동판매기와 토양 등에서 분리한 균들이다. 선발된 균을 3회 세대 배양한 후 효소의 활성을 비교해서 최종적으로 커피 자동판매기로부터 분리한 C-23 번을 선정하였다 (Table 1, Fig. 2).

Fructosyl transferase의 생산을 위한 배양조건

Initial pH의 영향 : 초기의 pH를 4.0부터 8.0까지 0.5 간격으로 배지를 만든 후 배양하여 효소의 활성을 측정해본 결과 pH 6.5에서 활성이 가장 높게 나타났다 (Fig. 3). 이 결과는 Smith 등 (17)의 보고와 일치한다. 균의 성장은 pH 5.5에서 가장 왕성하였다.

탄소원의 영향 : 각종 탄소원 5%를 함유한 기본배지를 이용하여 탄소원의 종류에 따른 효소 생산량을 조사해본 결과 Table 2와 같이 galactose, lactose, glycerol은 이용하지 못하였으며, 균의 성장은 fructose에서 가장 왕성하였지만 효소의 생산은 sucrose를 사용할 때가 가장 높았다. Sucrose를 탄소원으로 사용했을 때 가장 효소의 활성이 높았지만 raffinose나 maltose를 탄소원으로 넣어 배양했을 때에도 높은 효소의 활성을 나타내었다. 이런 결과로 볼 때 이 효소는 반드시 sucrose에 의해서만 유도되는 효소가 아니라는 점을 알 수 있다. 효소생산에 가장 우수한 탄소원인 sucrose를 농도가 5-50% 되게 배지에 첨가하고 배양했을 때 15%에서 성

Table 1. Fructosyl transferase productions of various isolates.

Isolate	Growth (660 nm)	Residual sugar (mg/ml) ^{a)}	Final pH	Enzyme activity (μ/ml)
B53	2.40	187.27	4.8	22.0
B54	2.38	184.56	7.3	36.9
C12	2.31	181.66	6.3	22.1
C13-1	1.37	197.53	3.8	0.0
C13-2	0.86	203.91	3.6	0.0
C14	2.37	182.43	4.0	23.9
C23	2.33	173.72	7.5	40.7
C26	2.51	175.46	4.2	28.8
D11	2.55	159.98	4.4	23.9
D11-1	2.46	160.95	3.0	20.3
93448	2.31	192.88	7.3	35.4

A) Residual sugar determined by phenol sulphuric acid method 30% initial sugar content was used.

장은 가장 우수했으나 효소의 생산은 35%에서 가장 높은 것으로 확인되었다. 효소생산에 가장 우수한 sucrose의 농도는 Smith 등(17)과 Jung 등(11)이 보고한 25%와 차이를 보인다.

질소원의 영향 : 질소원이 0.5% 들어있는 배지에서 배양하여 효소의 생산성을 비교해본 결과 균의 성장과 효소의 생산성은 모두 yeast extract가 들어있는 배지에서 가장 높게 나타났고 다음으로는 ammonium oxalate에서 효소의 생산이 우수하였다(Table 3). Ammonium oxalate를 각기 다른 농도로 배지에 첨가하고 배양한 결과 균의 성장은 1.0%에서 가장 우수하였고, 효소의 생산성은 균체내와 균체외 모두 1.2%에서 가장 우수한 것으로 밝혀졌다.

Phosphorus의 효과 : 각종 phosphorus를 초기농도가 0.5% 되게 배양한 후 효소의 생산을 비교해본 결과 K₂HPO₄가 가장 우수한 것으로 판정되었다. K₂HPO₄의 농도에 따른 효과를 조사해본 결과 1.0%에서 가장 생산성이 우수한 것으로 밝혀졌다. Jung 등(11)의 보고에 의하면 K₂HPO₄가 0.5% 배지에 첨가되었을 때 효소생산이 가장 우수하였고 그 이상의 농도에서는 효소생산이 감소하며 검은 색소가 생성된다는 보고와는 달리 C23의 배양에서는 1.0%까지 계속 증가하였고 0.5% 이상의 농도에서도 검은 색소의 생성은 관찰되지 않았다.

배양시간에 따른 Fructosyl transferase의 생산효과 :

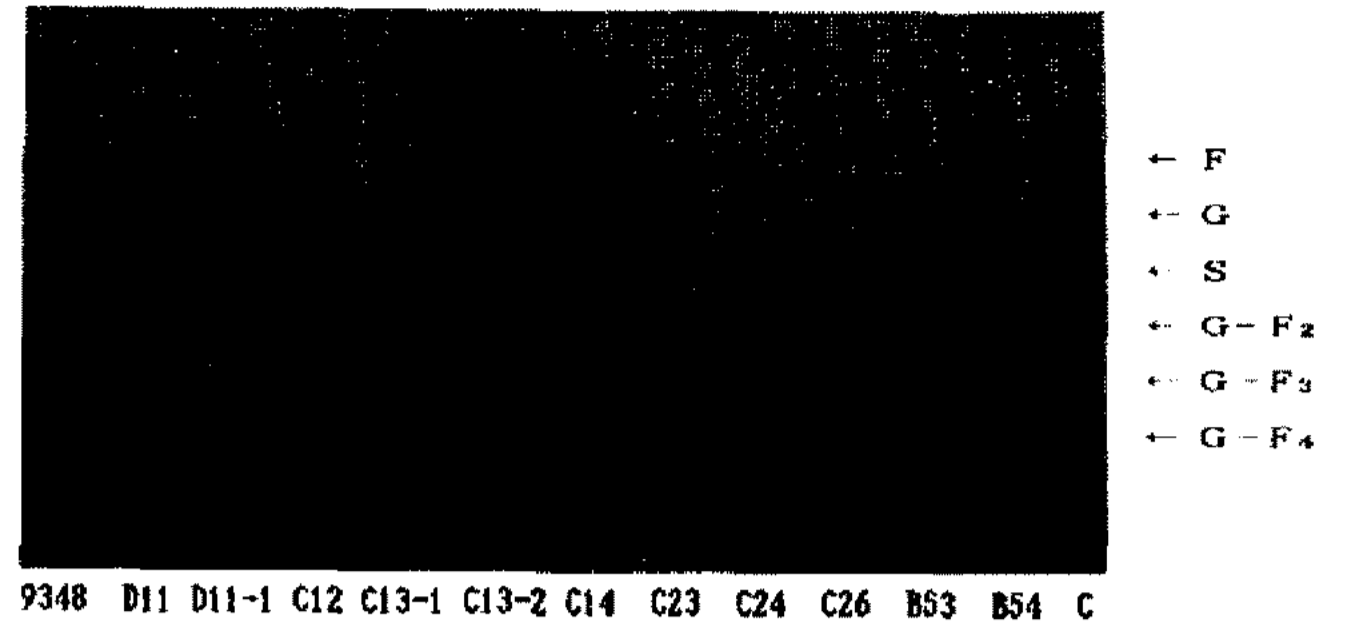


Fig. 2. The paper chromatography of various oligosaccharides synthesized by fructosyl transferase.

C: Standard compounds (F: fructose, G: glucose, S: sucrose, G-F₂; kestose, G-F₃; nystose, G-F₄; fructosyl nystose)

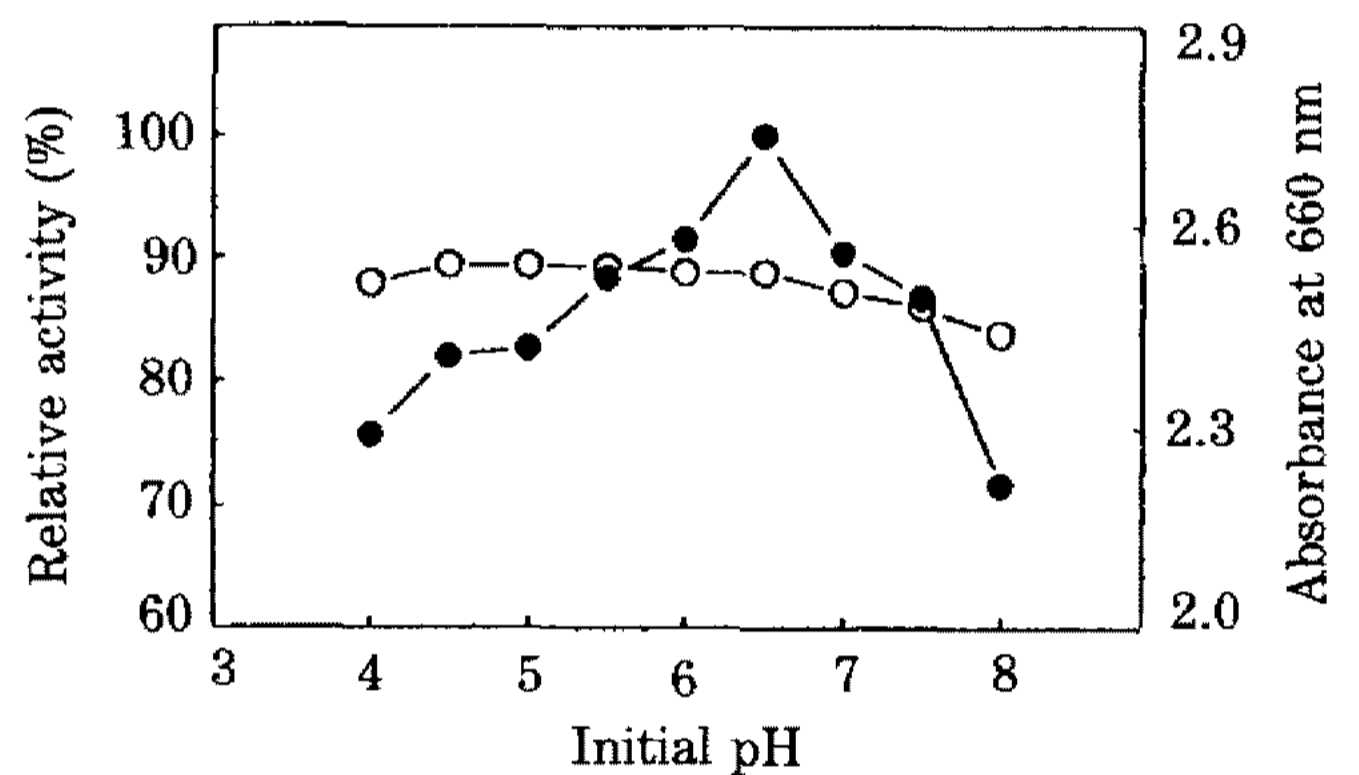


Fig. 3. Effect of initial pH on the enzyme production.

○; Growth, ●; Enzyme activity

균의 성장은 84 시간까지는 활발한 성장을 보이고 있지만 그 이후에는 성장이 진행되지 않았다. pH는 배양초기에 3.5 이하로 현저한 감소를 보이지만 3일 이후에는 초기의 pH 값과 유사한 값을 유지했다. 배양초기의 pH의 현저한 저하는 질소원으로 sodium nitrate를 사용할 때는 pH가 7.0-7.5 사이에서 큰 변화를 보이지 않지만 질소원으로 ammonium oxalate를 사용할 때 나타나는 것으로 보아 질소원이 소비되고 배지 성분 중 oxalic acid가 유리되기 때문에 pH가 저하되는 것으로 생각된다. 배양시간에 따른 세포 내외의 효소의 생산은 2일까지는 균체내 효소의 활성이 높게 나타났고, 그 이후는 균체외 효소의 활성이 높게 나타났다. 균체내 효소는 2일 이후부터는 효소의 생산량에 증가를 볼 수 없지만 균체외 효소는 배양시간에 따라 계속 증가하는 것을 볼 수 있다. 성장이 멈춘 후에도 균체외 효소활성의 증가는 계속되는데 이것은 cell의 lysis로 인해 균체내 효소가 세포밖으로 유리되었기 때문이라고 생각된다(Fig. 4).

다양한 당을 배양과정에 첨가했을 때 효소생산의 변화 : 탄소원을 sucrose로 해서 배양한 후 glucose를 첨

Table 2. Effect of various carbon sources on the enzyme production.

Carbon source ^{a)}	Growth (O.D. at 660 nm) (1/3 dilution)	Final pH	Residual sugar (mg/ml)	Relative activity (%)	
				Intracellular	Extracellular
Glucose	3.62	6.81	27.24	46.88	45.22
Fructose	4.84	7.08	34.85	41.07	46.88
Sucrose	3.41	7.17	32.12	100.00	93.36
Galactose	0.00	-	-	-	-
Lactose	0.00	-	-	-	-
Maltose	4.14	7.04	26.56	62.65	55.18
Glycerol	0.00	-	-	-	-
Raffinose	3.54	7.20	28.38	78.42	74.72
Xylose	4.01	6.88	45.41	33.60	65.14
Soluble starch	0.44	6.37	36.67	0.00	0.00

^{a)} 5% initial sugar content was used.

* The initial pH of fermentation medium was adjusted to 6.5.

Table 3. Effect of various nitrogen sources on the enzyme production.

Nitrogen source ^{a)}	Growth (O.D. at 660 nm) (1/3 dilution)	Final pH	Residual sugar (mg/ml)	Relative activity (%)	
				Intracellular	Extracellular
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0.72	5.99	51.76	7.19	8.12
NH ₄ NO ₃	6.11	1.78	47.22	14.16	7.19
(NH ₄) ₂ C ₂ O ₄	5.99	3.45	34.17	31.49	53.28
KNO ₃	2.93	6.91	49.49	24.05	31.02
NaNO ₃	3.04	7.13	44.27	20.65	26.39
(NH ₄) ₂ HPO ₄	5.79	2.47	32.92	14.93	18.33
Peptone	5.64	3.90	42.11	49.74	68.15
Yeast extract	7.20	5.12	15.89	52.24	100.00
Ammonium oxalate + Peptone				66.90	76.91
Ammonium oxalate + Yeast extract				82.68	108.82

^{a)} 0.5% initial nitrogen content was used.

가했을 때 효소의 생산이 억제받는다라는 보고(9)가 있어 sucrose가 첨가된 배지에서 2일 배양한 후 배지에 glucose와 fructose를 첨가하여 2일 배양한 후 효소생산의 변화를 관찰해 보았다. Glucose나 fructose를 배양 2일 후 첨가했을 때 효소의 생산은 저해받지 않았다. 위와는 반대로 glucose나 fructose에서 2일 배양한 후 sucrose를 첨가한 경우는 균체내 효소가 균체외 효소보

다 높게 생산되는 것을 관찰하였다. 이를 토대로 glucose가 10% 들어있는 5l fermentor에서 하루를 배양한 후 sucrose를 최종농도가 10% 되게 첨가한 다음 효소의 생산의 변화를 조사해 보았다. 균체외 효소는 sucrose로만 배양했을 때와 큰 변화를 나타내지 않았으나 균체내 효소는 sucrose 첨가 후 1일이 지났을 때 sucrose로만 배양할 때보다 효소의 생산량이 현저히 증

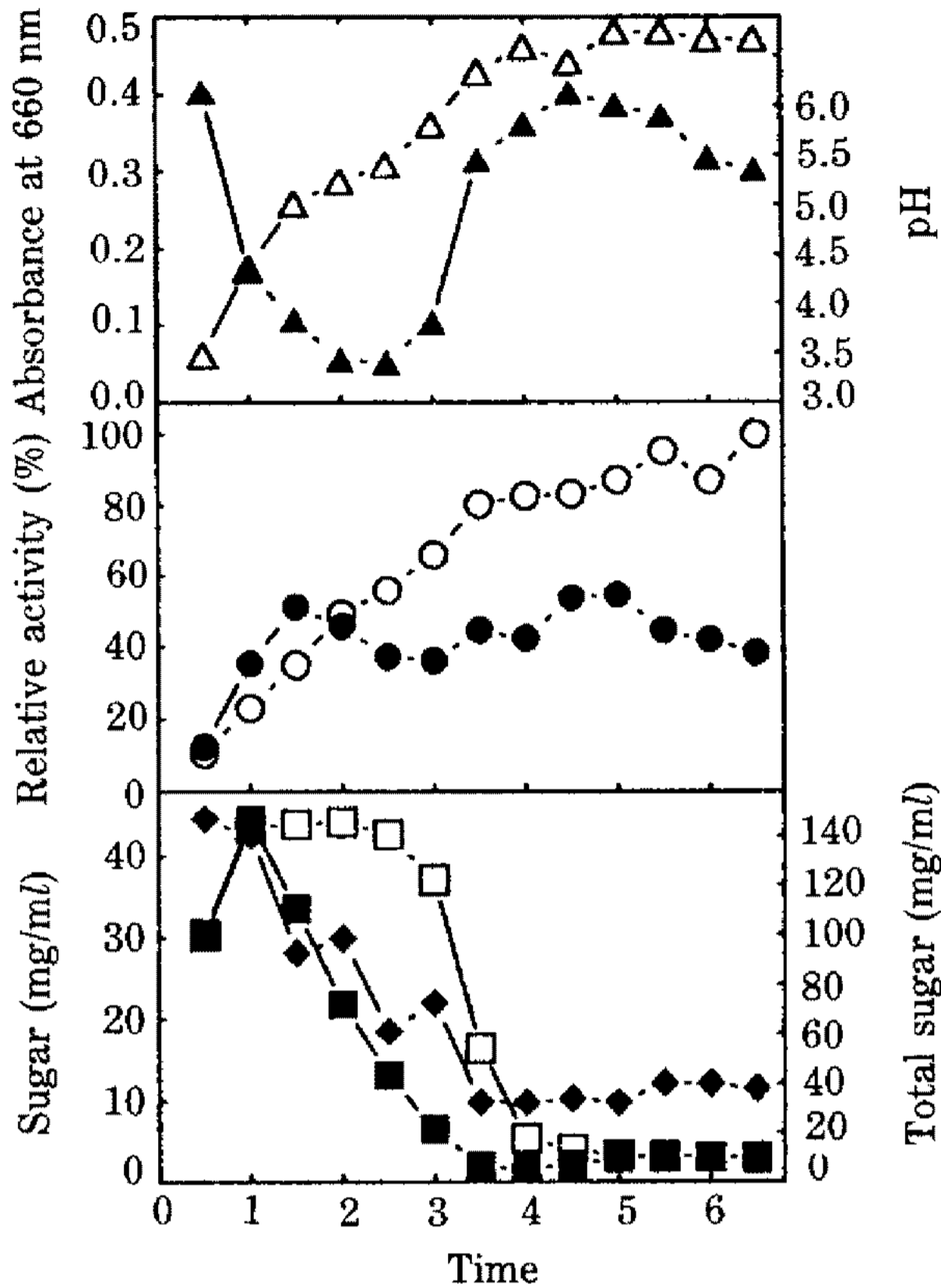


Fig. 4. Time course for the cultivation of *Aureobasidium pullulans* C-23 by 5l jar fermentor. Growth (Δ), pH (\blacktriangle), intracellular enzyme activity (\bullet), extracellular enzyme activity (\circ), total sugar (\blacklozenge), reducing sugar (\square), glucose (\blacksquare).

가함을 알 수 있었다(Fig. 5).

요 약

선발균의 효소생산성 향상을 위해 배양과정의 특징을 조사하였다. 효소생산을 위한 최적의 탄소원은 sucrose (35%)이고, 질소원은 ammonium oxalate와 yeast extract를 함께 넣어 주었을 때이었다. 5l jar fermentor에서 선발균의 배양형태를 조사한 결과 2-3일 배양기간에는 pH가 4 이하로 현저하게 감소하는 것을 관찰하였고 4일 이후 다시 pH가 5-6 사이로 증가하였다. 균의 성장은 4일까지 증가하였다. 균체내 효소의 생성은 2일까지는 현저한 증가를 보이고 3-4일 정도 큰 변화를 나타내지 않으며 5일 이후 감소하였다. 균체의 효소는 5-6일까지 계속 증가하는 형태를 나타내었다. Glucose로 24시간 동안 미리 배양한 후 sucrose를 첨가하여 배양했을 때 균체내 효소의 생산이 현저히 증가하는 것을 알 수 있었다.

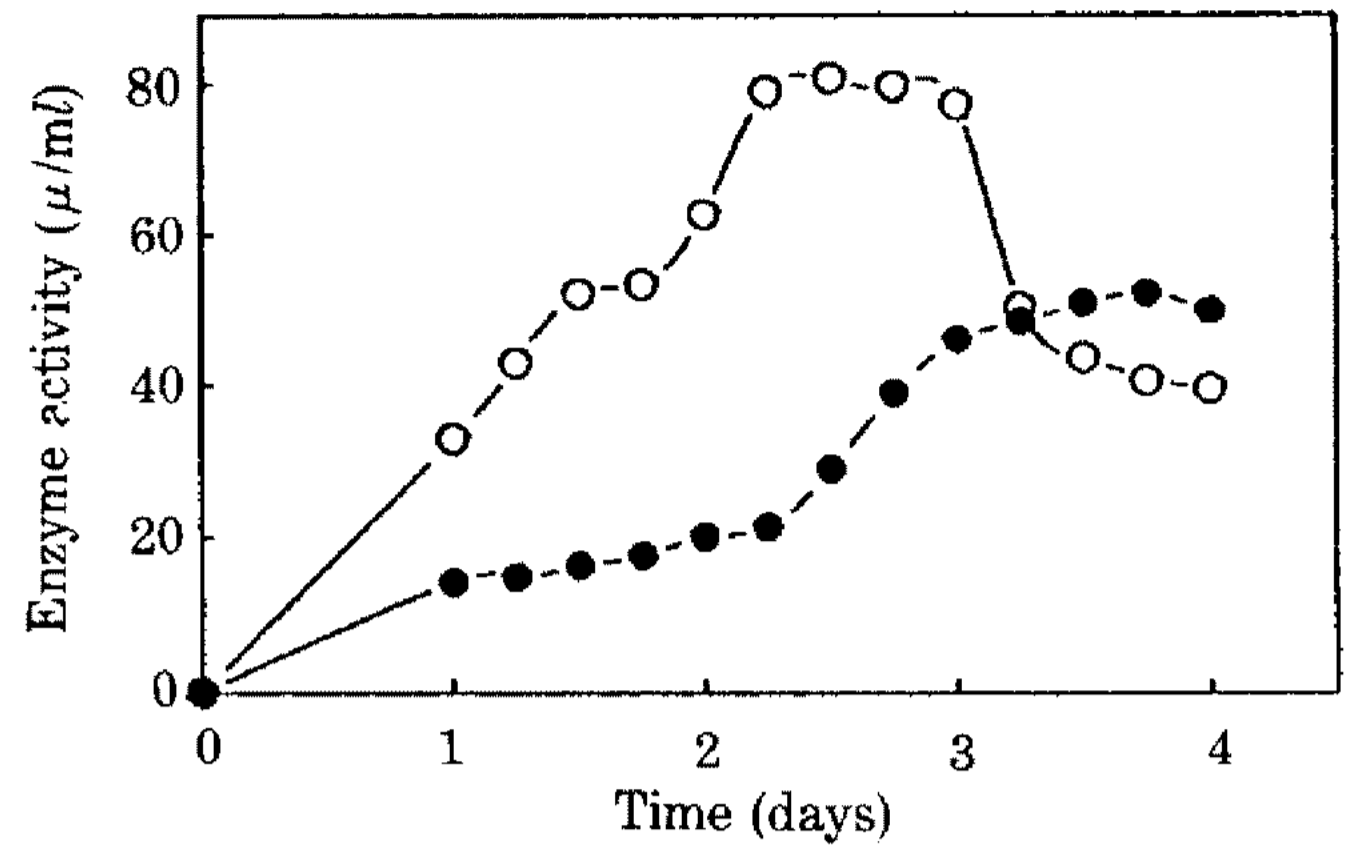


Fig. 5. Effect of addition of carbohydrate on fructosyl transferase production. \circ ; Intracellular enzyme, \bullet ; Extracellular enzyme. After incubation on the glucose (10%) medium for 1 day, sucrose (10%) was added to the glucose-containing medium.

감사의 말

이 논문은 1989-1990년도 문교부가 지원하는 학술진흥재단의 자유공모과제 학술조성비에 의하여 연구되었으며, 연구비 지원에 감사 드립니다. 균주의 동정에 도움을 주신 한국교원대학교 이상선 교수님께 감사드립니다.

참고문헌

1. Shiomi, N. J. Yamada and M. Izawa: *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 2233 (1979).
2. Pazur, J.H.: *J. Biol. Chem.* **199**, 217 (1952).
3. Bealing, F.J.: *Biochem. J.* **55**, 93 (1953).
4. Edelman, J.: *Biochem. J.* **57**, 22 (1954).
5. Dickerson, A.G: *Biochem. J.* **129**, 263 (1972).
6. Hankin, L. and McIntype, J.L.: *Appl. Environ. Microbiol.* **33**, 522 (1977).
7. Wenham, D.G., T.D. Hennessey and J.A. Cole.: *Journal of General Microbiology*, **114**, 117 (1979).
8. Gupta, A.K. and I.S. Bhatia: *Phytochemistry*, **19**, 2557 (1980).
9. Gupta, A.K. and I.S. Bhatia: *Phytochemistry*, **21**, 1249 (1982).
10. Oku, T., T. Tokunaga and N. Hosoya: *J. Nutr.* **114**, 1574 (1984).
11. Jung, K.H., J.Y. Lim, S.J. Yoo, J.H. Lee and M.Y. Yoo: *Biotechnol. Lett.* **9**, 703 (1987).
12. Jung, K.H., J.W. Yun, K.R. Kang, J.Y. Lim and J.H. Lee: *Enzyme Microb. Technol.* **11**, 491 (1989).
13. Cho, W.T., J.Y. Lim and S.S. Lee: *Kor. J. Mycol.* **18**,

- 1 (1990).
14. Nelson, N.: *J. Biol. Chem.* **153**, 375 (1944).
15. Michel, D., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers and Fred S.: *Analytical Chemistry* **28**, 350 (1956).
16. Wise, C.S., R.J. Dimler, H.A. Davis and C.E. Rist: *Anal. Chem.* **27**, 33 (1955).
17. Smith, J.A., D. Grove, S.J. Luenser: L.G. Park: *US patent*, **4**, 309, 505 (1982).

(Received July 10,1990)