

## 감미료 소재로서 Di-D-Fructofuranose DianhydrideIII의 물리 및 생리적 특성

박정복 · 김소자<sup>1</sup> · 최용진\*

고려대학교 자연자원대학 유전공학과, <sup>1</sup>상지 전문대학 식품영양과

**Some Physical and Physiological Properties of Di-D-Fructofuranose DianhydrideIII, a New Sweetener.** Jeong-Bok Park, So-Ja Kim<sup>1</sup> and Yong-Jin Choi\*. Department of Genetic Engineering, College of Natural Resources, Korea University, Seoul 136-701, Korea, <sup>1</sup>Department of Food and Nutrition, Sang-Ji Junior College, An-Dong 393-080, Korea - Some physical and physiological properties of di-D-fructofuranose dianhydrideIII (DFAIII), as a new sweetener, were investigated via *in vitro* experiments. The disaccharide was prepared by decomposing inulin with inulin fructotransferase (depolymerizing) from *Arthrobacter* sp. A-6. DFAIII had more excellent heat and acid stability than sucrose. This was one of the most desirable properties especially for the oligomer types of sweetener. DFAIII showed the least pH drop in the *Streptococcus mutans* culture, compared with the other saccharides examined. This indicates that the sugar will be fairly effective for preventing dental caries. The saccharide also had a selective *Bifidus* growth-promoting effect in PYF medium. Whereas, *E. coli* did not show growth promotion in the DFAIII-containing medium. In the co-culture of *Bifidus longum* and *E. coli* in the BL medium, *Bifidus longum* had a selective growth while the growth of *E. coli* appeared rather to be inhibited.

최근의 국민생활 수준의 향상과 식생활 패턴의 변화는 설탕과 포도당이 주가 되는 전체 감미료 섭취량의 증가로 인해 충치, 비만, 당뇨병의 관련질환 발생과 같은 국민 보건상의 심각한 부작용을 수반하고 있다. 따라서 전 세계적으로 감미료로서의 우수 특성은 그대로 유지하고 있으면서도 상기한 부작용을 최소화 할 수 있는 새로운 형태의 우수 감미료 개발이 절실히 요청되고 있는 실정이다. 최근 이와 관련하여 국내에서도 많은 연구가 이루어져 현재 다수의 감미료가 개발, 보고되고 있으며 그중 일부는 실제 상업화에 성공, 앞으로도 그 시장 규모는 꾸준히 증대될 것으로 예상되고 있다.

현재까지 국내에서 생산되고 있는 기능성 감미료로는 비피더스 증식 효과가 우수한 fructo oligosaccharide나 isomalto oligosaccharide와 같은 당 유도체 감미료 이외에 sorbitol, maltitol, xylitol과 같이 청량감과 동시에 항균성을 가지고 있는 당 알콜계 감미료, 그리고 아미노산 유도체로서 높은 감미도를 지닌 아스파탐 등과 같은 천연, 또는 합성 감미료등으로 분류할 수 있다. 그리고 이들 감미료는 산 및 효소분해법, 효소적 전이법, 발효법 및 추출법 등으로 제조되고 있는 것으로 보고되고 있다(1).

새로운 감미료 소재로서 크게 기대되고 있는 di-D-fructofuranose dianhydrideIII(DFAIII)가 미생물 효소에 의한 inulin 분해를 통해 생산 된다는 보고가 있어 왔다(2-6). 본 연구실에서도 di-D-fructofuranose dianh-

ydrideIII(DFAIII)를 다량 생산하는 *Arthrobacter* sp. A-6 균주를 토양으로 부터 분리하고 관련 결과의 일부를 이미 보고한 바 있다(7).

DFAIII는 저칼로리 당으로서 감미도는 fructose의 약 반 정도이며 비피더스균의 증식 촉진과 그로 인한 vitamin B complex 생성에 의한 영양 증진, 혈중 지질 및 콜레스테롤 함량 저하, 충치 예방, 면역 증강 내지는 변비 증세 개선 등의 생리 효과가 있는 것으로 알려져 있으나 이와 관련된 구체적 연구결과는 아직 보고되고 있지 않다.

따라서 본 연구에서는 *Arthrobacter* sp. A-6로 부터 다량의 DFAIII를 생산, 기능성 감미료로서의 몇가지 중요한 물리적 성질 내지는 충치 예방 효과와 비피더스 증식 촉진 효과 등과 관련된 일련의 실험을 실시하여 그 결과를 보고 한다.

### 재료 및 방법

#### 사용 시약

Isomalto oligosaccharide(IMO)와 fructo oligosaccharide(FOS)는 시중 판매 제품을 사용하였으며, isomalto oligosaccharide는 총당의 53%, fructo oligosaccharide는 60% 가량이 비 발효성 당으로 구성되어 있다고 한다. 기타 본 연구에 사용한 sucrose와 fructose등의 당류는 Sigma사의 1급 시약을 사용하였다.

#### DFAIII 생산, 분리 및 정제

*Arthrobacter* sp. A-6 토양 분리균을 전보(7)에 소개한

\*Corresponding author.

Key words: DFAIII, heat and acid stability, *Streptococcus mutans*, *Bifidobacterium*

효소 생산 최적 배지에서 48시간 진탕 배양하여 얻은 배양액을 원심분리하여 얻은 상등액을 inulin fructotransferase(depolymerizing) 조효소액으로 이용, 이 효소액에 동일 부피의 10% inulin 가질 용액을 첨가하여 pH 5.5, 60°C 조건에서 효소 반응시켜 DFAIII를 생산하였다. 반응이 끝난 반응액은 감압 농축시킨 다음 Biogel P2 column(20×1500 mm)에 주입하여 증류수(6 ml/1 hr)로 용출, 반응 부산물로 생성되는 소량의 fructose 과 fructo oligosaccharide를 제거함으로써 DFAIII를 순수 분리 정제하였다.

**시험 균주 및 증식시험**

**사용 균주** *Streptococcus mutans*는 두산 기술원에서, *Bifidus breve*(ATCC 15700), *Bifidus infantis*(ATCC 15697), *Bifidus adolescentis*(ATCC 15703), *Bifidus longum*(ATCC 15707), *Bifidus bifidum*(ATCC 11863) 및 야생형 *E. coli*는 한국 야쿠르트 연구소에서 분양받아 사용하였다.

**균주의 배양** *S. mutans*는 30°C에서, *Bifidus*와 *E.*

*coli*는 37°C에서 혐기적 배양을 하였다. 배지는 당 검색용 배지인 PYF 배지(16)에 각종 탄소원을 0.5% 첨가하여 사용하였다. *Bifidus longum*과 *E. coli*의 혼합 배양의 경우는 BL 배지(13)를 사용하였다.

**균수 측정** 균체 증식은 균체 증식에 따른 젖산 발효로 비롯되는 pH의 감소 또는 spectrophotometer를 이용, 600 nm에서의 흡광도로 표시하였고 혼합배양시에는 배양액을 적절히 희석하여 *Bifidus*는 *Bifidus* 선택용 BL-NPNL 배지에서 혐기적으로 배양하였으며, *E. coli*는 BL 배지를 이용한 호기적 조건에서 약 16시간 고체 배양한 후 colony counting을 하였다.

**열 안정성 측정**

정제한 DFAIII 용액(10 mg/ml)을 pH 2.5와 온도 범위 50~130°C에서 15분, 그리고 pH 5.5와 온도 범위 60~140°C에서 30분동안 가열 처리한 후 잔여 당 농도를 HPLC로 분석하여 대조실험으로 사용한 동일 농도의 sucrose와의 상대적 안정도를 비교 분석하였다.

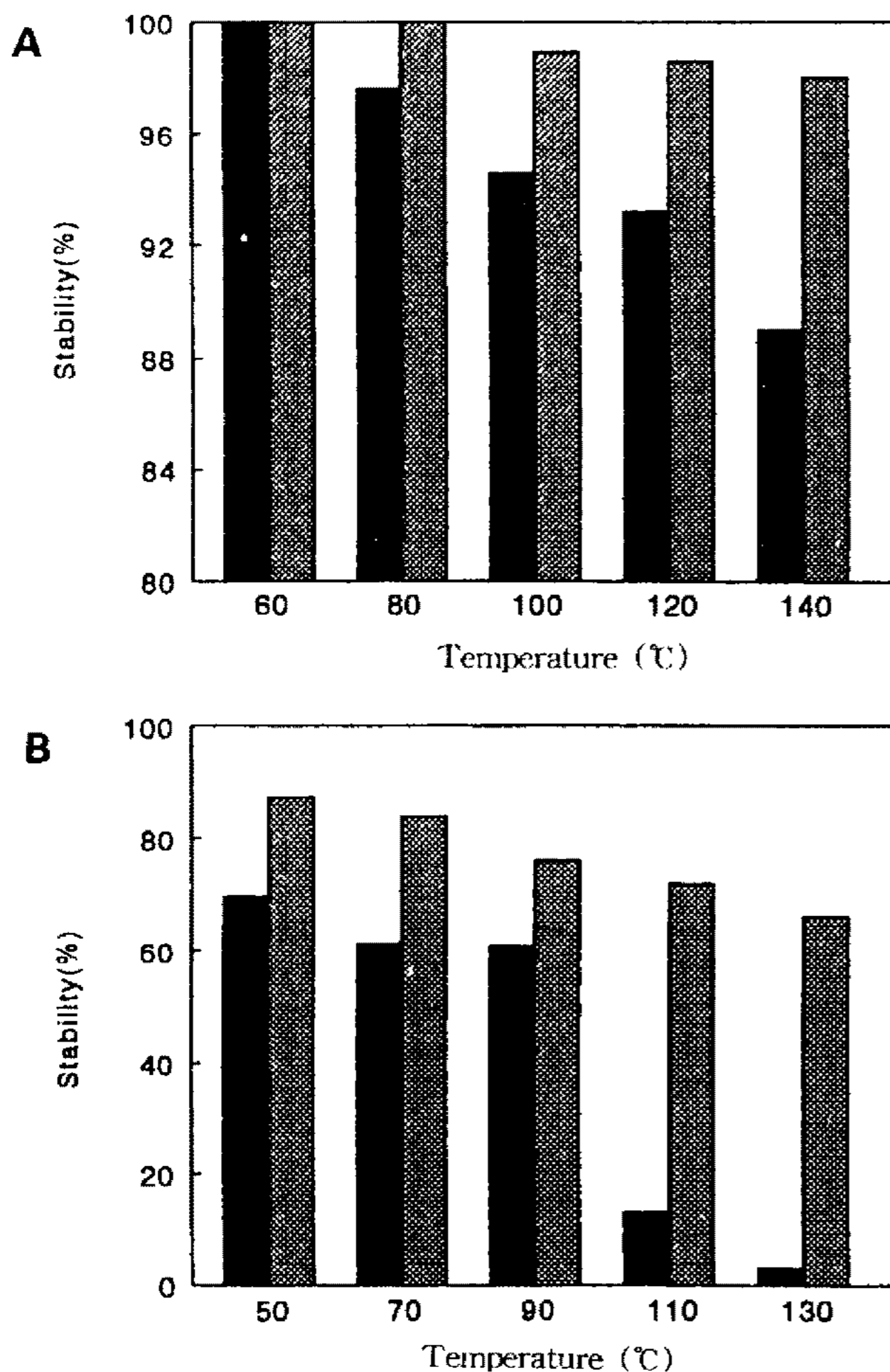
**DFAIII의 정량**

Waters' carbohydrate column(4.6×250 mm)과 RI detector를 이용하여 70°C, acetonitrile : water(70 : 30) 전개 용매와 유속 1.2 ml/min의 조건하에서 분석하였다.

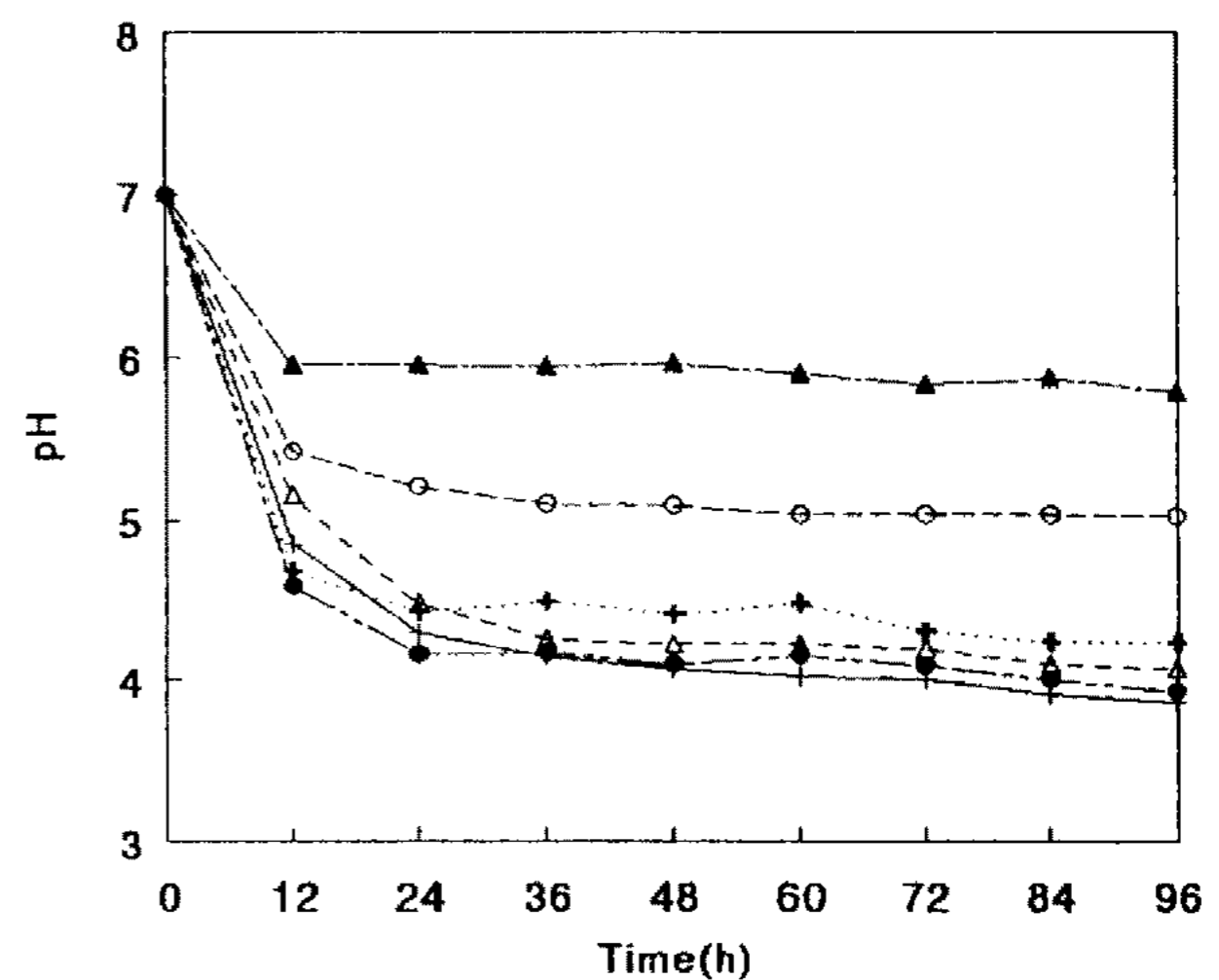
**결과 및 고찰**

**열 안정성 비교**

pH 2.5와 5.5에서 DFAIII와 sucrose의 열 안정성을 각각 검토하여 Fig. 1과 같은 결과를 얻었다. 각 pH에서 DFAIII는 sucrose에 비해 열 안정성이 훨씬 높은 것으로 나타났으며, 특히 사람의 위액과 동일한 pH 2.5인



**Fig. 1. Thermal stability of DFAIII and sucrose.**  
 A: Thermal stability at pH 5.5 (30 min at each temperature)  
 B: Thermal stability at pH 2.5 (15 min at each temperature)  
 ■: sucrose ■: DFAIII

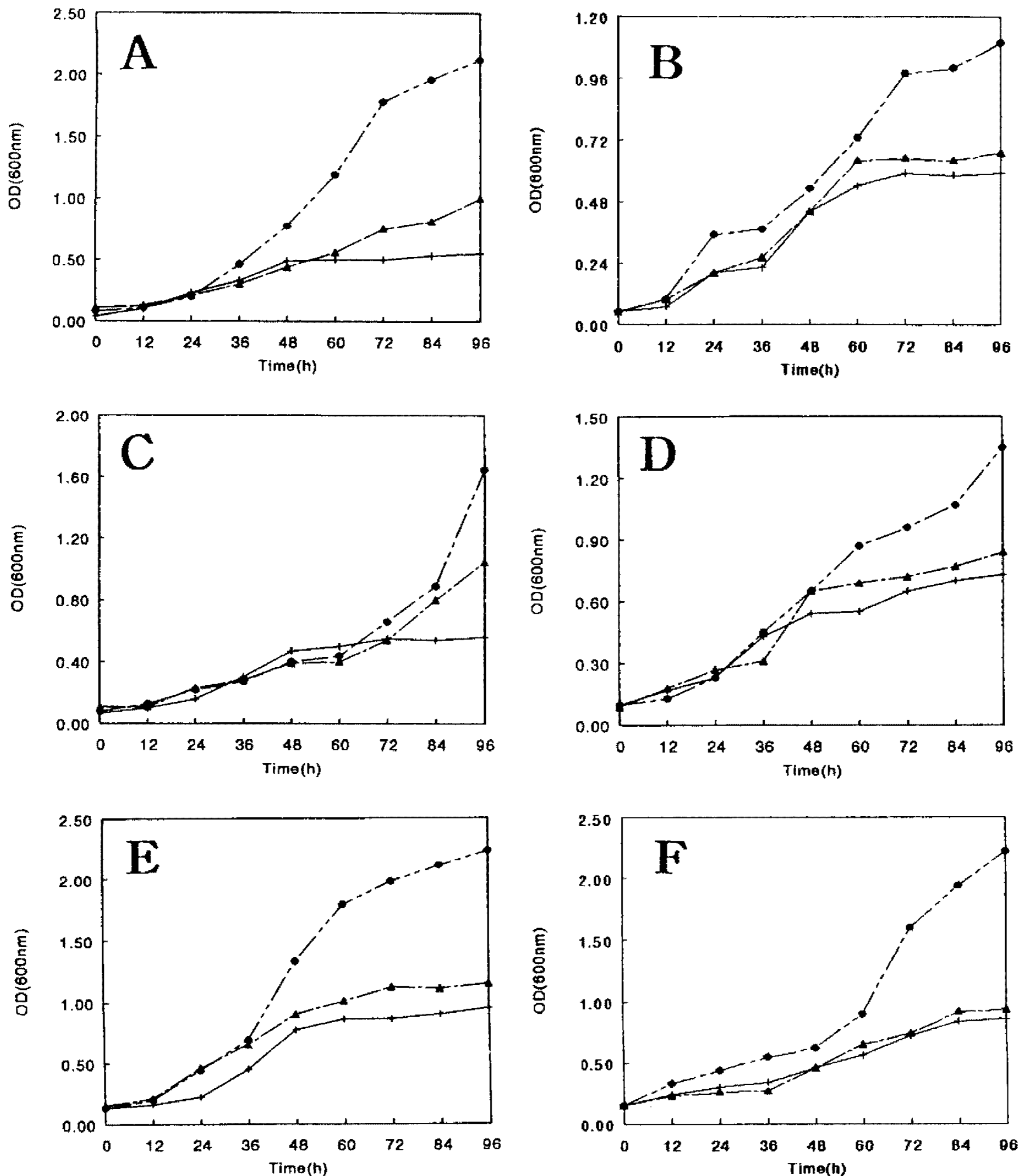


**Fig. 2. Degree of pH drop in the culture media of S. mutans containing different carbohydrate sources.**  
 -|- sucrose, -△-: fructose, -○-: DFAIII, -+-: IMO, -●-: FOS, -▲-: none

강산성에서의 열 안정성이 설탕에 비해 현저히 높음을 알 수 있었다. 이와같은 DFAIII의 높은 안정성은 dioxane ring 형태의 결합을 하고 있는 DFAIII의 화학 구조로부터도 쉽게 예측할 수 있었다. 김 등(13)에 의하면 140°C에서 60분 가열에 의해 이소말토 올리고당은 약 5%, 그리고 프럭토 올리고당은 약 94%가 분해되었다고 보고하고 있다. 따라서 DFAIII는 이소말토 올리고당과 비슷한 매우 높은 열 안정성을 보이고 있어 DFAIII가 식품 첨가 소재로서의 가장 중요한 필요 조건을 갖추고 있음을 확인하였다.

**S. mutans 증식에 미치는 영향**

충치의 주요 원인균중의 하나인 *S. mutans*는 구강 내에서 불용성 글루칸을 형성하는 혐기성 세균으로서, 젖산 발효를 통해 치아 주변을 산성화시켜 치아의 에나멜질을 부식시키는 것으로 알려져 있다(13). DFAIII와 현재 상품화 되고 있는 각종 올리고당을 0.5% 첨가한 PYF 배지에 *S. mutans*를 접종한 후 배양 시간에 따른 pH 변화를 측정하여 각 탄소원 이용에 의한 균체 증식 경향을 알아보았다. Fig. 2에 표시되어 있는 바와 같이 DFAIII는 다른 탄소원들에 비해 현저히 낮은 pH



**Fig. 3. Growth curves of *Bifidus* and *E. coli* in PYF medium containing respective carbohydrate sources.**  
 A: *Bifidus adolescentis* B: *Bifidus bifidum* C: *Bifidus breve* D: *Bifidus infantis* E: *Bifidus longum* F: *E. coli*  
 ●-: fructose, -△-: DFAIII, -|-: none

저하 효과를 보이고 있어 충치 예방 효과가 뛰어난 감미료인 것으로 분석되었다. 반면, sucrose를 비롯한 다른 올리고당류는 당류간 큰 차이없이 높은 pH 저하 현상을 나타내었다. 이와 같이 시판되고 있는 각종 올리고당이 *S. mutans*의 증식을 촉진시키는 효과는 아마도 30~50% 가량 함유되어 있는 발효성 당이 주 원인이 되고 있는 것으로 추측된다.

#### *Bifidobacterium*의 생육효과

사람의 장내 microflora를 구성하고 있는 주요 유용 세균인 *Lactobacillus*나 *Bifidus*는 젖산 발효를 통해 장내를 산성화시켜 *E. coli*나 *Clostridium*과 같은 유해 세균의 증식을 억제하는 정상 기능을 가지고 있는 것으로 알려져 있다(15). 그러나 유아기에는 성인기보다 *Bifidus* 균의 비율이 훨씬 높지만, 노령화 될수록 장내 *Bifidus* 균의 비율이 격감하는 것으로 보고되고 있다(18). 각종 올리고당은 체내에서 쉽게 소화 및 흡수가 되지는 않지만 *Bifidus* 균에 대해서는 효과적인 탄소 원료로 이용되어 *Bifidus*의 장내 증식을 촉진하는 것으로 보고되고 있다(14-18).

따라서 본 연구실에서 제조한 DFAIII의 구체적 생리 효과를 알아보기 위해 우선 일차로 사람의 장내에 많이 분포하는 것으로 알려진 5종의 *Bifidus* 균주와 *E. coli*를 PYF 배지에서 각각 혐기 배양하여 배양 시간에 따른 균체 증식도를 조사해 보았다. Fig. 3에 표시되어 있는 바와 같이 DFAIII는 균주에 따라 다소의 차이는 있으나 일반적으로 *Bifidus*에 대해서는 증식 촉진 효과를 나타내고 있는 반면에 *E. coli*는 전혀 증식을 촉진시키지 않았다(Fig. 3-F. 참조). 또한 DFAIII에 대한 *Bifidus* 균주의 선택적 이용을 알아보기 위해 *Bifidus longum*과 *E. coli*를 BL 배지에 혼합 배양하여 각 시간대별 pH 변화와 균체 증식도를 조사하여 Table 1과 같은 결과를 얻었다. DFAIII의 경우, 혼합 배양시에도 *Bifidus longum*의 증식을 선택적으로 뚜렷하게 촉진시켜 주는 효과를 보였으나 반대로 *E. coli*의 증식은 완전 억제하는 결과를 나타내었다. 이와 같은 결과는 일반적으로 각종 *Bifidus* 세균이 배양액의 pH 변화와 관계없이 *E. coli*와 *Clostridium perfringens* 같은 장내 유해 세균의 증식을 억제시키는 효과를 가진 물질을 생산, 분비한다는 보고(18)와도 잘 일치한다. 이와 대조적으로 glucose를 함유한 배지에서는 두 균주가 다같이 배양 15시간 이전에 이미 균체 증식의 정체기에 들어갔음을 짐작할 수 있었고 그 이후부터는 비교적 높은 사멸율을 보였으며 이와 같은 현상은 *E. coli*에서 더욱 현저하였다. 이상의 실험 결과를 종합 분석해 본 결과, DFAIII는 발효성 당을 다량 포함하고 있는 시판 각종 올리고당 제품과는 정확한 비교는 할 수 없었으나 모든 면에서 가장 우수한 생리 효과를 기대할 수 있는 감미료중의 하나인 것으로 판단되었다.

Table 1. Growths in the co-culture of *Bifidus longum* and *E. coli* in the presence of respective carbon sources.

Time(h)	OD <sub>600</sub>	pH	Number of cells in BL medium	
			<i>E. coli</i> (aerobic)	<i>Bifidus</i> (anaerobic)
No sugar				
0	0.21	6.9	1.1×10 <sup>7</sup>	1.4×10 <sup>6</sup>
15	0.23	6.5	2.8×10 <sup>7</sup>	9.6×10 <sup>6</sup>
24	0.32	6.2	1.8×10 <sup>7</sup>	1.3×10 <sup>7</sup>
39	0.35	6.1	1.3×10 <sup>7</sup>	2.1×10 <sup>7</sup>
Glucose				
0	0.22	6.9	1.1×10 <sup>7</sup>	1.3×10 <sup>6</sup>
15	0.17	4.1	<10 <sup>6</sup>	<10 <sup>6</sup>
24	0.16	3.9	1.0×10 <sup>3</sup>	7.0×10 <sup>3</sup>
39	0.15	3.9	<10 <sup>3</sup>	4.0×10 <sup>3</sup>
DFAIII				
0	0.19	6.9	1.1×10 <sup>7</sup>	6.8×10 <sup>5</sup>
15	0.63	5.1	1.5×10 <sup>7</sup>	8.7×10 <sup>7</sup>
24	0.57	5.0	5.0×10 <sup>6</sup>	1.1×10 <sup>8</sup>
39	0.53	4.9	6.9×10 <sup>6</sup>	6.3×10 <sup>7</sup>

#### 요 약

충치 원인균인 *Streptococcus mutans*와 유용 장내 세균인 각종 *Bifidus* 균주 증식에 미치는 di-D-fructofuranose dianhydrideIII(DFAIII)의 효과를 조사 분석하여 DFAIII의 생리 효과를 간접적으로 분석하였다. DFAIII는 *Arthrobacter* sp. A-6 토양 분리균이 생산하는 inulin fructotransferase(depolymerizing)을 이용, inulin을 분해하여 다량 생산한 다음 gel filtration 과정을 거쳐 순수 분리 정제하였다. 정제 DFAIII는 pH 2.5, 130°C에서 15분 가열 처리에 의해 약 35%의 분해율을 보이는 반면 sucrose는 완전히 분해되었으며, pH 5.5, 140°C 처리 조건에서는 거의 분해되지 않는 매우 높은 열 안정성을 나타내었다. 또한 충치 유발의 중요 기준이 될 수 있는 *S. mutans* 증식 효과도 fructose와 sucrose는 물론이고 시판 올리고당보다도 훨씬 낮았다. 반면, *Bifidus* 균에 대한 증식 효과는 균주에 따라 다소의 차이는 있었으나 증식을 전혀 보이지 않았던 *E. coli*에 비해 뚜렷한 증식 촉진효과를 나타내었다. BL 배지에서의 *Bifidus longum*과 *E. coli*의 혼합 배양에 있어서도 *Bifidus longum*의 경우에는 선택적으로 뚜렷한 증식 촉진 효과를 보였으나 *E. coli*의 증식은 오히려 억제됨을 확인하였다. 이상의 실험 결과를 종합 분석해 본 결과 DFAIII는 매우 우수한 생리 효과를 기대할 수 있는 감미료 소재중의 하나인 것으로 평가되었다.

## 감사의 말

본 논문의 투고료의 일부는 고려대학교 식품가공 핵심기술 연구센터의 지원을 받았습니다.

## 참고문헌

1. 이현수. 1992. 발효감미료의 생산현황과 전망. 한국산업 미생물학회 20년사. Pp. 138-147.
2. Tanaka, K., T. Uchiyama and A. Ito. 1972. Formation of di-D-fructofuranose 1,2':2,3' dianhydride from inulin by an extracellular inulinase of *Arthrobacter urea-faciens*. *Biochim. Biophys. Acta.* **284**: 248-256.
3. Haraguchi, K., M. Kishimoto, K. Seki, K. Hayashi, S. Kobayashi and K. Kainuma. 1988. Purification and properties of inulin fructotransferase (depolymerizing) from *Arthrobacter globiformis* C11-1. *Agric. Biol. Chem.* **52**: 291-292.
4. 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.
5. Yokota, A., S. Hirayama, K. Enomoto, Y. Miura, S. Takao and F. Tomita. 1991. Production of inulin fructotransferase (depolymerizing) by *Arthrobacter* sp. H 65-7 and preparation of DFAIII from inulin by the enzyme. *J. Ferment. Bioeng.* **72**: 258-261.
6. 강수일, 김수일. 1993. *Enterobacter* sp. S45에 의한 inulin fructotransferase의 생산. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 36-40.
7. 박정복, 권영만, 최용진. 1995. *Arthrobacter* sp. A-6에 의한 inulin fructotransferase의 생산. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 68-74.
8. 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**: 2089-2094.
9. Matsuyama, T. and K. Tanaka. 1989. On the enzyme of *Aspergillus fumigatus* producing difructose anhydride I from inulobiose. *Agric. Biol. Chem.* **53**: 831-832.
10. Matsuyama, T., K. Tanaka, M. Mashiko and M. Kamamoto. 1982. Enzymatic formation of di-D-fructose-1,2':2,1'-dianhydride from inulobiose by *Aspergillus fumigatus*. *J. Biochem.* **92**: 1325-1328.
11. Ueda, M., R. Sashida, Y. Morimoto and H. Ohkishi. 1994. Purification of inulin fructotransferase (DFAI-producing) from *Arthrobacter* sp. MCI 2493 and production of DFAI from inulin by the enzyme. *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**: 574-575.
12. Kobayashi, S. 1989. Production and properties of difructose anhydride. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* **63**: 1136-1140.
13. 김정렬, 육철, 권혁건, 홍성용, 박찬구, 박경호. 1995. 이소말토올리고당과 프락토올리고당의 물리적 성질 및 생리학적 특성. *Korean J. Food Sci. Technol.* **27**: 170-175.
14. Hidaka, H., Y. Tashiro and T. Eida. 1991. Proliferation of Bifidobacteria by oligosaccharides and their useful effect on human health. *Bifidobacteria Microflora* **10**: 65-79.
15. Yamazaki, H. and N. Dilawri. Measurement of growth of Bifidobacteria on inulofructooligosaccharides. 1990. *Letters in Applied Microbiology* **10**: 229-232.
16. Hidaka, H., T. Eida and T. Takizawa. 1986. Effects of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health. *Bifidobacteria Microflora* **5**: 37-50.
17. McKellar, R.C. and H.W. Modler. 1989. Metabolism of fructooligosaccharides by *Bifidobacteria* spp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 537-541.
18. Gibson, G.R., E.R. Beatty, X. Wang and J.H. Cummings. 1995. Selective stimulation of *Bifidobacteria* in the human colon by oligosaccharide and inulin. *Gastroenterology* **108**: 975-982.

(Received 1 August 1996)