

Inulinase 생산 균주의 분리·동정 및 효소 생산 최적조건

임성일* · 이대희 · 홍석산 · 유진영
한국식품개발연구원

Screening and Identification of an Inulinase Producing Microorganism and Optimal Condition for the Enzyme Production. Lim, Seong-II*, Dae-Hee Lee, Seok-San Hong, and Jin-Young Yoo. *Division of Food Biotechnology, Korea Food Research Institute, San 46-1, Baekhyundong, Songnam, Kyonggido 463-420, Korea* – In an attempt to develop a unique enzyme (inulinase) for fructan utilization, bacterial strains were isolated from soil. Strain 96-11 secreting inulinase of high activity was tentatively identified as *Arthrobacter protophormiae/ramosus*. The optimum culture conditions of the strain for the production of the inulinase were as follow: inorganic salt basal medium contained sources [1% (w/v) inulin, 1% (w/v) tryptone, and 1% (w/v) NH₄Cl], 35°C, initial pH 7.5, aeration 1 vvm and agitation 200 rpm.

Key words: inulinase, *Arthrobacter protophormiae/ramosus*, culture condition

설탕 대체 소재로서 올리고당은 지난 10여년간 전 세계적으로 관심이 되어 왔으며 말토올리고당, cyclodextrin, 당알코올 등이 상품화되어 음료수, 과자류, 카라멜, 초코렛, 아이스크림 등에 이용되고 있다. 이들 소재는 장내 균 총의 선택적 증식을 도와 장내 건강을 유지시킬 수 있는 소위 올리고당 및 그 유도체로 개발된 것이 대부분이다. 올리고당의 제조는 전분, 설탕 등으로부터 amylase, pullulanase, β -fructofuranosidase, glucansucrase를 이용하여 제조하며 이들 효소는 곰팡이나 세균으로부터 생산하여 사용하고 있다[6]. 국내에서는 주로 설탕과 전분당을 이용하여 올리고당을 제조하고 있으며, 제일제당이 1987년 프락토 올리고당을 상품화한 이래 5개회사에서 4가지의 올리고당이 시판되고 있다. 제조공정 중 효소는 필수적인 것으로, 제일제당에서 생산하는 *Aureobasidium pullulans* 유래의 fructosyl transferase가 유일하게 개발된 것이고, 그 밖의 대부분은 미국이나 일본에서 수입하여 제품을 생산하는 실정으로 거액의 로열티를 지불하고 있다. 그리고 fructan 계통의 효소는 아직 제대로 개발되지 않은 상황에서 이들의 국내 활용도가 점차 확대되고 있어 이에 대한 연구가 필요하다고 사료된다.

지금까지 보고된 연구를 보면 정 등은 *Aureobasidium pullulans*를 이용하여 fructosyl transferase를 추출하여 올리고당 생성반응을 최적화 한 바 있으며[9]. 조와 임[4]은 *Aureobasidium pullulans*이 생산하는 효소의 역가를 극대화하기 위하여 발효배지 및 환경조건을 최적화 하는 연구를 실시한 바 있다. 그 외에도 몇몇 inulin을 endo 및 exo형

으로 절단하는 효소를 찾고자 노력하였지만 보다 산업화 지향적인 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것으로 생각된다.

Inulin은 30-35개의 fructose가 β -2,1결합으로 연결되어 있는 비환원성 말단에 glucose가 sucrose형태로 α -1,2결합한 fructan의 일종으로 다알리아, 돼지감자, 치커리, 양파, 마늘 등에 탄수화물로 다량 함유되어 있는데, 본 연구에서는 이러한 국내의 부존자원에 존재하는 inulin을 inulinase를 이용하여 간단한 반응으로 기능성 올리고당을 제조할 수 있는 효소를 개발하고자 inulin 관련 효소를 생산하는 미생물을 선별하고 미생물이 분비하는 fructan depolymerase (inulinase)의 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

균주 분리용 시료의 수집

Inulin 분해효소를 생산하는 미생물의 분리를 위한 시료는 inulin을 함유한 식물체(양파, 마늘, 다알리아 등) 주변의 토양을 중심으로 수집하였다.

균주의 분리 및 선정

균주는 세균과 곰팡이를 중심으로 분리하였다. Inulin 분해능을 가진 균주의 선별은 수집된 시료를 0.85% 생리식염수에 희석하여 일부를 취하여 plate count agar 및 potato dextrose agar에 독립 colony를 형성시키고 이를 inulin (1%)이 함유된 배지에 접종하여 30°C에서 배양하여 colony 주변에 투명환을 생성하는 균주를 inulin 분해 균주로 선별하였다. 이때 배지는 inulin을 기본으로 한 무기염류 기초배지로서, 먼저 100 mL의 stock soln. 1 [K₂HPO₄ (2.8 mM), KH₂PO₄ (12.8 mM), Na₂SO₄ (11.5 mM), MgCl₂·6H₂O

*Corresponding author
Tel. +82-342-780-9277, Fax. +82-342-780-9265
E-mail: silm@kfri.re.kr

(9.55 mM), $MnCl_2 \cdot 6H_2O$ (50.5 μM)]과 1 mL의 stock soln. II [$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (10 μM), $FeCl_3 \cdot 2H_2O$ (90 μM)/50%의 HCl 원액]를 NH_4Cl 1.07 g과 섞고 증류수를 가한 다음 1 L로 정용하고 pH를 7.0으로 맞춘 후, bacto-agar를 넣어 녹이고, 121°C에서 15분 멸균한 다음, 50°C로 냉각 후 inulin을 넣어 제조하였다.

공시균주

Inulin으로부터 여러 가지 중합체를 만드는 96-11 균주를 공시균주로 하여 균주의 동정 및 inulinase의 최적생산조건을 조사하였다.

균주의 동정

균주의 동정은 현미경(BX 40, Olympus, Japan)에 의한 형태학적 특징, Microstation TM System (Biolog Inc. U.S.A) 사용하여 각종 생리, 생화학적 특성을 실험하고, Bergey's Manual Systematic Bacteriology[1]의 분류 방법에 따라 동정을 행하였다.

균주의 배양 및 효소 생산조건 검토

96-11 균주의 배양은 무기염류 기초배지에 탄소원으로서 inulin, fructose, soluble starch, xylose, glucose, sucrose, lactose, dextrin (Sigma Chem. Co. U.S.A)을 그리고 1% inulin이 함유된 무기염류 기초배지에 유기질소원으로서 malt extract, beef extract, peptone, casein, yeast extract, tryptone을, 무기질소원으로서 $NH_4H_2PO_4$, Na_2HPO_4 , $(NH_4)_2C_2O_4 \cdot H_2O$, KNO_3 , $(NH_4)_2HPO_4$, NH_4Cl 을 첨가한 배지로 30°C에서 150 pm으로 48시간 배양하였다. 또한 96-11 균주의 배양 초기 pH, 배양온도, 통기조건에 대한 영향은 무기염류 기초배지에 각 1% (w/v)의 inulin, tryptone, NH_4Cl 을 첨가한 배지에 균주를 배양하여 검토하였으며 이때 발효시스템은 Multigen Fermentor (working volume: 1 L, NBS, U.S.A)를 사용하였다.

효소활성 측정

Inulinase는 기질인 inulin의 2,1-결합을 절단하여 여러 가지 올리고당과 β -D-fructose의 중합체를 만든다. 따라서 효소활성은 효소반응생성물인 환원당을 정량하여 역가를 측정하였다. 즉 inulin 기질 [2% (w/v) inulin/50 mM phosphate buffer, pH 7.0] 0.5 mL에 효소액 0.5 mL를 가하여 45°C에서 30분 반응시킨 후 생성된 환원당의 함량을 DNS법으로 측정하였다[5]. 효소단위는 효소액 1 mL가 inulin를 가수분해하여 분당 1 μM 의 환원당을 생성할 때를 1 unit로 하였다. 이때 표준물질은 glucose를 사용하였다.

박층 크로마토그래피

Inulin 분해산물 분석을 위한 TLC (Thin layer chromatography)

는 균주를 1% inulin이 함유된 무기염류 기초배지 50 mL에 접종하여 200 rpm에서 2일간 배양한 후 원심분리하여 상등액을 Merk사의 silica gel TLC sheet을 이용하여 전개한 후 methanol:H₂SO₄ (1:1, v/v)을 분무한 후 105°C에서 10분간 발색시켜 비교하였다.

결과 및 고찰

Inulinase 생산 미생물의 분리

Inulinase 생산 미생물의 분리는 inulin을 함유한 기본 염류배지에서 실시하였다. 우선 표준 한천배지에서 세균 및 곰팡이를 분리하고, 이들 미생물을 inulin이 함유된 배지에 접종하여 생육 여부를 확인한 후 에탄올을 넣어 방치했을 때 집락 주변에 투명환이 생기는지 여부를 조사하였다.

시료는 전국의 마늘, 양파, 다알리아 및 이들의 재배농가로부터 토양을 수집하여 사용하였다. 총 861개의 수집시료로부터 inulin 분해능이 있는 곰팡이 147 균주, 세균 164 균주와 한국식품개발연구원 생물공학부에서 분리한 곰팡이 및 세균 151 균주를 포함하여 총 462 균주를 확보하였다. 이들 중 투명환이 큰 12 주를 재 선별하여 inulin 배지로 30°C에서 48시간 배양하여 효소력을 측정한 결과, 0.29~0.41 unit/mL의 역가가 검출되었으며 TLC로 inulin 분해산물을 분석한 결과 0~3개의 polymer가 검출되었다 (Table 1).

96-11 균주의 동정

12 균주 중 inulinase 활성으로 다양한 중합체를 만드는 96-11 균주를 공시균주로 선별하였다. 선별된 균주는 rod-coccus (Fig. 1)로서 그람 양성 간균이고 아포를 생성하지

Table 1. Degradation products of inulin by microorganism from soil

Strain No.	Inulinase activity (U/mL)	Degradation products		
		Polymer 1	Polymer 2	Polymer 3
96-11	0.36	+	+	+
156-1	0.29			+
195-1A	0.38		+	
204-1-130B	0.38			
62-11	0.31			
91-1-2	0.32			
69-14	0.38	+		
198-1-21	0.41	+		
39-2K	0.32			
195-1-1	0.35	+		
161-1-7	0.38			
161-1-1	0.41		+	
69-1-9	0.38	+		+

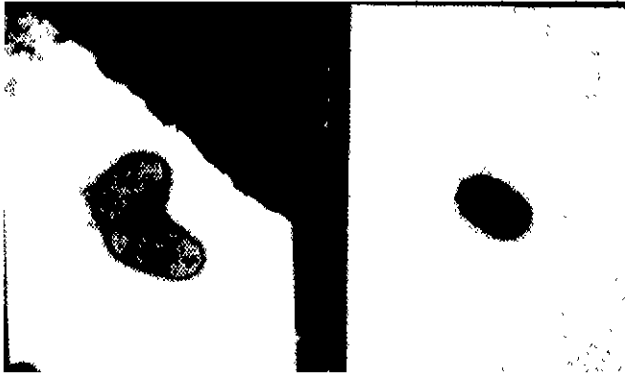


Fig. 1. Transmission electron micrograph of *Arthrobacter protophormiae/ramosus*. (1 mm=95.24 μ m)

않으며 catalase 양성반응을 나타내는 등 *Arthrobacter* 속 세균의 주요특성을 나타내었으며 MIDI software program package (Microbial ID, Inc., Newark, Del.)에 의한 균체 지방산 분석 (Table 2)을 통하여 *Arthrobacter protophormiae/ramosus*로 잠정적으로 동정되었다.

Inulinase의 생산조건

탄소원에 의한 영향. *Arthrobacter protophormiae/ramosus*

Table 2. Fatty acid profile of 96-11 by MIDI

Fatty acid	Composition (%)
Myristate ISO	2.3514
Pentadecanoate ISO	3.5694
Pentadecanoate ANTEISO	75.5433
Palmitate ISO	6.1372
Palmitate	2.8351
Heptadecanoate ANTEISO	9.5636

96-11 균주의 발효에 미치는 탄소원의 영향을 조사하기 위하여 8종의 탄소원을 각각 무기염류 기초배지에 1% (w/v)가 되게 첨가하여 48시간 배양 한 후 얻어진 조효소액의 역가를 측정하였다. 그 결과, Table 3와 같이 inulin을 첨가하였을 때 효소역가가 0.68 unit/mL로 가장 높은 활성이 검출되었으며 sucrose와 xylose를 첨가할 때 각각 0.36, 0.38 unit/mL로서 탄소원의 종류가 inulinase의 생성에 영향을 미치는 것으로 나타났다. Snyder와 Phaff[14]은 *Kluyveromyces fragilis*의 inulinase에 대하여 조사한 결과 inulin과 raffinose를 사용할 때 높은 역가를 나타내었고 fructose, sucrose, sorbitol 등을 탄소원으로 사용하였을 때 효소역가는 낮았다고 한 바 있고, 김[9,10]은 *Penicillium*

Table 3. Effects of various sources on production of inulinase

Source	Component	Cell growth (O.D. at 600 nm)	Inulinase activity (Unit/mL)
Carbon ^{a)} (1%, w/v)	Inulin	1.08	0.68
	Fructose	1.32	0.11
	Souble starch	0.47	0.00
	Xylose	1.08	0.38
	Glucose	0.77	0.19
	Sucrose	1.04	0.36
	Lactose	1.03	0.27
	Dextrose	0.49	0.00
Organic nitrogen ^{b)} (1%, w/v)	Control	0.60	0.10
	Malt extract	1.03	0.00
	Beef extract	14.88	0.15
	Peptone	9.94	0.69
	Casein	9.16	0.46
	Yeast extract	9.58	0.70
	Tryptone	8.88	0.76
Inorganic nitrogen ^{b)} (1%, w/v)	Control	0.06	0.10
	NH ₄ H ₂ PO ₄	9.46	0.39
	Na ₂ HPO ₄	4.42	0.36
	(NH ₄) ₂ C ₂ O ₄ ·H ₂ O	20.36	0.66
	KNO ₃	9.36	0.64
	(NH ₄) ₂ HPO ₄	11.00	0.45
	NH ₄ Cl	8.54	0.66

Cultivation was carried out for 48 hrs at 30°C, 150 rpm using 100 mL of ^{a)} inorganic salt basal medium or ^{b)} 1% inulin/inorganic salt basal medium (w/v).

sp.에 대한 연구에서 부가적으로 당을 첨가할 때 상승효과가 없었다고 하였으며 Grootwassink와 Fleming[7]는 *K. fragilis*의 경우 fructose가 inducer로 작용할 수 있다고 하여 균종에 따라 inulinase의 생산에 미치는 탄수원의 영향이 다르게 나타난다는 것을 알수 있었다.

탄소원 중 최대 역가가 검출된 inulin을 각기 다른 농도(0.5~2.0%)로 배지에 첨가하여 inulinase 생산에 미치는 영향을 조사한 결과, Table 4와 같이 1%의 inulin을 함유한 배지에서 최대 활성이 검출되었다. 이 결과는 김[9]의 *Penicillium* sp.의 inulinase 생산에 관한 연구에서 1%의 농도가 적당하다고 보고와 유사하였다. 한편, 최 등[3]은 돼지감자의 추출물을 3.5%까지 증가시켰을 때 지속적으로 생산량이 증가된다고 보고한 바 있다.

질소원에 의한 영향

1% inulin이 함유된 무기염류 기초배지에 유기질소원 또는 무기질소원을 첨가한 배지에 *Arthrobacter protophormiae/ramosus*를 배양한 후, 효소 역가를 조사한 결과, Table 3에서와 같이 무기질소원 보다 유기질소원의 첨가에 의해 효소활성이 약간 높게 나타났으며 tryptone의 경우, 30°C에서 48시간 배양 시 0.76 unit/mL로서 질소원 중 가장 높은 활성이 검출되었다. Tryptone의 농도를 0.5~2%가 되도록 첨가하여 inulinase 생산에 미치는 영향을 조사한 결과 (Table 4), 1.0% (w/v) 첨가시 0.84 unit/mL로 최대활성이 검출되었다 (data not shown). 무기질소원의 경우는 NH₄Cl 및 (NH₄)₂C₂O₄가 우수한 질소원으로 나타나 각각 0.66 unit/mL의 역가를 보여주었다.

Snyder와 Phaff[14]는 *K. fragilis*의 경우 유기질소원으로서 yeast extract와 casamino acid가 효소생산에 우수한 질소원이라고 하였으며 무기질소원으로는 NH₄H₂PO₄가 우수하다고 하였고 김[9]은 *Penicillium* sp.의 경우 유기질소원 으로서는 peptone이, 무기질소원으로서 NH₄H₂PO₄ 및

(NH₄)₂H₂PO₄이 우수한 영양원임을 보고한 바 있다. 그리고 Yokoda 등[15]은 *Arthrobacter* sp.의 경우 yeast extract가 우수하다고 보고하였다.

배양온도와 pH

Arthrobacter protophormiae/ramosus 균주를 무기염류 기초배지에 각 1%의 inulin과 tryptone, NH₄Cl를 첨가한 inulinase 생산배지에 접종하여 각 온도와 pH에서 48시간 배양하여 inulinase 생산에 미치는 온도 및 pH의 영향을 조사하였다. 20~45°C 범위의 온도에서 균의 성장과 효소활성을 조사한 결과는 Fig. 2와 같다. 균체의 증식은 30°C에서 가장 왕성하였고 최대활성은 35°C 배양액에서 검출되었다. Negoro와 Kito[11,12]는 *Candida kefyr*의 경우 27~30°C가 적온이며 온도가 높아질수록 효소의 생산량이 현저히 감소한다고 보고하여 본 연구결과와는 차이가 있었다. 한편 Grootwassink와 Fleming[7]은 *K. fragilis*의 경우 30~34°C가 적온이며 발효시 34°C에서 30°C로 온도를 바꾸어 주면 효소의 생산량이 증가한다고 하였다. *Penicillium* sp.의 inulinase 생산은 33°C가 최적이라고 보고된 바 있다[9,10].

발효시 배지의 pH는 효소의 분비에 영향을 준다고 한다 [2]. 배지의 초기 pH를 5.5~8.5로 조절하여 Inulinase 생산에 미치는 영향을 검토한 결과, Table 5에서와 같이 pH가 7.5일 때 0.86 unit/mL로 최대였고 비교적 중성영역에서 높은 활성이 검출되었다. 배지의 초기 pH에 의한 활성의 변화는 사용 균주에 따라 다양하게 나타나는데 본 연구결과는 박 등의 *Arthrobacter* sp.의 경우, 초기 pH가 4.5~6.0의 산성영역에서 높은 활성이 검출되었다는 결과[13]와는 큰 차이가 있었다.

통기량과 교반속도가 효소생산에 미치는 영향

Inulinase 생산에 미치는 통기량 및 교반속도의 영향을 조사하기 위하여 발효조(working volume 1 L)를 이용하여 시험하였다. 통기량을 0~2.5 vvw의 범위로 조절하여 배양시

Table 4. Effects of inulin and tryptone concentration on production of inulinase

Sources	Concentration (%)	Cell growth (O.D. at 600 nm)	Inulinase activity (Units/mL)
Inulin ^{a)}	0.5	1.34	0.19
	1.0	1.32	0.68
	1.5	1.27	0.55
	2.0	1.25	0.48
Tryptone ^{b)}	0.5	8.88	0.76
	1.0	9.16	0.84
	1.5	9.01	0.74
	2.0	9.11	0.76

Cultivation was carried out for 48 hrs at 30 150 rpm in 100 mL of ^{a)} inorganic salt basal medium or ^{b)} 1% inulin/inorganic salt basal medium (w/v).

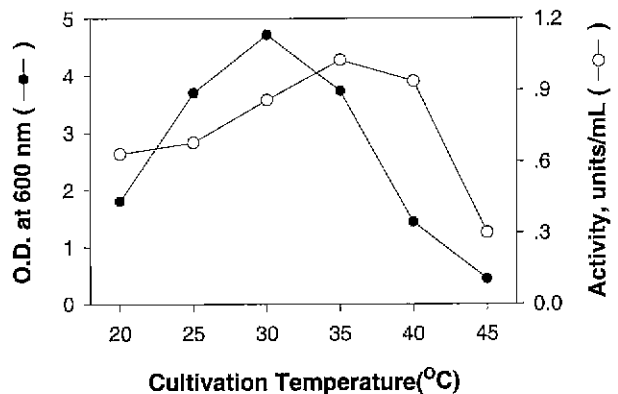
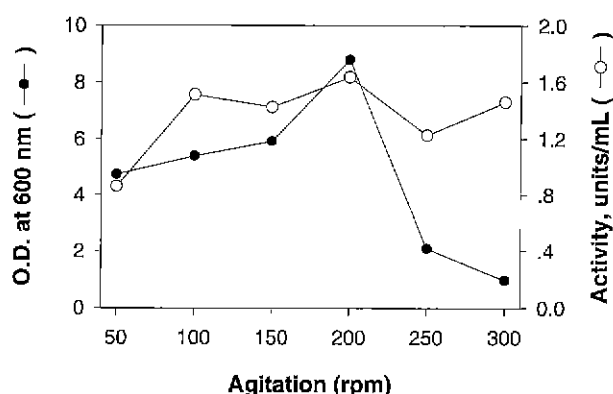


Fig. 2. Effects of cultivation temperature on production of inulinase from *Arthrobacter protophormiae/ramosus*.

Table 5. Effects of initial pH of medium on production of inulinase

Initial pH	Cell growth (O.D. at 600 nm)	Inulinase activity (Units/mL)
5.5	0.08	0.00
6.0	1.18	0.41
6.5	1.68	0.50
7.0	1.58	0.76
7.5	1.71	0.86
8.0	1.55	0.43
8.5	0.15	0.00

Cultivation was carried out for 48 hrs at 30°C, 150 rpm using 100 mL of inorganic salt basal medium contained 1% (w/v) of inulin, tryptone, and NH₄Cl, respectively.

**Fig. 3. Effects of agitation on production of inulinase from *Arthrobacter protophormiae/ramosus*.**

inulinase 활성을 측정된 결과 1 vvm의 통기량에서 최대인 것으로 나타났으며 (data not shown), 교반속도를 0에서 300 rpm까지 변화시켜 inulinase의 생산에 미치는 영향을 조사한 결과 (Fig. 3), 교반속도가 200 rpm일 때 효소활성이 1.64 units/mL로 최대였다.

요 약

국내 부존자원인 inulin을 이용하여 fructose syrup 또는 oligosaccharide를 생산하는 효소를 발굴하기 위하여 전국적으로 토양 등 시료를 채취하여 inulinase 생성 미생물을 분리하였으며 inulinase 활성이 높은 96-1 균주를 동정한 결과 그람 양성균인 *Arthrobacter protophormiae/ramosus*인 것으로 잠정 동정되었다. Inulinase 생산을 위한 최적배지는 무기염류 기초배지에 각 1%(w/v)의 inulin, tryptone, NH₄Cl이 함유된 배지였으며 최적 발효조건은 35°C, 초기 pH 7.5, 통기량 1 vvm, 교반속도 200 rpm이었다.

REFERENCES

- Baumann, P., A. L. Furniss, and J. V. Lee. 1984. *Bergey's Manual of systematic Bacteriology*, pp.140-199. Williams & Wilkins. Baltimore.
- Beluche, I., J. P. Guiraud, and P. Galzy. 1980. Inulinase activity of *Debaryomyces cantarellii*. *Folia Microbiol.* **25**: 32-39.
- Choi, W. S., Y. K. Choi, S. I. Kim, and S. M. Byun. 1984. Production of inulase using *Jerusalem artichoke* tuber extract. *J. Kor. Agr. Chem. Soc.* **27**: 238-244.
- Cho, W. T. and J. Y. Lim. Optimum culture condition for the production of fructosyl transferase by *Aureobasidium pullulans* C-23. 1990. *Kor. J. Appl. Microbiol Biotech.* **18**: 417-422.
- Dubois, M. G., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**: 350-356.
- Function of oligosaccharides. 1994. Symposium Food Science and Industry.
- Grootwassink, J. W. D. and S. Fleming. 1980. Non specific β -fructofranosidase(Inulase) from *Kluyveromyces fragilis*: Batch and continuous fermentation, imple recovery method and some industrial properties. *Enzyme Micro Technol.* **2**: 45-53.
- Jung, K. H., J. W. Yun, K. R. Kang, J. Y. Lim, and J. H. Lee. 1989. Mathematical model for enzymatic production of fructooligosaccharides from sucrose. *Enzyme Microb. Technol.* **11**: 491-504.
- Kim, K. C. A study on the isolation of an mulase producing strain and the optimum culture conditions for the enzyme production. 1975. *J. Kor Agric. Chem. Soc.* **18**: 42-51.
- Kim, K. C. 1975. Studies on the hydrolysis of inulin in *Jerusalem Artichokes* by fungal inulase. *J. Kor. Agric. Chem. Soc.* **18**: 177-182.
- Negoro, H. and E. Kito. 1973. Purification and enzymatic properties of extracellular β -fructofranosidase from *Candida kefir*. *J. Ferment. Technol.* **51**: 103-110.
- Negoro, H. and E. Kito. 1973. β -fructofranosidase from *Candida kefir*. *J. Ferment. Technol.* **51**: 96-102.
- Park, J. B., Y. M. Kwon, and Y. J. Choi. 1995. Production of inulin fructotransferase(depolymerizing) by *Arthrobacter* sp. A-6. *Kor. J. Appl. Microbiol Biotechnol.* **23**: 68-74.
- Snyder, H. E. and H. J. Phaff. 1960. Studies on a β -fructosidase produced by *Saccharomyces fragilis*. *Antonie Van Leeuwenhoek, J. Microbiol Serol* **26**: 433-452.
- Yokoda, A., S. Hiraama, K. Enomoto, Y. Miura, S. Takao, and F. Tomita, 1991. Production of inulin fructotransferase from *Arthrobacter* sp. H65-7 and preparation of DFA III from inulin by the enzyme. *J. Ferment. Bioeng.* **72**: 258-262.

(Received April 12, 2000)