한국생물공학회지 제 14권 제 5호
*Korean J. Biotechnol. Bioeng.*
Vol. 14, No. 5, 539-542(1999)

# 발효 및 효소반응을 통한 DFAⅢ의 생산 및 회수

이 재 찬 · [1,3,†]이 기 영 · [4]송 기 방 · [2]이 용 복
전남대학교 공업화학과, [1]생물화학공학과, [2]약학부, [3]촉매연구소, [4]생명공학연구소 응용미생물연구부
(접수 : 1999. 7. 31., 게재승인 : 1999. 10. 22.)

# Production of DFAⅢ by Fermentation and Enzyme Reaction and its Recovery

Jae-Chan Lee, Ki-Young Lee[1,3,†], Ki-Bang Song[2], and Yong-Bok Lee[4]
Dept. of Chemical Technology, [1]Dept. of Biochemical Engineering, [2]Faculty of Pharmacy,
[3]The Research Institute for Catalysis, Chonnam Nat'l Univ., Kwangju 500-757, Korea
[4]Applied Microbiology Research Division, KRIBB, KIST, P.O. Box 115, Yusong-gu, Taejon 305-600, Korea
(Received : 1999. 7. 31., Accepted : 1999. 10. 22.)

For the mass production of DFAIII and for the development of techniques of separation and purification of it, the methods of production of DFAIII and its recovery was investigated by fermentation with the strain of *Arthrobacter ureafaciens* KCTC 3387 and by enzyme reaction. In the first method, DFAIII was produced by fermentation with the strain of *Arthrobacter ureafaciens* KCTC 3387 and recovered from culture supernatant with silica gel by gel filtration, in the second method, it was produced by enzyme reaction and recoverd with the same method of the first, and in the third method it was produced by fermentation and recovered by addition of ethanol to the culture supernatnat. Against 25 g/L of initial concentration of inulin, 1.57, 4.40, 0.34 g/L of powder of DFAIII was recovered respectively and the rate of recovery was 6.3, 17.6, 1.4% and the purity was estimated at 81, 97, 87% respectively. For the production of DFAIII and its recovery, enzyme reaction method was the highest in the rate of recovery and its purity. By fermentation method, DFAIII was produced with 50% of initial concentration of substrate but the rate of recovery was lower than enzyme reaction method and purity was lowest among the three methods. Ethanol pricipitation method showed the lowest rate of recovery.

**Key Words** : inulin, DFAIII, inulaseII, *Arthrobacter ureafaciens* KCTC 3387

## 서 론

DFAs(difructose anhydrides)는 Jackson 등이 발견한 것으로 fructooligogosaccharide인 inulin에 황산을 처리하여 fructose시럽 제조중에 생성된 부산물 분석에 의하여 밝혀졌으며(1), 현재까지 DFAI~V까지 5종이 밝혀져 있다. 그 중 DFAⅢ는 inulin fructotransferase(depolymerizing)(E.C. 2.4.1.93)에 의해 효소적으로 생산되며(2-4), 환상 2당으로 비소화성이며, 충치발생저해, Bifidus균 증식인자, mineral 흡수 촉진인자 등으로 알려져 있고, 저칼로리, 저감미를 가진 당알콜류, 특수기능의 올리고당류나 당환상체와 고감미도를 가진 감미료 등의 개발 및 철과의 혼합 · 복합체를 형성하여 생체이용률이 높은 철분제제로 이용될 수 있는 것으로 보고되었다(5). 그러나, 제조원료의 수급문제나 DFAⅢ의 대량생산이 어려웠던 관계로 그 기능 및 활용에 관한 연구는 아직 활발하게 이루어지지 않고 있다(6). DFAⅢ를 실용화하기 위해서는 철과의 복합체에 대한 물리화학적 동정 및 체내동태 연구와 더불어 대량생산과 분리 · 정제기술의 개발이 시급히 선행되어야 된다. 이에 본 실험에서는 생체이용률이 높고 부작용이 적은 새로운 철결핍성 빈혈치료제의 개발을 위한 DFAⅢ의 대량생산 및 분리 · 정제 기술의 개발을 위해 대표적인 DFAⅢ 생산균주로 알려져 있는 *Arthrobacter ureafaciens* 균주(2,3)를 이용한 발효 및 분리정제된 효소반응을 통해 DFAⅢ를 생산하고 이를 회수하는 방법 및 수율에 대한 조사를 하였다.

† Corresponding Author : Dept. of Biochemical Engineering, Chonnam Nat'l Univ., Kwangju 500-757, Korea
Tel : 062-530-1843, Fax : 062-530-1849
E-mail : kilee@chonnam.chonnam.ac.kr

## 재료 및 방법

### 사용시약

Inulin(dahalia tuber 로부터 정제된 것임)은 Sigma사에서 구입하였고, 1-kestose(GF2), nystose(GF3), 1-F-fructofuranosyl-nystose (GF4)는 일본 명치제약주식회사에서 구입하였으며, 기타 일반시약은 시판 1급 시약을 사용하였다.

### 사용균주 및 배지

본 실험에 사용한 *Arthrobacter ureafaciens* KCTC 3387은 KCTC로부터 분양 받아 사용하였으며, 배양에 사용한 배지는 Yokota(7) 등이 사용한 배지에서 inulin의 양을 달리하여 사용하였다. 배지의 조성은 배지 1 liter 중에 25 g inulin, 2 g $NaNO_3$, 0.5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5 g KCl, 0.5 g $KH_2PO_4$, 0.01 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2 g yeast extract를 포함하며, 2M NaOH로 pH를 7.0으로 조절하여 사용하였다. 배양 중의 균체 증식은 660 nm에서의 O.D로 측정하였으며 건조세포중량으로 표시하였다.

### 미생물 배양 및 발효

전배양에서는 한천배지에 보관한 균주를 시험관에 담긴 5 mL의 멸균된 배지에 한백금이를 접종하여 26℃, 175 rpm의 조건에서 2일간 진탕배양 하였으며, 본배양에서는 1 L 플라스크에 담긴 200 mL의 배양액에 전배양액 2.5%(5 mL)를 접종하여 동일한 조건으로 배양하였다. 발효조는 7 L 발효조(한국발효기, KF-7L)를 사용하였고, 조업용량 4 L에, 본배양액 2%(80 mL)를 접종하였으며 공기는 1 vvm으로 공급하였고, 교반속도는 600 rpm, 온도는 26℃로 유지시켰으며, pH는 연동펌프를 통해 NaOH를 자동주입하여 7.0으로 유지시켜 배양하였다.

### 효소정제

균체를 제거한 후 한외여과장치(M.W. cut off 10,000)를 통하여 농축한 배양상등액에 60%의 $(NH_4)_2SO_4$를 첨가한 후 포화침전물을 원심분리하여 10 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)에 녹인 것을 조효소로 사용하였다. 조효소의 1차정제는 10 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)로 평형시킨 DEAE-Toyopearl 650 M column(2.5×75 cm)(Tosoh Co., Ltd., Tokyo)에 조효소 17 mL을 주입하고 21 mL/hr의 유속으로 흘려보내면서 bed volume의 5배의 동일 buffer로 washing하여 행하였으며, 활성분획을 모아 amicon concentrator에서 한외여과(M.W. cut off 10,000)하여 농축한 후 다음 정제에 사용하였다. 2차정제는 농축액을 10 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)로 평형화시킨 Sephadex G-200 column(2.5×75 cm)에 흡착시키고 42 mL/hr 유속의 동일 buffer로 용출시킨 다음 활성분획을 모아 amicon concentrator에서 한외여과(M.W. cut off 10,000)하여 농축한 후 다음 실험에 사용하였다. 효소활성단위는 1분 동안에 1 μmole의 DFAⅢ를 생성하는 효소량을 1 unit으로 정의하였다.

### DFAⅢ의 분석

생산된 DFAⅢ의 정량적인 분석은 HPLC를 이용하였다. 분리관은 Sugar-Pak column, 검출기는 RI detector, 용리액으로는 0.5 mL/min의 물을 사용하였다.

### DFAⅢ의 분리 및 농축

DFAⅢ는 미생물을 이용한 ① 발효배양 상등액을 chromatography를 통해 분리하는 방법과, ② 정제한 효소를 이용하여 효소반응을 시킨 후 분리하는 방법, 그리고 ③ 발효배양 상등액에 ethanol 첨가하여 침전시키는 방법을 통해 분리되었다. 첫 번째 방법에서는 발효배양액으로부터 균체를 제거한 후 한외여과(M.W. cut off 10,000)을 통하여 투과된 배양상등액(permeate)을 감압증류 하였고, 약 12배로 농축시킨 배양상등액을 1-propanol : ethyl acetate : water = 4 : 5 : 1(v/v)의 용액으로 평형화시킨 silica gel 60(0.2~0.5 mm, Merck) column(2.5×75 cm)에 주입시키고 동일 용매를 사용하여 50 mL/hr 유속으로 용출시켰다. 그리고 TLC를 통해 DFAⅢ를 확인하여 선별된 분획을 모아 감압농축하는 과정을 반복하여 분리하였으며 정제된 DFAⅢ는 동결건조하여 분말형태로 제조하였다. 두 번째 방법에서는 inulin 25 g/L를 함유하는 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0) 200 mL에 정제한 효소 3 mL(2.4 units)을 가하여 45℃에서 48시간 동안 반응시킨 후 반응이 끝난 혼합액을 4℃에서 12,000×g로 30분간 원심분리하여 그 상등액을 감압농축한 다음 첫 번째 방법과 동일한 방법으로 분리하였으며, 세 번째 방법에서는 발효배양 상등액에 3배량의 ethanol을 첨가하여 4℃에 정치시킨 후 침전된 생산물을 동결건조하여 분말형태로 제조하였다.

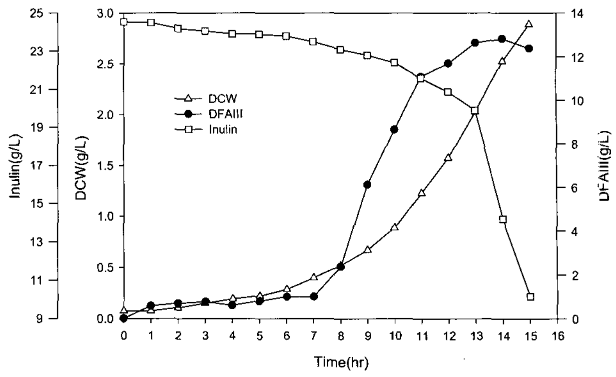


**Figure 1.** Time course of DCW and DFAⅢ production by *Arthrobacter ureafaciens* KCTC 3387.

### TLC 분석

분해산물의 분석은 silica gel plate(Silica gel 60, Merck)를 사용하여 1-butanol : 2-propanol : water : acetic acid = 7 : 5 : 4 : 2(v/v)의 혼합용매로 전개하여 행하였으며, 분리된 당 spot은 발색시약[p-anisaldehyde : $H_2SO_4$ : ethanol(1 : 1 : 18, v/v)]을 분무하고 oven에서 가열하여 검출하였다.

## 결과 및 고찰

### 미생물 발효

Inulin의 농도를 25 g/L로 할 때 시간에 따른 균체농도와 inulin의 잔여농도 및 DFAⅢ의 농도는 Figure 1과 같다. 발효 7시간 이후 세포성장이 빨라지면서 DFAⅢ가 급속히 생산되었으며 inulin의 급격한 소비가 일어났다. 발효는 DFAⅢ 양이 최고정점에 달한 후 감소하기 시작하는 시점(15시간)에서 정지시켰으며 이때 기질은 약 15 g/L가 소비되었고 생성된 DFAⅢ의 양은 12.4 g/L였다. Yokota 등(7)의 *Arthrobacter* sp. H65-7, 박 등(8)의 *Arthrobacter* sp. A-6 및 강 등(9)의 *Enterobacter* sp. S45에서 inulaseⅡ의 활성은 계속 증가하는 반면에 DFAⅢ는 배양도중 생성되었다가 감소하는 경향을 나타내고 있음을 보고하였고, Tanaka 등(4)과 Sakurai 등(10)은 DFAⅢ를 inulobiose를 거쳐 fructose로 분해하는 효소가 존재함을 보고하고 있는데 이는 생성된 DFAⅢ가 다시 기질로 이용됨을 알 수 있다. 발효를 통한 DFAⅢ 생산은 그 양이 감소하기 시작하는 시점에서 발효정지할

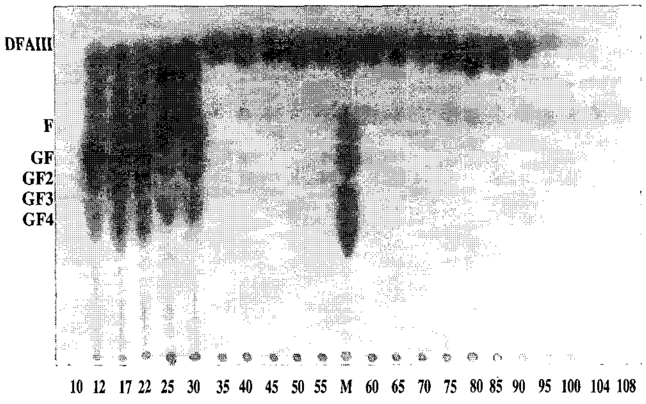


**Figure 2.** TLC analysis of purified supernatant by silica gel 60 column chromatography(M : Standard Marker, F : fructose, GF : sucrose, GF2 : 1-kestose, GF3 : nystose, GF4 : 1-F-fructofuranosyl-nystose).

때 최대의 양을 얻을 수 있으며, 그 양은 초기기질농도의 약 50%였다.

## DFAⅢ의 회수 및 정량분석

발효배양상등액을 silica gel 60으로 gel filtration한 결과는 Figure 2와 같다. 30번 분획까지 잡물질이 검출되었고, DFAⅢ가 분리된 35~96번까지의 분획을 모아 감압농축하였을 때는 F, GF, GF2, GF3, GF4가 미량 존재하였고, 감압농축한 것을 동결건조 하여 분말형태로 제조한 결과 1.57 g/L를 얻었다. 이는 Figure 1에서 생산된 12.4 g/L의 DFAⅢ 양에 대해서 12.7%, 초기기질농도 25 g/L에 대해서는 6.3%의 회수율을 나타낸다. Gel filtration 과정중의 초기분획 및 동결건조 과정에서 많은 손실이 발생하였다. 효소반응을 통한 DFAⅢ의 생산에서는 비활성이 10.49 unit/mg인 효소 3 mL(2.4 units)을 가해 반응시켰으며 배양상등액에 비해 잡물질이 없었으나 inulaseⅡ의 기질특이성에 따른 생성물인 GF2, GF3가 검출되었고 4.4 g/L의 분말로 회수되었으며 17.6%의 회수율을 나타냈다. 잡물질제거에 따른 손실은 적지만 gel filtration 및 동결건조 과정에서 손실이 발생하였다. 그리고 배양상등액에 에탄올을 첨가한 침전방법을 통해서는 0.34 g/L의 분말로 회수되어 1.36%의 회수율을 보였는데 가장 간편한 방법이었지만 회수율은 가장 낮았다. Figure 3은 위의 세 가지 방법으로 생산하여 제조한 분말을 TLC을 통해 나타낸 것으로 첫 번째 방법 Ⅰ은 F, GF, GF2, GF3, GF4, 두 번째 방법 Ⅱ는 GF2, GF3, GF4 그리고 세 번째 방법 Ⅲ은 F, GF2, GF3 등이 잡물질로 섞여 있음을 보여준다. 동일한 양에 대하여 DFAⅢ 농도는 두 번째 방법 Ⅱ가 가장 높고 세 번째 방법 Ⅲ이 가장 낮게 나타나고 있다.

## 반응생산물의 정량분석

Figure 4는 정제한 효소를 이용한 inulin 가수분해반응의 생성물을 HPLC로 측정한 것으로서 반응이 진행됨에 따라 inulin이 감소하여 DFAⅢ와 올리고당이 형성됨을 보여준다. 1시간 동안 22 g의 inulin이 분해된 후의 반응산물은 DFAⅢ, GF2, GF3, 및 GF4였으며 각각 15.0, 0.9, 2.4, 10.8 g/L 이었다.

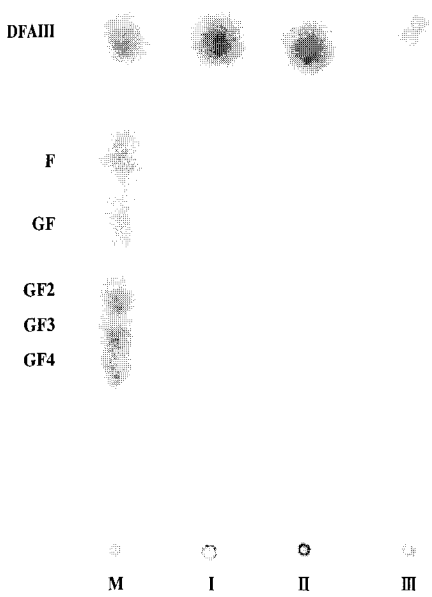


**Figure 3.** TLC analysis of powder recovered by various preparation method. Ⅰ. Silica gel chromatography from culture supernatant; Ⅱ. Silica gel chromatography from enzyme reaction; Ⅲ. Ethanol precipitation. of culture supernatant.

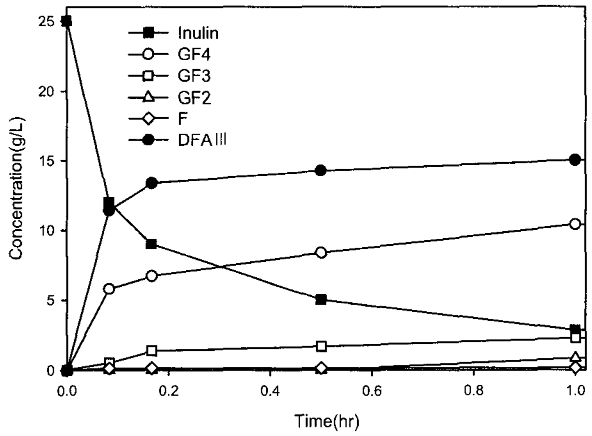


**Figure 4.** Changes in content of products during the hydrolysis of inulin(2.5%) by inulaseⅡ from *Arthrobacter ureafaciens* KCTC 3387. The enzyme reaction was done at 55℃ for the indicated period in a reaction mixture containing 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0), 2.5% inulin, 0.1 mL of the purified enzyme(0.08 units) in a total volume of 1 mL.

## 정제수율 및 순도추정

Table 1은 각각의 정제방법에 대하여 HPLC를 통한 정량분석과 표준품의 농도별 TLC 분석을 통하여 inulin에 대한 DFAⅢ 수율 및 정제된 DFAⅢ의 순도를 나타낸 것이다.

25 g/L의 초기 inulin 농도에 대한 세 가지 생산방법의 수율은 각각 6.3, 17.6, 1.4%이었으며 DFAⅢ의 순도는 각각 81, 97, 87%였다.

효소반응을 통한 DFAⅢ의 생산 및 회수가 가장 수율도 높고 순도도 높게 회수되었으며, 에탄올침전은 가장 간편한 회수방법이지만 수율이 가장 낮았다. 발효를 통한 DFAⅢ의 생산은 정제

**Table 1.** The quantitative analysis of products from inulin and estimation of recovery and purity for DFAⅢ.

| Production and Recovery Method | GF4 | GF3 | GF2 | GF | F | DFAⅢ | Recovery (%) | Purity (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | (g/L) | | | | | | | |
| Ⅰ. Chromatography from culture supernatant | 0.1 | 0.1 | 0.1 | – | 0.07 | 1.57 | 6.28 | 81 |
| Ⅱ. Chromatography from enzyme reaction mixture | – | 0.07 | 0.07 | – | – | 4.40 | 17.6 | 97 |
| Ⅲ. Ethanol precipitation from culture supernatant | – | 0.02 | 0.02 | – | 0.01 | 0.34 | 1.36 | 87 |

The quantitative analysis and estimation of recovery and purity for DFAⅢ was done by HPLC and TLC analysis. Initial concentration of inulin was 25 g/L.

된 효소가 없는 경우의 생산방법으로서 초기기질농도의 50% 정도를 생산할 수 있지만 배양액 내의 불순물을 효과적으로 제거하여 순도를 높이는 방법의 탐색이 필요하다.

DFAⅢ의 정제 및 회수를 위한 gel filtration에서 많은 손실이 발생하는 것을 줄이기 위해서 충진물질인 silica gel의 입자크기를 달리하고, 분리효율을 높일 수 있는 적정한 유기용매의 탐색이 필요한 것으로 사료된다.

## 요 약

DFAⅢ의 대량생산과 분리·정제 기술의 개발을 위해 *Arthrobacter ureafaciens* KCTC 3387 균주를 이용한 발효 및 분리정제된 효소반응을 통한 DFAⅢ의 생산과 회수에 대하여 조사하였다. 첫 번째 방법으로는 *Arthrobacter ureafaciens* 균주를 발효배양하여 DFAⅢ 양이 최고가 되는 시점에서 발효정지 시킨 후 silica gel을 통해 gel filtration을 하여 분리하였고, 두 번째 방법으로는 정제된 효소로 반응시킨 다음 silica gel을 통해 gel filtration을 하여 분리하였으며, 세 번째 방법으로는 발효배양상등액에 에탄올을 첨가하여 생산물을 침전시켜 DFAⅢ를 분리하였다. 25 g/L의 초기 inulin 농도로부터 각각 1.57, 4.40, 0.34 g/L의 정제분말이 얻어져 각각 6.3, 17.6, 1.4%의 수율로 회수되었고, 81, 97, 87%의 순도를 각각 나타내었다. 효소반응을 통한 DFAⅢ 생산 및 회수가 가장 높은 수율과 순도로 회수되었으며, 발효배양을 통한 DFAⅢ의 생산은 초기기질농도 25 g/L의 50%에 해당하는 DFAⅢ가 생산되었으나 효소반응에 의한 생산보다는 낮은 수율로 회수되었고 순도는 세 가지 방법 중 가장 낮았으며, 에탄올 침전방법은 가장 낮은 수율을 나타내었다.

## 감 사

본 연구는 보건복지부의 보건의료기술 연구개발사업 연구비로 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

1. Jackson, R. F. and S. M. Goergen (1929), A Crystallin difructose anhydride from hydrolyzed inulin, *Bureau of Standards Journal of Research*, **3**, 27-38.
2. Tanaka, K., T. Uchiyama and Ito A. (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.
3. Uchiyama, T., S. Niwa and K. Tanaka (1973), Purification and Properties of *Arthrobacter ureafaciens* InulinⅡ, *Biochimica et Biophysica Acta.*, **315**, 412-420.
4. Tanaka, T., T. Uchiyama, H. Kobori and T. Tanaka (1975), Enzyme hydrolysis of di-D-fructofuranose 1,2':2,3' dianhydride with *Arthrobacter ureafaciens*, *J. Biochem.*, **78**, 1201-1206.
5. Baik, B. H., Y. W. Lee and Y. B. Lee (1997), Antianemic agent containing iron and difructose, US patent No. 5700832.
6. Sakurai, H., A. Yokoda and F. Tomita (1997), A new perspective on inulin as a carbohydrate resource, *Bioscience and Bioindustry*, **55**, 25-29.
7. Yokota, A., S. Hirayama, K. Enomoto, Y. Miura, S. Takao and F. Tomita (1991), Production of Inulin Fructotransferase (Depolymerizing) from *Arthrobacter* sp. H65-7 and Preparation of DFAⅢ from Inulin by the Enzyme, *J. Ferment. Bioeng.*, **72**, 258-261.
8. 박정복, 권영만, 최영진 (1995), *Arthrobacter* sp. A-6에 의한 Inulin Fructotransferase (depolymerizing)의 생산, *한국산업미생물학회지*, **23**(1), 68-74.
9. 강수일, 김수일 (1993), *Enterobacter* sp. S45에 의한 Inulin fructotransferase의 생산, *한국산업미생물학회지*, **21**(1), 36-40.
10. Sakurai, H., A. Yokota, Y. Sumita, Y. Mori, H. Matsui and F. Tomita (1997), Metabolism of DFAⅢ by *Arthrobacter* sp. H65-7: Purification and Properties of a DFAⅢ Hydrolysis Enzyme (DFAⅢase), *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 989-993.