

# 토양에서 분리한 *Bacillus flexus*로부터 Invertase의 생산

오탈석 · 윤 희 · 심예지 · 김진우 · 최민지 · 윤종원\*

대구대학교 공과대학 생명공학과

## Production of Invertase from Newly Isolated Strain *Bacillus flexus*

Tae Seok Oh, Hee Yun, Ye Ji Sim, Jin Woo Kim, Min Ji Choi, and Jong Won Yun\*

Department of Biotechnology, Daegu University, Kyungsan, Kyungbuk 712-714, Korea

**Abstract** In the present study, we isolated a new bacterial strain producing invertase (EC 3.2.1.26) and determined optimized culture condition in flask culture. The strain was identified as *Bacillus flexus* determined by the 16S rDNA sequencing method. The invertase was produced only in the sucrose medium as the sole carbon source. Potassium nitrate was an adequate nitrogen source for enzyme production, whereas meat peptone showed the highest bacterial growth. Enzyme production was increased about 2-fold when  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  was supplemented to the growth media. The optimum temperature was found to be 30°C for both enzyme production and bacterial growth. Invertase exhibited pH optima in the range 5.0-6.0 and have a temperature optimum at 40°C, similarly to other invertases found from different microbial sources. Several mineral ions (K and Fe) stimulated the invertase activity, whereas some bioelements (Ag, Mg, and Mn) inhibited enzyme activity. Under the optimized culture condition, the maximum enzyme production (over 250 units/mL) was achieved at 20 h. To the best of our knowledge, this is the first time to report on invertase production by *Bacillus flexus*.

**Keywords:** *Bacillus flexus*, invertase, invert sugar, medium optimization

### 서 론

Invertase (EC 3.2.1.26)는 sucrose의  $\beta$ -D-fructofuranoside 결합을 가수분해하여 glucose와 fructose의 혼합당류인 invert sugar를 생산하는 효소이다. Invert sugar는 sucrose에 비해 감미도가 높고 비결정성이기 때문에 식품공업이나 제과공업에서 널리 사용되고 있다 [1-3]. Invertase는 미생물과 고등 식물 등의 다양한 기원으로부터 생산되는데, 미생물에서는 주로 효모인 *Saccharomyces* 속을 중심으로 *Rhizopus oryzae*, *Amylomyces rouxii*, *Zymomonas mobilis*, *Aspergillus niger*, *Rhodotorula glutinis*, 등으로부터 생산되는 것이 알려져 있으며 [4-8], 효소생산 최적화 [9,10], 효소정제 및 특성규명 [11,12], 고정화 [13-16], 및 효소의 분자 생물학적 연구 등 [17]의 분야에서 비교적 연구가 활발히 진행되어 왔다.

*Bacillus flexus*는 연쇄상간균으로 의료분야와 포장

분야에서 이용되는 생분해 가능한 내열성 플라스틱인 polyhydroxyalkanoate (PHA)의 생산 [18], 또는 알칼리성 amylase 생산 [19] 등에 이용되는 미생물이다.

본 연구에서는 국내 여러 지역의 토양 시료로부터 invertase 생산 미생물을 스크리닝한 결과, invertase를 비교적 고 농도로 생산하는 *Bacillus flexus* 균주를 분리하여 이를 동정하였고, invertase 생산조건을 플라스크 배양을 통해 최적화하였다.

### 재료 및 방법

#### 시약 및 기기

실험에서 사용된 모든 시약은 특별한 언급이 없는 한 특급 시약을 사용하였고, glucose 정량은 glucose oxidase kit (Asan Pharm. Co., Ltd., Korea)를 사용하였다. 효소활성 측정을 위한 흡광도 측정은 분광광도계 (Genesys™5, Spectronic® instruments, USA)를 사용하였으며, 탄수화물 정량은 HPLC

#### \*Corresponding author

Tel: +82-53-850-6556, Fax: +82-53-850-6559

e-mail: jwyun@daegu.ac.kr

(Shimadzu Co., Japan)를 이용하여 다음과 같은 조건에서 분석하였다. 컬럼은 Aminex HPX-42C (0.78 × 30 cm, Biorad), detector는 RI (refractive index)를 사용하였다. 컬럼은 85°C로 유지했고 초순수를 mobile phase로 사용하였으며 운전유속은 0.6 mL/min 이었다.

### Invertase 생산균주의 분리 및 동정

경상북도 진랑읍 내리리 인근의 유채꽃밭에서 채취한 토양을 멸균수로 희석하고 sucrose 고체배지 (sucrose 1%, bacto-tryptone 1%, NaCl 1%, potassium nitrate 0.5%, agar 1.5%, pH 7)에 도말 하여 37°C에서 48시간 배양하였다. 형성된 colony를 streaking 하여 동일한 조건에서 배양한 후 단일 colony를 sucrose 액체배지에 접종하여 37°C에서 48시간 진탕 배양 (120 rpm)한 다음, invertase 활성이 나타나는 균주를 16S rDNA sequencing (Korean Culture Center of Microorganisms) 방법으로 동정하였다.

### 배양 및 조효소액 조제

분리한 균주를 sucrose가 유일한 탄소원인 배지에 접종하여 30°C에서 24시간 동안 진탕 배양 (120 rpm)한 후 15,000 × g로 5분간 원심분리 하여 상등액을 취해 조효소액 (crude enzyme solution)으로 사용하였다.

### Invertase 활성 측정

Sucrose배지에 1%의 종균을 접종하여 30°C에서 진탕 배양 (120 rpm)하면서 2시간 간격으로 660 nm에서 배지의 흡광도를 측정하여 미생물의 증식정도를 확인하였고, 미생물을 제거한 상등액을 조효소액 (crude enzyme solution)으로 사용하여 효소활성을 측정하여 효소생산량을 측정하였다. 효소활성은 sucrose가 가수분해되어 생성되는 glucose의 양을 glucose oxidase kit를 사용하여 정량하였다. 효소 반응은 sucrose용액 1% (w/v) 1 mL에 조효소액 1 mL를 첨가한 후 37°C에서 30분간 반응시켰다. 이때 각각의 glucose 초기값을 먼저 측정하고, 30분 반응 후의 얻은 값과의 차이 값을 결과로 사용하였다. 효소활성 1 unit는 상기 조건에서 1분에 1 μmole의 glucose를 생성하는데 필요한 효소량으로 정의하였다.

### 최적 반응온도 및 pH 결정실험

최적 반응온도를 조사하기 위해서 20°C~70°C 범위에서 효소활성을 측정하였으며, 1% (w/v) sucrose용액 1 mL 및 조효소 용액 1 mL를 30분간 각 온도에서 기질과 함께 반응시킨 후 (pH 7), 끓는 물에서 10분간 처리하여 효소 반응을 중지시켰다. 이후 상대적인 효소활성을 측정하여 최적 온도를 결정하였다. 한편 최적 반응 pH는 위의 조건과

동일하게 pH 3.0~6.0 범위에서는 0.1 M citrate buffer를, pH 6.0~8.0 범위에서는 0.1 M potassium phosphate buffer를 사용하여 상대적인 효소활성을 측정하여 최적 pH를 결정하였다.

### 금속이온의 영향실험

반응온도 40°C, pH 5.5의 조건에서, Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, AgNO<sub>3</sub>, KI, KCl, MgSO<sub>4</sub>, MnCl<sub>2</sub>, FeSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>의 등의 여러 가지 금속이온을 각각 2 mM의 농도가 되게 첨가하여 invertase 활성을 상대 비교하였다.

### 결과 및 고찰

#### 미생물 동정

토양으로부터 분리한 invertase 생성균주를 KCCM (Korean Culture Center of Microorganisms)에 의뢰하여 동정한 결과, *Bacillus flexus*로 동정되었다 (Fig. 1, 기탁번호 AB021185).

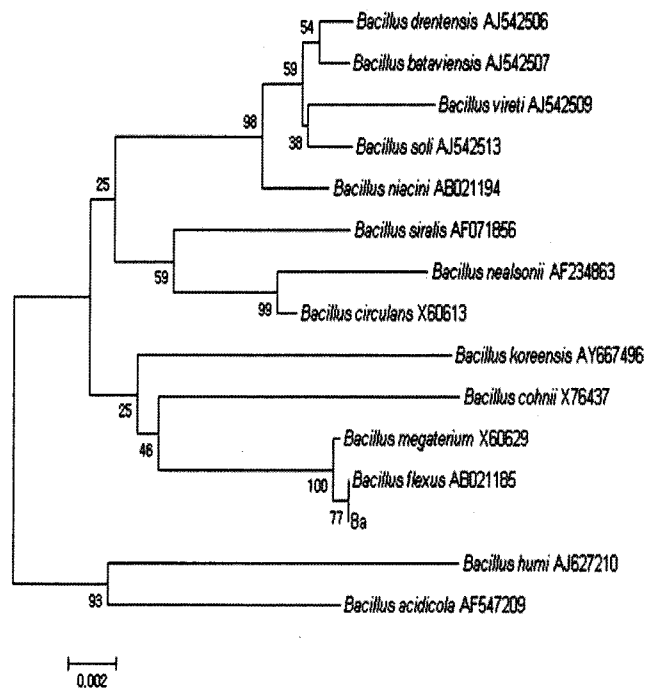


Fig. 1. Phylogenetic tree of the isolated strain determined by the 16S rDNA sequencing method. The isolated strain was identified as *Bacillus flexus*. Bar, 0.002 substitutions per nucleotide position.

#### 탄소원 및 질소원의 영향

탄소원으로 glucose, lactose, solbitol, fructose, sucrose, maltose를 검토한 결과, 미생물 성장은 maltose 배지에서

최대였으나, 예상대로 sucrose를 탄소원으로 한 배지에서만 특이적으로 invertase가 생산되었다 (Fig. 2). 질소원의 경우, potassium nitrate, malt extract, meat peptone, poly peptone, ammonium sulfate, yeast extract를 검토한 결과, malt extract와 meat peptone, poly peptone에서 미생물 성장이 유리하였으나 potassium nitrate에서 가장 높은 효소 생산성을 나타내었다 (Fig. 3). 이 결과는 Kaur 등 [26]이 *Streptomyces sp.*에서 생산한 invertase가 sucrose를 탄소원으로 사용했을 때 효소생산이 최적이었다는 결과와 일치하지만 질소원으로 yeast extract와 NaNO<sub>3</sub>가 최적이었다는 점과는 차이가 있었다. Haq 등 [27]은 *Saccharomyces cerevisiae*로부터 생산한 invertase의 경우 urea 또는 peptone과 yeast extract를 혼합한 질소원 배지를 사용하였을 때 효소생산성이 증대되었다고 보고한 바 있다.

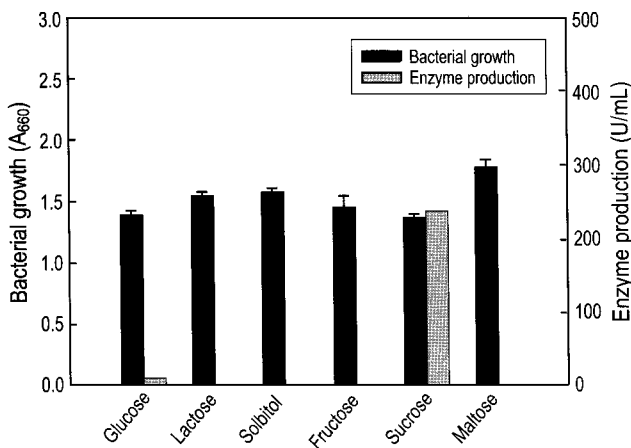


Fig. 2. Effects of carbon source on the bacterial growth and invertase production in *Bacillus flexus*.

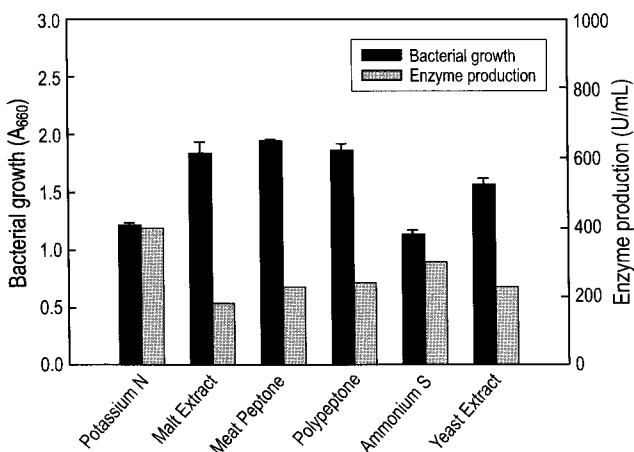


Fig. 3. Effects of nitrogen source on the bacterial growth and invertase production in *Bacillus flexus*.

### 금속이온의 영향

탄소원으로 sucrose, 질소원으로 potassium nitrate를 사용

한 배지에 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, MnSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O의 등의 금속이온을 2 mM 첨가하여 배양한 결과, Fig. 4에서와 같이 미생물의 성장은 금속이온의 영향이 크지 않았으나, Mg 및 Mn 이온을 첨가한 경우 효소생산이 각각 200%, 187%로 증가하였다.

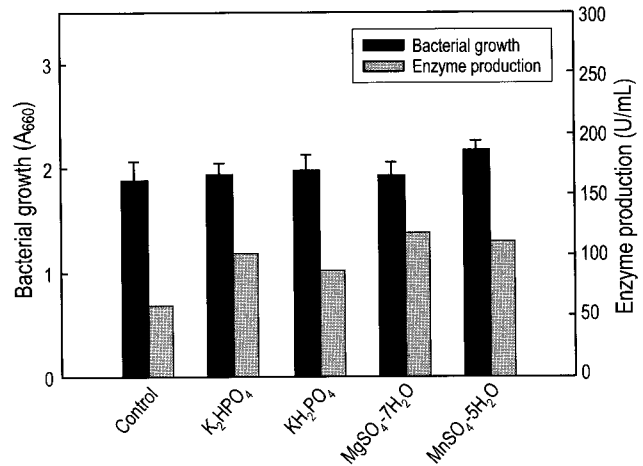


Fig. 4. Effects of mineral source on the bacterial growth and invertase production in *Bacillus flexus*.

### 온도에 따른 미생물 성장과 효소생산

온도에 따른 미생물의 성장과 효소생산을 조사하기 위해 30°C, 37°C, 45°C에서 실험을 수행한 결과, 30°C와 37°C에서는 미생물 성장은 유사하였으나 효소생산은 30°C에서 최적이었다 (Fig. 5).

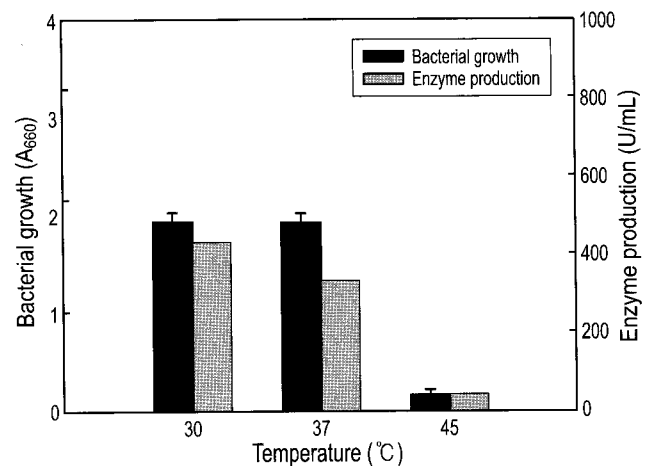
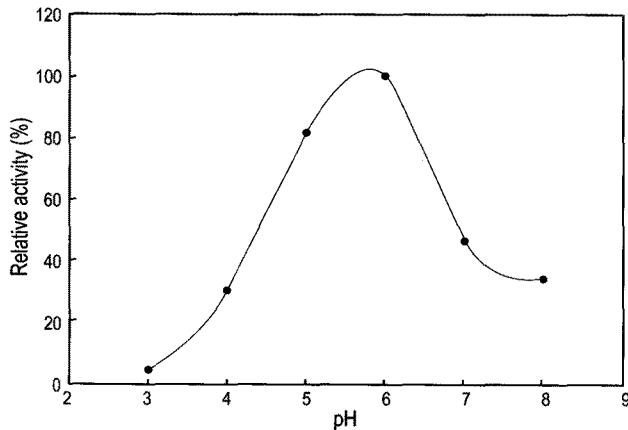


Fig. 5. Effects of temperature on the bacterial growth and invertase production in *Bacillus flexus*.

### 반응 pH 및 온도의 영향

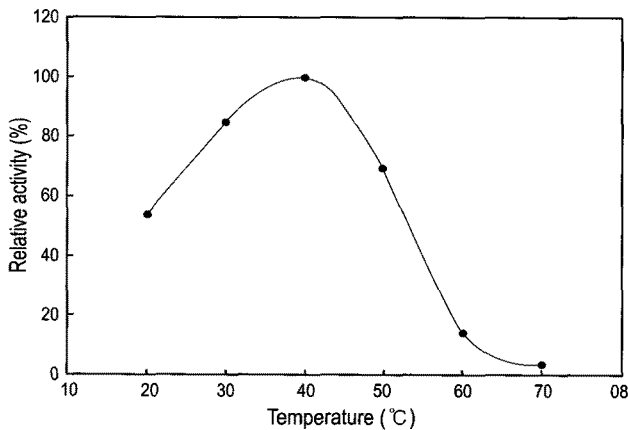
Invertase 활성에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위하여 batch 반응으로 검토한 결과, pH 5-6에서 최고 활성을 나타

내었으며, 그 이외의 pH에서는 급격한 효소의 활성저해가 나타났다 (Fig. 6). 최적 pH값을 100%로 하였을 때, pH 4.0에서는 효소활성이 30.2%로 감소하였고, pH 7.0, 8.0에서는 효소활성이 각각 36.5, 33.9%로 감소하여 pH 5.0-6.0의 약산성 부근에서 가장 높은 활성을 나타냈다. 이러한 결과는 *Aspergillus niger* 및 *Pteris deflexa* 등으로부터 생산된 invertase의 최적반응 pH와 동일하고 [20-22], 식물기원의 invertase 역시 최적활성이 5-7 전후로 보고되고 있다 [23,24].



**Fig. 6.** Influence of pH on invertase activity. Enzyme activity was measured in the presence of sucrose as substrate in 0.1 M acetate buffer (pH 4-5), 0.1M phosphate buffer (pH 6-8). The maximum activity was expressed as 100%.

한편 invertase의 최적반응온도는 Fig. 7에 나타난 결과와 같이, 40°C에서 최고활성을 나타내었다. 이 결과는 Liu 등 [25]이 *Bambusa edulis*로부터 생산한 invertase의 최적온도가 35°C, Hong 등 [20]이 *Aspergillus niger*에서 생산한 invertase의 최적활성이 50°C였다는 결과와는 상이하다. 따라서 본 연구에서 생산된 invertase는 다른 미생물 기원의 효소와는 그 특성이 다소 다른 것을 알 수 있다.



**Fig. 7.** Effects of temperature on invertase activity. Enzyme activity was measured after incubating the enzyme reaction mixture at various temperature (20~70°C) for 30 min. The maximum activity was expressed as 100%.

### 금속이온이 효소활성에 미치는 영향

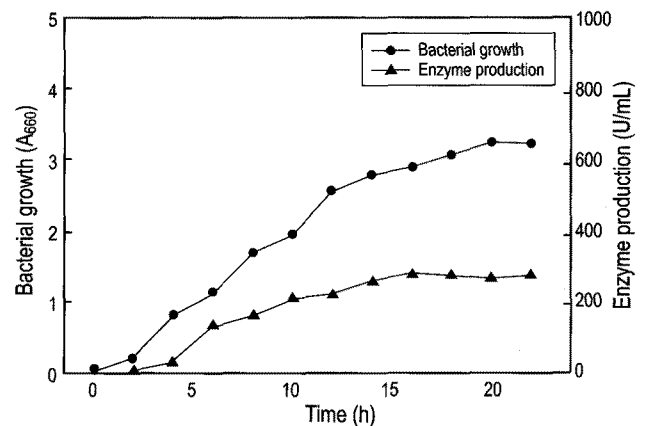
일반적으로 효소활성에 영향을 미치는 것으로 보고되어 있는 여러 가지 금속이온들을 효소반응액에 첨가한 결과, Ag, Mg, Mn 등을 첨가한 경우 각각 88.2%, 62.7%, 80.3%로 효소 활성이 저해되었으며, K 및 Fe를 첨가한 경우 효소 활성이 10% 정도 증가되었다 (Table 1).

**Table 1.** Effects of metal ions on invertase activity

Metal ions	Relative activity (%)
None	100
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	105.8
AgNO <sub>3</sub>	88.2
KI	113.7
KCl	107.8
MgSO <sub>4</sub>	62.7
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	80.3
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	111.7
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	96.0

### 미생물의 성장에 따른 효소생산

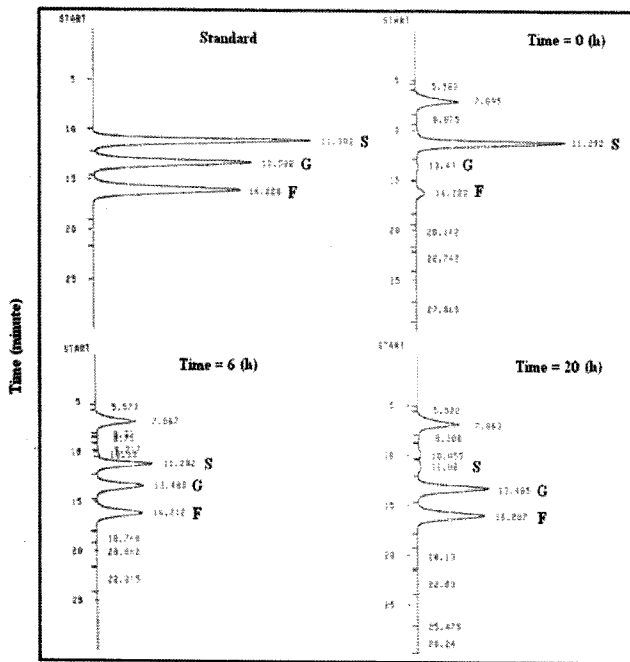
*Bacillus flexus*의 배양시간에 따른 invertase 효소생산 결과를 Fig. 8에 나타내었다. 2시간 간격으로 미생물 증식과 효소생산량을 측정된 결과, 배양 4~6시간 이후 효소의 생산량이 급격히 증가하였다. 이 결과는 미생물이 초기 탄소원인 sucrose를 가수분해한 후, glucose 및 fructose 등의 단당류를 이용하여 효소를 생합성 하는 것으로 추측된다.



**Fig. 8.** Time profiles of bacterial growth and invertase production in *Bacillus flexus*.

### Invert sugar 생산

이상의 결과에서 최적화한 배지에서 invertase를 생산한 다음, 2.5% (w/v) sucrose를 기질로 효소용액 sucrose 1 mg 당 20 units의 효소량으로 각각 6, 20시간 반응한 결과, 전환률이 각각 62.3%, 96.9% 이었다 (Fig. 9).



**Fig. 9.** HPLC chromatograms to identify the reaction products at 6 and 20 h. S: sucrose G: glucose F: fructose. Arabic numerals refer to retention time. The reactions were carried out with the reaction mixture of 50 g/L sucrose solution (20 mL) and crude enzyme solution (20 mL) under the optimized reaction conditions.

**결론**

감미료산업에서 매우 유용한 효소인 invertase에 관한 연구는 여러 연구자들에 의해 오랫동안 많이 수행되어 왔는데, 주로 효소생산성을 향상시킬 수 있는 새로운 균주개발이 주된 관심사였다. 따라서 본 연구에서 *Bacillus flexus*로부터 분리한 새로운 invertase를 보고하였는데, 산업균주로 활용하기 위해서는 향후 효소의 정제를 통해 이 효소의 분자수준의 특성을 이해하는 후속연구가 필요하다.

접수 : 2009년 11월 23일, 게재승인 : 2009년 12월 22일

**REFERENCES**

1. Yu, J. S. (2006) *Purification and Characterization of an Invertase Produced by Saccharomyces Cerevisiae Isolated from Home-made Wine*. Master. Thesis. University of Konkuk, Seoul, Korea.
2. Goldstein, H., P. W. Barry, A. B. Rizzuto, K. Venkatasubramanian, and W. R. Vieth (1977) Continuous enzymatic production of invert sugar. *J. Ferment. Technol.* 55: 516-524.

3. Myrbäck, K. (1960) Invertase. pp. 379-396. In: P. D. Boyer, H. Lardy, and Myrbäck, K. (ed.). *The enzyme*, Vol. 4. Academic Press Inc, NY, USA.
4. Rashad, M. M. and M. U. Nooman (2009) Production, purification and characterization of extracellular invertase from *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-12632 by solid-state fermentation of red carrot residue. *Aust. J Basic Appl. Sci.* 3: 1910-1919.
5. Watanabe, T. and Y. Oda (2008) Comparison of sucrose-hydrolyzing enzymes produced by *Rhizopus oryzae* and *Amylomyces rouxii*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72: 3167-3173.
6. Yanase, H., H. Fukushi, N. Ueda, Y. Maeda, A. Toyoda, and K. Tonomura (1991) Cloning, sequencing, and characterization of the intracellular invertase gene from *Zymomonas mobilis*. *Agric. Biol. Chem.* 55: 1383-1390.
7. Goosen, C., X. L. Yuan, J. M. van Munster, A. F. J. Ram, M. J. E. C. van der Maarel, and L. Dijkhuizen (2007) Molecular and biochemical characterization of a novel intracellular invertase from *Aspergillus niger* with transfructosylating activity. *Eukaryotic Cell.* 674-681.
8. Rubio, M. C., R. Runco, and A. R. Navarro (2002) Invertase from a strain of *Rhodotorula glutinis*. *Phytochemistry.* 61: 605-609.
9. Patkar, A., J. H. Seo, and H. C. Lim (1993) Modeling and optimization of cloned invertase expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* 41: 1066-74.
10. Haq, I., S. Ali, A. Aslam, and M. A. Qadeer (2008) Characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* mutant with enhanced production of  $\beta$ -D-fructofuranosidase. *Bioresour. Technol.* 99: 7-12.
11. Choi, M. J., C. Kim, S. O. Lee, and T. H. Lee (1990) Purification and characterization of the external invertase constitutively produced by *Rhodotorula glutinis* K-24. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.* 18: 368-375.
12. Hussain, A., M. H. Rashid, R. Perveen, and M. Ashraf (2009) Purification, kinetic and thermodynamic characterization of soluble acid invertase from sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Plant Physiol. and Biochem.* 47: 188-194.
13. Gianfreda, L., P. Parascandola, and V. Scardi (1980) Gelatin-entrapped whole-cell invertase. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 17: 481-497.
14. Parascandola, P. and V. Scardi (1981) A new method of whole microbial cell immobilization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 11: 6-7.
15. Gianfreda, L., P. Parascandola, and V. Scardi (1982) Sucrose inversion by gelatin-entrapped cells of yeast. *Biotechnol. Lett.* 4: 753-758.

16. Kumar, S., V. S. Chauhan, and P. Nahar (2008) Invertase embedded-PVC tubing as a flow-through reactor aimed at conversion of sucrose into inverted sugar. *Enzyme Microb. Technol.* 43: 517-522.
17. Toksoy, E., Z. I. Onsan, and B. Kirdar (2002) High-level production of TaqI restriction endonuclease by three different expression systems in *Escherichia coli* cells using the T7 phage promoter. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 239-245.
18. Somashekara, D. M., N. K. Rastogi, and S. T. Ramachandriah (2009) A simple kinetic model for growth and biosynthesis of polyhydroxyalkanoate in *Bacillus flexus*. *N. Biotechnol.* Vol. 26.
19. Zhao, J., X. Lan, J. su, L. Sun, and E. Rahman (2008) Isolation and identification of an alkaliphilic *Bacillus flexus* XJU-3 and analysis of its alkaline amylase. *Acta Microbiol. Sin.* 448: 750-6.
20. Hong, J. M. and K. A. Lee (1990) Production and properties of invertase from *Aspergillus niger*. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 19: 577-587.
21. Sayago, J. E. and M. A. Vattuone (2002) Proteinaceous inhibitor versus fructose as modulators of *Pteris deflexa* invertase activity. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 17: 123-130.
22. Bang, B. H., G. S. Lee, and C. Y. Yang (1989) Calcium alginate-entrapped yeast whole-cell invertase. *Korean J. Food & Nutr.* 2: 14-20.
23. Byung, O. L., K. D. Moon, and T. H. Shon (1990) Purification and characterization of invertase in astringent persimmon during sun drying. *Korean J. Dietary culture.* 5: 2.
24. Shiomi, N. (1978) Isolation and identification of L-kestose and neokestose from onion bulbs. *J. Fac. Agric. Hokkaido Univ.* 58: 321.
25. Liu, C. C. and L. C. Huang (2006) Purification and characterization of soluble invertases from suspension-cultured bamboo (*Bambusa edulis*) cells. *Food Chem.* 96: 621-631.
26. Kaur, N. and A. D. Sharma (2005) Production, optimization and characterization of extracellular invertase by an actinomycete strain. *J. Sci. Ind. Res. (India)* 64: 515-519.
27. Haq, I. U., M. A. Baig, and S. Ali (2005) Effect of cultivation conditions on invertase production by hyperproducing *Saccharomyces cerevisiae* isolates. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21: 487-492.