

호알칼리성, 고온성 *Bacillus* sp. TA-11에 의한 β -Fructofuranosidase의 생산

최영준 · 이종수*
배재대학교 유전공학과

Production of β -Fructofuranosidase from Alkalophilic, Thermophilic *Bacillus* sp. TA-11

Young-Jun Choi and Jong-Soo Lee*

Department of Genetic Engineering, Paichai University, Taejon 302-735, Korea

Abstract — The conditions for the β -fructofuranosidase production from alkalophilic, thermophilic *Bacillus* sp. TA-11 were investigated. The maximal enzyme production was obtained when the strain was cultured at 50°C for 36 hrs with batch culture in the optimal medium containing 1.0% sucrose, 0.6% yeast extract, 0.1% each of KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , and initial pH 9.5, and the final enzyme activity under the above condition was 102 units per ml of cell free extract.

β -Fructofuranosidase(β -D-fructofuranoside fructohydrolase, EC 3.2.1.26; invertase)는 sucrose의 β -D-fructofuranoside 결합을 가수분해하여 fructose와 glucose를 생성하고 raffinose를 분해하여 fructose와 melibiose를 생성할 뿐만 아니라 fructotransferase 반응을 촉매하는 기능을 가진 효소로서 특히 sucrose로부터 invert sugar를 생성하므로 식품공업에서 감미료제조에 유용하게 이용되고 있다(1).

β -Fructofuranosidase는 미생물과 고등식물 등에 널리 분포되고 있으며 미생물에서는 주로 *Saccharomyces* 속을 중심으로 이들로부터의 효과적인 추출(2-7)과 정제 및 특성(8-12), 고정화(13, 14) 및 분자생물학적 연구(15-20) 등의 분야로 비교적 활발히 진행되어 왔으며, 따라서 공업적으로도 *Saccharomyces cerevisiae* 등의 세포벽에 약 50% 정도 manno-protein으로 존재하는 이 효소를 추출, 정제하여 생산하고 있다. 그러나 세균에서는 *Streptococcus mutans*(21, 22)와 *Streptococcus salivaris*(23)로부터의 invertase 생산과 효소적 성질에 관한 연구와 *Streptococcus mitis*의 invertase 생합성 조절(24) 등에 관한 보고가 있을 뿐 다른 미생물 source에 비하여 매우 미흡한 실정이다.

한편, 호알칼리성, 고온성 세균은 일반적으로 알칼

리와 열에 대한 내성이 강한 효소를 생산하므로 반응공정중 미생물의 오염을 방지할 수 있고 열 또는 알칼리에 대하여 효소불활성을 줄일 수 있으며 분리정제가 비교적 용이하고 기질의 용해도를 높일 수 있는 잇점 등이 있어 근래에 이들의 산업적 이용에 관한 관심이 고조되고 있다(25).

필자 등은 몇해 전부터 자연계로부터 분리, 동정한 호알칼리성이며 비교적 고온성인 *Bacillus* sp. TA-11(26)을 이용하여 탄수화물 분해 관련 효소에 관한 실험을 실시해 오고 있으며 그 중 β -galactosidase의 생산(27), 생합성(28), 정제 및 특성(29) 등에 관하여 보고하였고 본 연구에서는 알칼리와 열에 대한 내성이 강한 β -fructofuranosidase를 대량 생산할 목적으로 *Bacillus* sp. TA-11을 이용하여 몇가지 배지 조성 및 배양방법 등 효소 생산 최적 조건을 검토하였다.

재료 및 방법

균주

본 실험에 사용한 균주는 필자 등이 토양으로부터 분리, 동정하여 보고한(26) *Bacillus* sp. TA-11으로 생육 최적 pH가 9.5이고 50°C에서도 잘 생육하는 호알칼리성이며 고온성인 균이다.

효소생산조건

효소생산에 미치는 배지조성의 영향으로 먼저 탄

Key words: β -Fructofuranosidase, alkalophilic, thermophilic *Bacillus* sp. TA-11

*Corresponding author

소원은 기본배지(0.6% yeast extract, 0.15% K_2HPO_4)의 sucrose 농도를 0.1%에서 3.0%까지 일정 농도로 조정하여 50°C에서 2일간 진탕배양한 후 아래와 같은 방법으로 β -fructofuranosidase 활성을 측정하여 조사하였고 질소원으로 유기질소원은 0.6%, 무기질소원은 0.1~0.2% 씩 단독 혹은 혼용하여 검토하였으며 무기이온은 0.15% 씩 첨가하여 검토하였다. 또한 배지의 초기 pH 및 온도의 영향 등은 전보(27)에서와 같이 실시하였고 효소생산에 미치는 배양방법으로 플라스크 배양은 효소생산 최적조건(1.0% sucrose, 0.6% yeast extract, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NaH_2PO_4 각 0.1%, pH 9.5, 50°C)에서 150 rpm으로 진탕배양 하였으며 회분배양은 7l 발효조(한국 발효기, KFM-7)에 효소생산 배지 2l를 넣어 살균한 후 총 배양액 50 ml를 접종하여 50°C에서 배지의 pH를 1 M Na_2CO_3 로 9.5로 조정하고 조정하지 않은 것으로 구분하여 배양하였으며, 이때 공기 유입속도는 1 vvm으로, 교반속도는 90 rpm으로 유지시켰다. 또한 회분 배양에서 배지중의 sucrose가 대부분 소비된 배양 48시간 후, 1% sucrose를 주입하여 배양하면서 균 생육과 효소 생산의 변화를 조사하였다.

효소활성측정

β -Fructofuranosidase 활성은 sucrose를 기질로 하여 다음과 같이 측정하였다. 배양액 100 ml를 10000×g에서 10분간 원심분리하여 균체를 회수하고 인산완충용액(pH 7.0)으로 2회 세척한 다음 10 ml의 동일 완충액에 현탁시키고 초음파 균체 파쇄기로 균체를 파쇄시킨 다음 25000×g에서 10분간 원심분리하여 얻은 상청액을 효소액으로 하였다.

인산완충용액에 녹인 100 mM sucrose 1 ml에 위의 효소액 1 ml를 가하여 40°C에서 60분간 반응시킨 다음 생성된 환원당 함량을 DNS 법(30)으로 측정하였고 효소활성의 1단위는 주어진 반응조건에서 1분간에 1 μ mol의 sucrose를 가수분해시킬 수 있는 효소의 양으로 정의하였다.

균체농도측정

균체농도는 배양액 일정량을 취하여 10000×g에서 10분간 원심분리하여 균체를 회수한 후 멸균수로 세척하고 105°C에서 10시간 정도 건조시킨 다음 무게를 측정하여 건조 균체량으로 하였다.

결과 및 고찰

배지조성의 영향

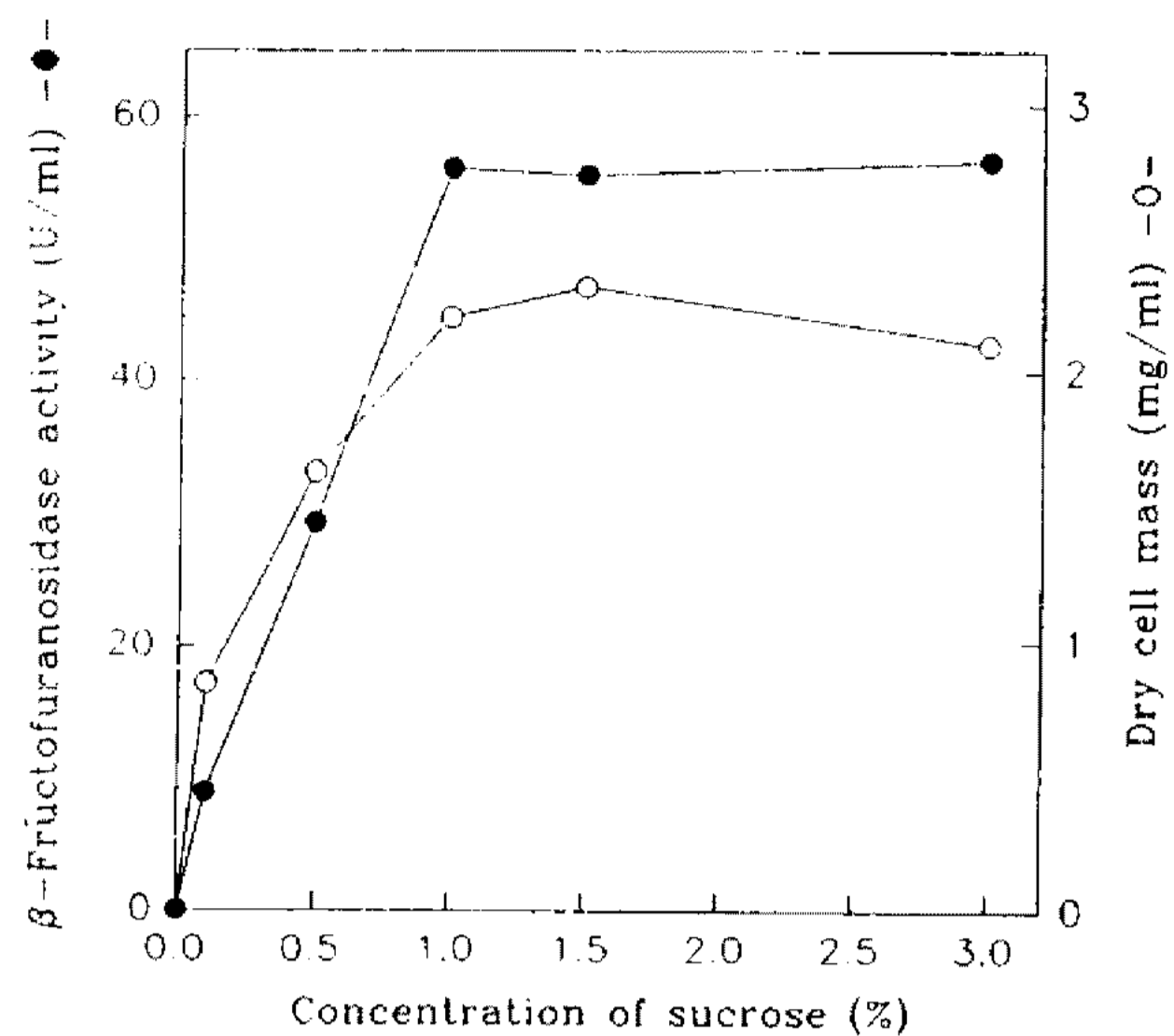


Fig. 1. Effect of the concentration of sucrose on β -fructofuranosidase production.

Culture was carried out in 500 ml flask (shake) at 50°C for 24 hours in the basal medium.

효소생산에 미치는 sucrose의 영향을 조사한 결과 (Fig. 1) 1.0%까지는 효소생산이 증가하여 56 U/ml가 생성되었고 비활성도 약 21.9 U/mg cell로 제일 좋았으나 그 이상의 농도에서는 변화가 없었다. 또한 무첨가시 거의 효소가 생산되지 않는 점과 예비실험에서 glucose 배지에 생육시킨 균을 sucrose 함유배지로 옮겨 배양하였을 때 비활성이 증가되는 점 등으로 보아 본 효소는 sucrose에 의해 유도됨을 알 수 있었고 *Saccharomyces* 속의 효모(18)와 *Streptococcus mitis*(24)에서처럼 본 효소의 생합성이 glucose 등의 hexose 첨가에 의해 어떻게 조절되는지 등을 밝히기 위한 연구가 진행 중이다.

기본배지의 sucrose를 1.0%로 하여 각종 질소원이 효소생산에 미치는 영향을 조사한 결과 무기질소원의 대부분을 시험균주가 이용하지 못하였고 yeast extract 첨가시 균생육(건조 균체량)은 1.78 mg/ml, 효소생산은 54.4 U/ml로 제일 좋았으며 yeast extract에 tryptone을 0.5~3.0%로 각각 혼용하였을 경우도 단독 사용시보다 오히려 효소생산량이 낮았다(Table 1). 한편, yeast extract의 효소생산 최적농도는 0.6%로서 이때 효소는 54.6 U/ml가 생산되었고 비활성은 약 21.8 U/mg cell을 보였다(Fig. 2).

각종 금속이온과 인산염의 첨가가 효소생산에 미치는 영향을 조사한 결과 Table 2에서와 같이 K_2HPO_4 , KH_2PO_4 및 NaH_2PO_4 를 각각 0.1% 씩 첨가하였을 때 약 62 U/ml의 효소가 생산되었고 Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} 및 Mn^{2+} 등은 균생육과 효소생산을 심하게 저해하였으며 기타의 금속이온들은 효소생산에

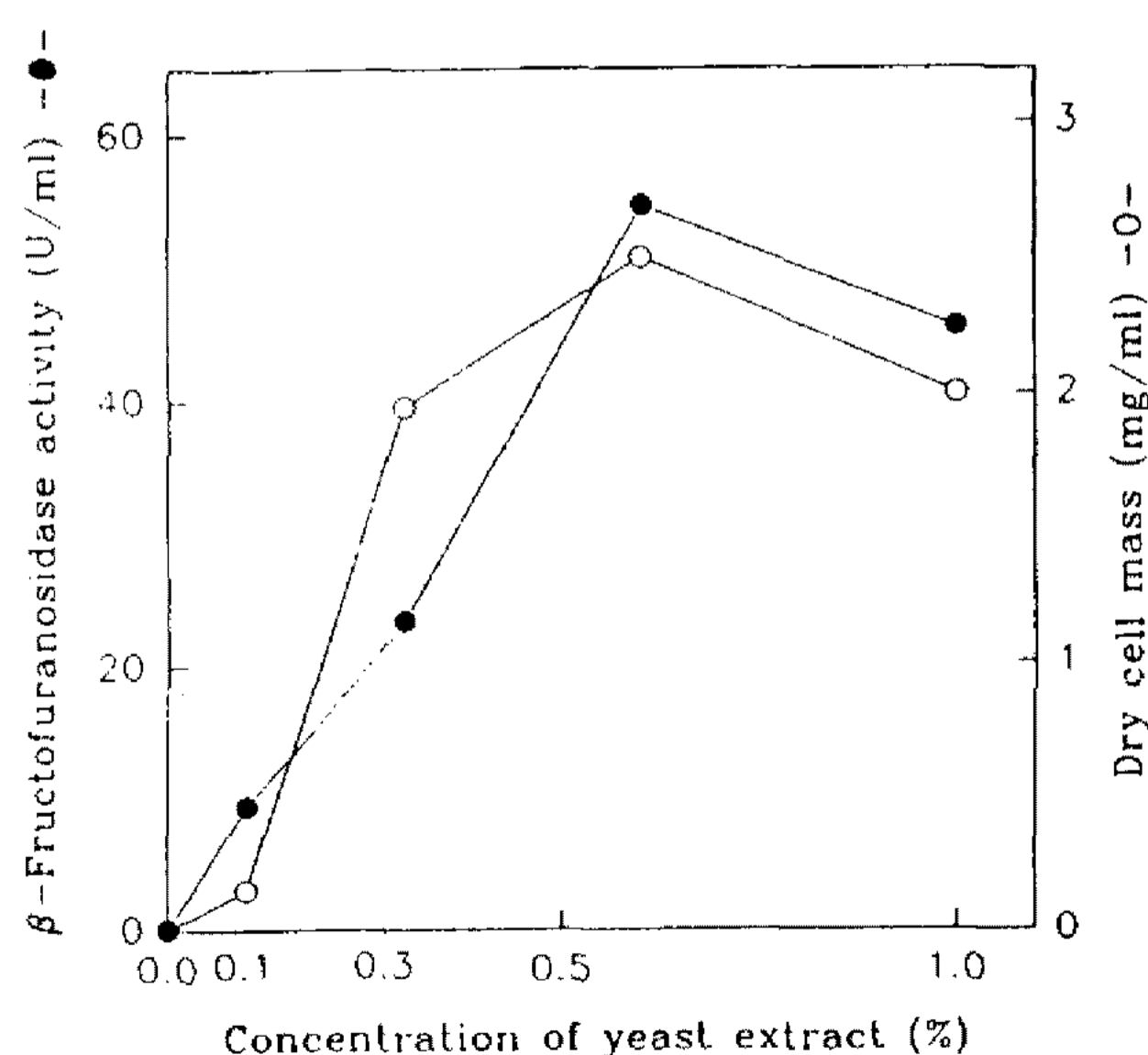
Table 1. Effect of nitrogen source on production of β -fructofuranosidase from *Bacillus* sp. TA-11

Nitrogen source (%)	Dry cell mass ^a (mg/ml)	β -Fructofuranosidase activity (U/ml)
Tryptone (0.6)	0.90	15.6
Peptone (0.6)	0.75	25.0
Yeast extract (0.6)	1.78	54.4
Beef extract (0.6)	0.92	36.1
Casamino acid (0.6)	— ^b	— ^c
Corn steep liquor (0.6)	1.46	11.7
Urea (0.6)	—	—
NH ₄ Cl (0.1)	—	—
Ammonium sulfate (0.1)	—	—
Ammonium acetate (0.1)	—	—
Ammonium citrate (0.1)	—	—
Ammonium oxalate (0.1)	—	—
NH ₄ NO ₃ (0.1)	0.57	5.6
NH ₄ HCO ₃ (0.1)	—	—
NaNO ₃ (0.2)	—	—
KNO ₃ (0.2)	—	—
Yeast extract (0.6)		
+ Tryptone (0.5)	1.07	42.8
(1.0)	1.07	36.1
(1.5)	1.35	37.2
(2.0)	1.65	36.7

^aDry cell mass was determined as described in Materials and Methods after cultivation in flask (shake) at 50°C for 24 hours in the basal medium.

^b(—): No growth

^c(—): Not determined

**Fig. 2. Effect of the concentration of yeast extract on β -fructofuranosidase production.**

Culture was carried out in 500 ml flask (shake) at 50°C for 24 hours in the basal medium.

Table 2. Effect of inorganic salt on production of β -fructofuranosidase from *Bacillus* sp. TA-11

Inorganic salt ^a	Dry cell mass ^a (mg/ml)	β -Fructofuranosidase activity (U/ml)
CaCl ₂	1.04	30.7
MgCl ₂	1.65	17.8
NaH ₂ PO ₄	2.50	40.1
Na ₂ HPO ₄	2.35	31.6
K ₂ HPO ₄	1.05	37.0
KH ₂ PO ₄	1.98	49.4
MgSO ₄	— ^c	— ^d
CaSO ₄	—	—
CuSO ₄	—	—
FeSO ₄	0.90	6.1
MnSO ₄	0.02	3.8
K ₂ HPO ₄ + KH ₂ PO ₄	2.30	43.3
K ₂ HPO ₄ + NaH ₂ PO ₄	2.00	41.8
KH ₂ PO ₄ + NaH ₂ PO ₄	2.30	44.4
K ₂ HPO ₄ + NaH ₂ PO ₄ + KH ₂ PO ₄	2.52	62.2

^aConcentration of inorganic salts were 0.15%, except for the mixture which contained 0.1% each.

^bDry cell mass and ^{c,d}(—) refer to Table 1.

영향을 주지 않았다.

배지의 초기 pH와 온도

배지의 초기 pH가 β -fructofuranosidase 생산에 미치는 영향을 조사한 결과(Fig. 3), pH 9.0~9.5에서 약 66 U/ml의 효소가 생산되어 제일 좋았고 pH 10.0에서도 효소생산최적 pH의 약 80%의 효소가 생산되어 일반적인 미생물의 효소생산범위(2, 3)와 *Saccharomyces rouxii*의 pH 5.5보다 매우 알칼리측이었으며 pH 7.0 이하에서는 거의 생육하지 못하였고 효소 또한 생산되지 않았다. 따라서 시험균주가 생산하는 β -fructofuranosidase는 전보(29)의 β -galactosidase와 같이 알칼리에 매우 안정하리라 생각되고 따라서 공업적으로 매우 유용하게 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

한편 시험균주를 37°C, 45°C 및 50°C에서 배양하여 균의 생육과 효소생산을 조사한 결과 각 온도별 건조균체량은 각각 2.85 mg/ml, 2.70 mg/ml, 2.50 mg/ml 이었고 효소생산량은 76 U/ml, 71 U/ml, 74 U/ml로 모두 비슷하였으나 *Saccharomyces rouxii*의 25~30°C 보다는(7) 높은 온도였다. 따라서 내열성 효소를 생산하기 위해서는 50°C에서 배양하는 것이 좋을 것으로 생각된다(data not shown).

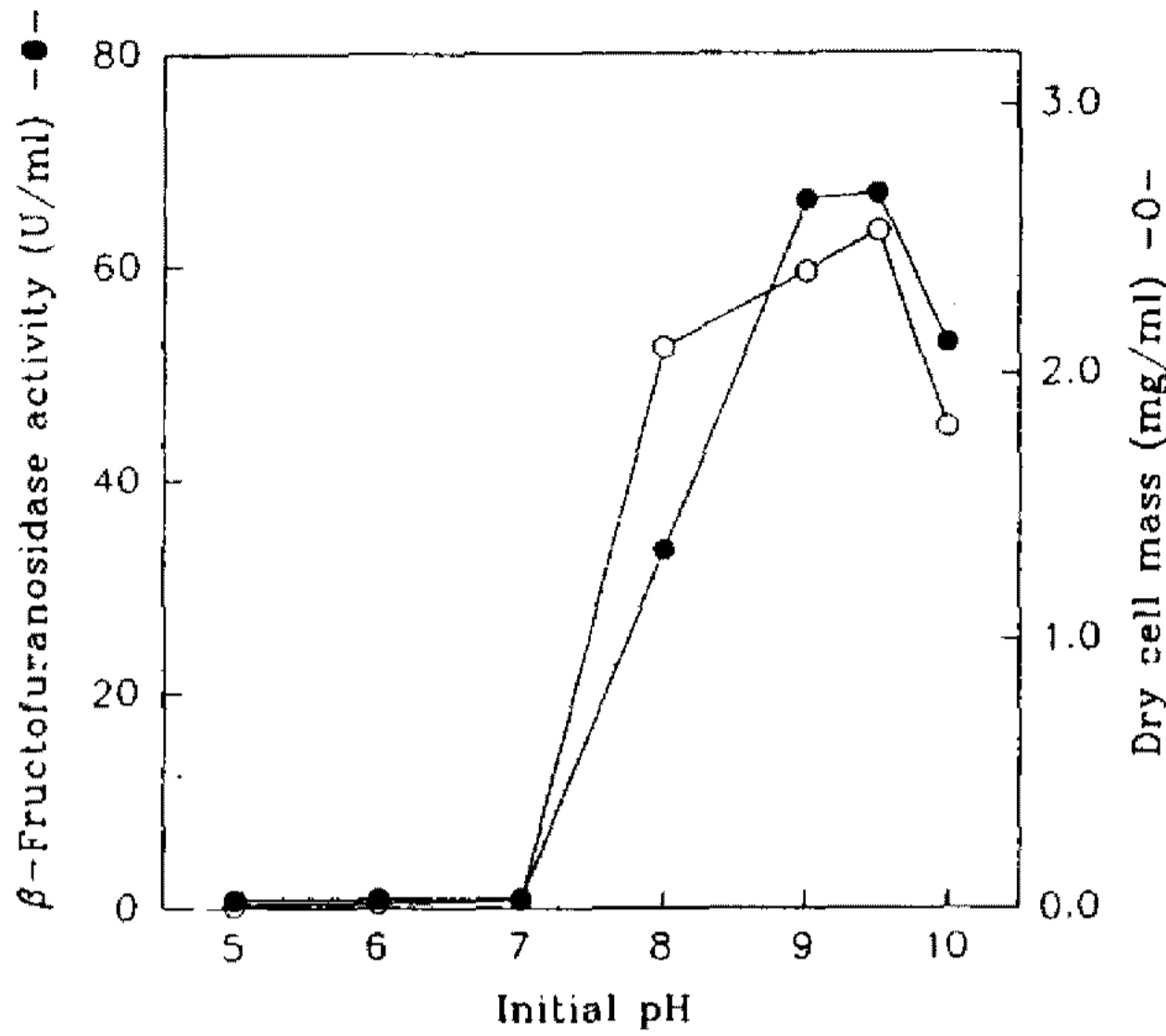


Fig. 3. Effect of initial pH of medium on β -fructofuranosidase production.

Culture was carried out in 500 ml flask (shake) at 50°C for 24 hours in the basal medium.

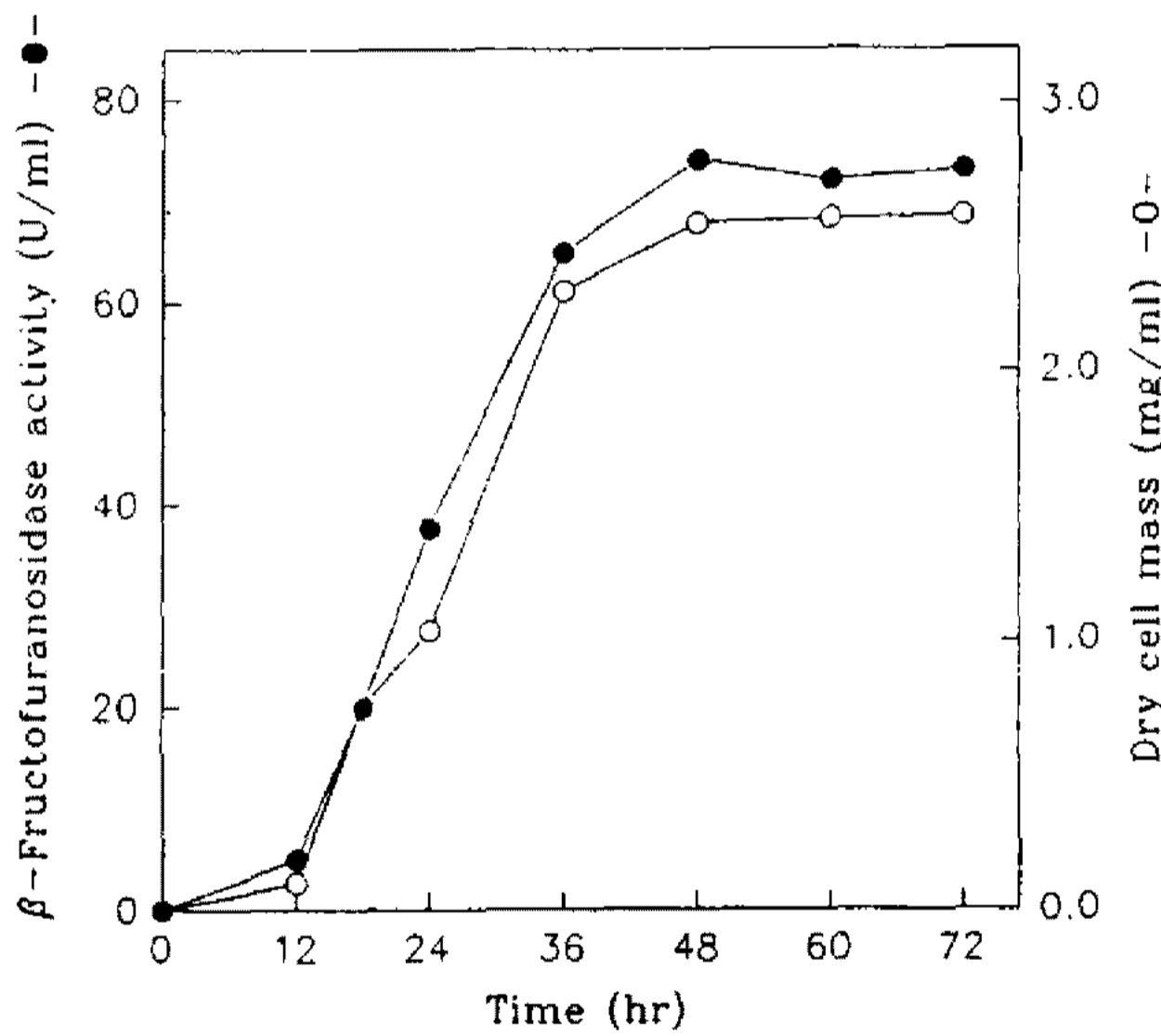


Fig. 4. Profiles of cell growth and β -fructofuranosidase activity during flask culture.

Culture was carried out in the enzyme production medium containing 1.0% sucrose, 0.6% yeast extract, 0.1% K_2HPO_4 and KH_2PO_4 at 50°C.

배양방법의 영향

플라스크 배양 위의 효소생산 최적조건(1.0% sucrose, 0.6% yeast extract, 0.1% K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NaH_2PO_4 , 초기 pH 9.5, 50°C)으로 시험균을 플라스크 배양하면서 경시적으로 균의 생육과 β -fructofuranosidase 생산량을 조사한 결과(Fig. 4), 배양 18시간 이후부터 48시간까지 균의 생육이 왕성하다가 그 이후에는 거의 정지되었고 비증식속도(μ)는 대수기인

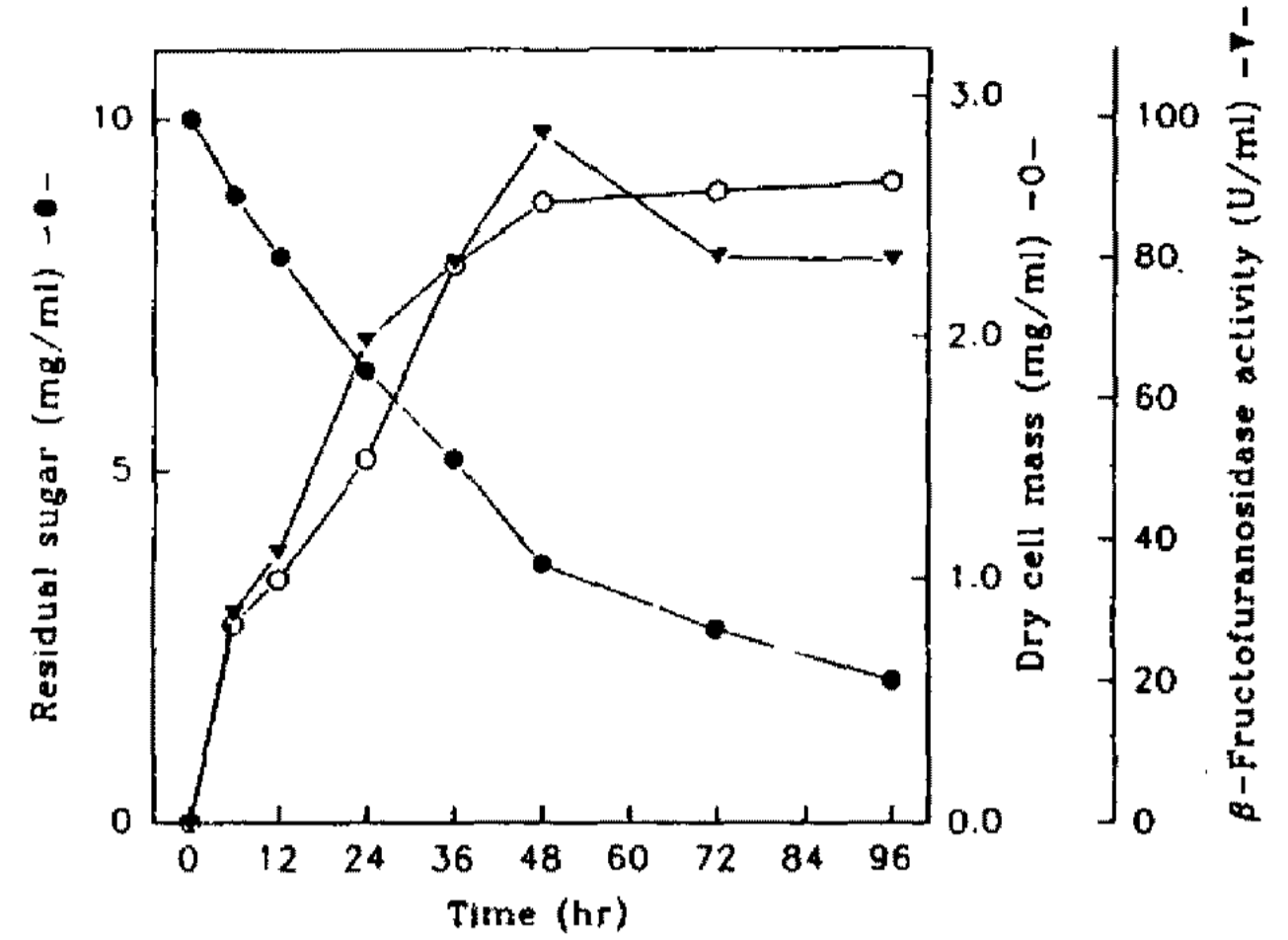


Fig. 5. Profiles of cell growth, residual sugar and β -fructofuranosidase activity during batch culture in 7 l fermentor with pH control.

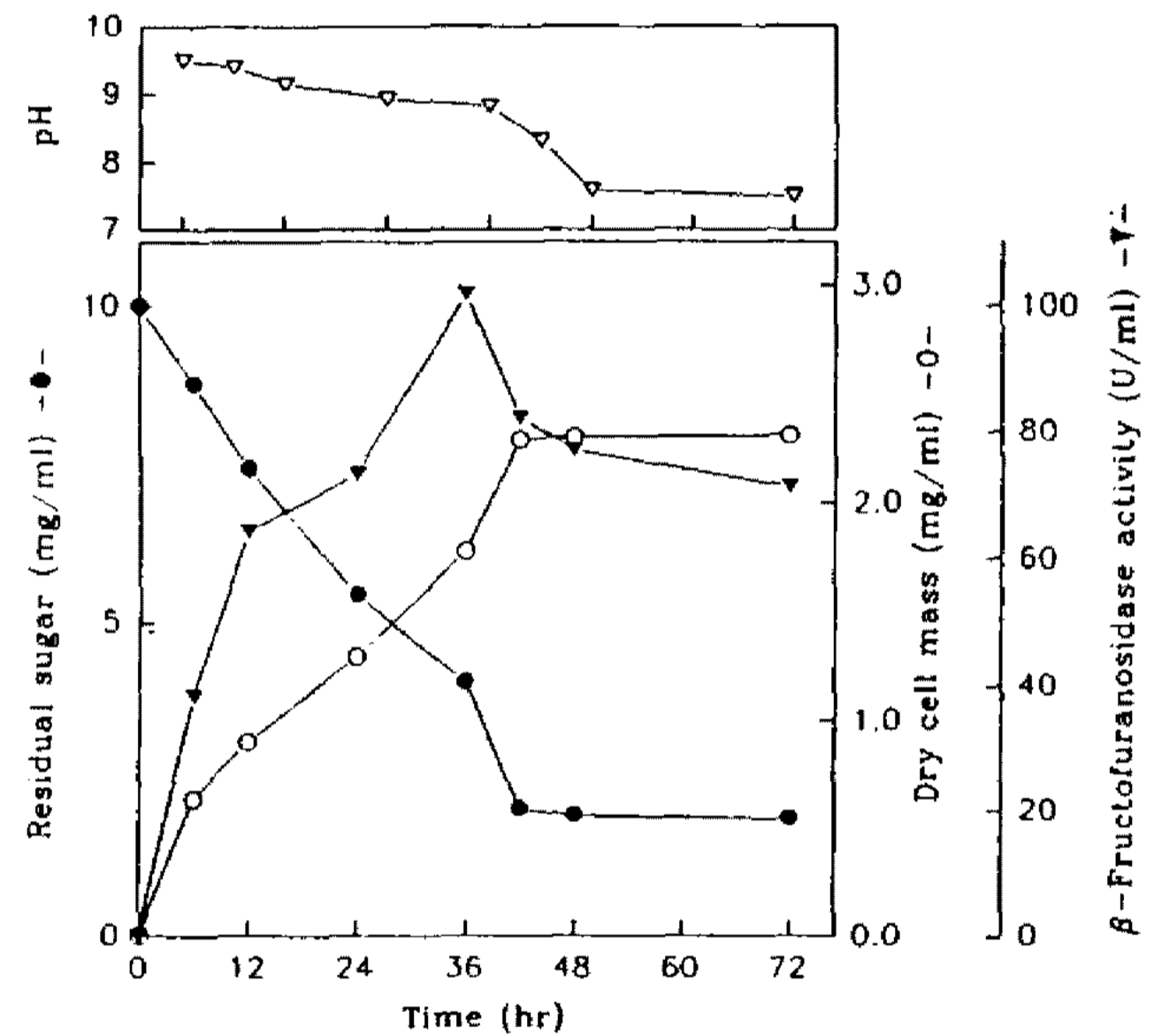


Fig. 6. Profiles of cell growth, residual sugar and β -fructofuranosidase activity during batch culture in 7 l fermentor without pH control.

배양 24시간부터 36시간까지 $0.18 \sim 0.23 h^{-1}$ 을 보였으며 효소생산량은 배양 48시간에 약 74 U/ml로 가장 높았다. 이는 발효조를 이용한 회분배양과 유가배양에서의 효소생산량보다 약 25 U/ml 정도 낮은 결과이었다.

회분배양 발효조를 이용하여 배지의 pH를 9.5로 조정하면서 회분배양 하였을 때 위의 플라스크 배양보다 초기 균 생육이 활발했지만 배양 48시간 후의 균 생육이 2.6 mg/ml로 비슷하였고 효소생산량은 98 U/ml로 이들보다 약 1.3배 증가하였다(Fig. 5).

한편 배양중 배지의 pH를 조정하지 않았을 경우의 균 생육과 효소생산의 변화를 조사한 결과는 Fig. 6과

같다. 균생육은 배양 42시간에 2.1 mg/l, 효소생산은 배양 36시간에 약 102 U/ml로 최고에 달하였고 이때의 잔당은 약 0.4%이었으며 비증식속도는 0.11 h^{-1} 이었다. 이들을 앞서의 두 방법과 비교하여 볼 때 발효조를 이용한 회분배양간의 효소 생산량은 비슷하였으나 최고활성에 이르는 배양시간이 다소 빨랐고 플라스크배양 보다는 약 30 U/ml의 효소가 더 생산되었다. 한편 배양중 pH의 변화는 초기 pH 9.5에서 배양 48시간에 약 7.5 부근까지 낮아졌는데 이러한 pH의 저하도 배양 36시간 이후에 효소생산이 낮아지는 한 요인인 것으로 생각된다. 이상의 회분배양 실험결과를 비교하여 볼 때 전보의 β -galactosidase 생산 실험에서와 같이 배양중 배지의 pH를 9.5로 조정하는 것에 비하여 pH를 조정하지 않은 회분배양 방법이 효소생산성 측면에서 더 좋은 방법으로 사료되었다.

한편, 회분배양에서 배지중의 sucrose가 거의 대부분 소모되었을 때(배양 48시간 후) pH 조정없이 1% sucrose를 1차 주입하면서 배양중의 균생육과 효소생산의 변화를 조사한 결과 새로운 기질을 공급함으로 균의 생육은 변화가 없었고 효소생산량은 오히려 약간 낮아지는 경향을 보였다(data not shown). 따라서 시험균주를 이용하여 β -fructofuranosidase를 생산하고자 할 때는 발효조를 이용하여 배양 36시간 이후 pH를 8.0 이하로 낮아지지 않도록 조절하면서 회분배양하는 것이 좋을 것으로 생각된다.

요 약

호알칼리성이며 고온성인 *Bacillus* sp. TA-11을 이용하여 알칼리와 열에 대한 내성이 강한 β -fructofuranosidase을 대량 생산할 목적으로 배지조성과 배양 방법 등의 효소생산 최적조건을 검토하였다. β -fructofuranosidase의 최적생산 조건은 1.0% sucrose, 0.6% yeast extract, 0.1% K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NaH_2PO_4 , 초기 pH 9.5, 배양온도 50°C 이었고 플라스크 배양에서는 48시간에 74.0 units/l, 7리터 발효조를 이용한 회분배양에서는 36시간에 102 units/ml의 효소가 생산되었으며 유가배양은 균생육과 효소생산에 영향을 주지 않았다.

참고문헌

1. Myrbäck, K. 1960. Invertase, Pp. 379-396. In P.D. Boyer, H. Lardy, and K. Myrbäck (ed.) The enzyme, Vol. 4. Academic Press Inc., New York.

2. Wickerham, L.J. 1958. Evidence of the production of extracellular invertase by certain stains of yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* **76**: 439-448.
3. Dodyk, F. and A. Rothstein. 1964. Factors influencing the appearance of invertase in *Sacch. cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* **104**: 478-486.
4. Kidby, D.K. and R. Davies. 1970. Thiol induced release of invertase from cell walls of *Sacch. fragilis*. *Biochem. Biophys. Acta.* **201**: 261-266.
5. Arnol, W.N. 1972. Location of acid phosphatase acid β -fructofuranosidase within yeast cell envelopes. *J. Bacteriol.* **112**: 1346-1352.
6. Arnold, W.N. 1972. The structure of the yeast cell wall. Solubilization of a marker enzyme, β -fructofuranosidase by the autolytic enzyme system. *J. Biol. Chem.* **247**: 1161-1169.
7. Arnold, W.N. 1974. Expression of cryptic β -fructofuranosidase in *Sacch. rouxii*. *J. Bacteriol.* **120**: 887-894.
8. Neumann, N.P. and J.O. Lampen. 1967. Purification and properties of yeast invertase. *Biochemistry.* **6**(2): 468-475.
9. Gascon, S. and J.O. Lampen. 1968. Purification of internal invertase of yeast. *J. Biol. Chem.* **243**: 1567-1572.
10. Arnold, W.N. 1969. Heat inactivation kinetics of yeast β -fructofuranosidase. *Biochem. Biophys. Acta.* **178**: 347-353.
11. Trimble, R.B. and F. Maley. 1977. Subunit structure of external invertase from *Sacch. cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **252**: 4409-4412.
12. Babczinski, P. 1980. Partial purification, characterization and localization of the membrane-associated invertase of yeast. *Biochem. Biophys. Acta.* **614**: 121-133.
13. Onyezili, F.N. and A.C. Onitiri. 1981. Immobilization of invertase on modified nylon tubes. *Anal. Biochem.* **113**: 203-206.
14. Dautzenberg, H., Kötz, J., Philipp, B., Schellenberger, A. and J. Mausfeld. 1991. Interaction of invertase with polyelectrolytes. *Biotech. Bioeng.* **38**: 1012-1019.
15. Metzberg, R.L. 1962. A gene affecting the repression of invertase and trehalase in *Neurospora*. *Arch. Biochem. Biophys.* **96**: 468-474.
16. Ottolenghi, P. 1971. A comparison of five genetically distinct invertase from *Saccharomyces*. *Eur. J. Biochem.* **18**: 544-552.
17. Kuo, S.C. and J.O. Lampen. 1971. Osmotic regulation of invertase formation and secretion by protoplast of *Sacch.* *J. Bacteriol.* **106**: 183-191.
18. Montenecourt, B.S., Kuo, S.C. and J.O. Lampen. 1973. *Sacch.* mutants with invertase formation resistant to repression by hexoses. *J. Bacteriol.* **114**: 233-238.

19. Hackel, R.A. 1975. Genetic control of invertase formation in *Sacch. cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **140**: 361-370.
20. Moreno, F.A., Ochoa, A.G. and J.R. Villanueva. 1975. Molecular forms of yeast invertase. *Eur. J. Biochem.* **50**: 571-579.
21. Carlsson, J. 1970. A levansucrase from *Streptococcus mutans*. *Caries Res.* **4**: 97-113.
22. Kuramitsu, H.K. 1973. Characterization of invertase activity from cariogenic *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* **115**: 1003-1010.
23. Chassy, B.M., Bielawsky, R.M., Beall, J.R., Porter, E.V. and Donkersloot, J.A. 1974. Extracellular invertase in *Streptococcus mutans* and *Streptococcus salivaris*. *Life Science.* **15**: 1173-1180.
24. Sund, M.L. and L. Linder. 1980. Regulation of synthesis of β -fructofuranosidase (invertase) in *Streptococcus mitis*. *J. General Microbiol.* **118**: 85-94.
25. 김중배. 1994. 극한 조건하의 효소와 그 응용. 생물공학 뉴스 **1**: 38-43.
26. 이종수, 박인영, 금종화. 1992. 호알칼리성, 고온성 *Bacillus* sp. TA-11의 분리와 β -galactosidase의 생산. 배재대 자연과학논문집 **5**: 47-52.
27. 최영준, 이종수. 1994. 호알칼리성, 고온성 *Bacillus* sp. TA-11에 의한 β -galactosidase의 생산. 한국 생물공학회지 **9**: 348-352.
28. 이향숙, 이종수. 1992. Regulation of β -galactosidase biosynthesis in alkalophilic, thermophilic *Bacillus* sp. TA-11. *J. Natural Sci. Paichai Univ.* **5**: 13-17.
29. Choi, Y.J., Kim, I.H., Lee, B.H. and J.S. Lee. 1994. Purification and characterization of β -galactosidase from alkalophilic, thermophilic *Bacillus* sp. TA-11. *Biotech and Appl. Biochem. J.* (submitted).
30. Miller, G.L. 1959. Uses of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.

(Received 25 November 1994)