

Fructosyltransferase와 Glucose Isomerase 혼합효소계를 이용한 프락토 올리고당의 생산

윤종원 · 노지선 · 이민규* · 송승구

부산대학교 화학공학과

*제주대학교 화학공학과

(1993년 6월 21일 접수, 1993년 9월 15일 채택)

Production of Fructo-oligosaccharides by the Mixed-enzyme System of Fructosyltransferase and Glucose Isomerase

Jong Won Yun, Ji Seon Noh, Min Gyu Lee* and Seung Koo Song

Department of Chemical Engineering, Pusan National University

**Department of Chemical Engineering, Cheju National University*

(Received 21 June 1993; accepted 15 September 1993)

요 약

프락토 올리고당 생산 효소인 fructosyltransferase와 glucose isomerase와의 혼합효소계를 이용하여 새로운 조성의 프락토 올리고당 생산을 검토하였다. Fructosyltransferase의 효소화학적 특성인 glucose 저해현상을 glucose isomerase에 의해 낮추어 주었음에도 불구하고 프락토 올리고당의 전환율을 크게 증가시킬 수 없었다. 이 현상을 설명하기 위한 수학적 모델을 제안하고 실험을 통해 확인한 결과, fructosyltransferase 단일효소계와 비교할 때 혼합효소계의 경우 여러 가지 기질에 대한 동력학적 상수(K_m , K_i)의 값이 현저하게 달라짐을 알 수 있었다. Glucose isomerase에 의해 생성된 fructose는 fructosyltransferase에 의해 전이되지 않아 프락토 올리고당의 농도를 증가시켜 주지 못하는 것으로 보아 프락토 올리고당의 생산반응은 fructosyltransferase의 selftransfer 반응에 의해서만 생성된다는 결론을 얻었다.

Abstract—The production of fructo-oligosaccharides having new composition was investigated using the mixed-enzyme system of fructosyltransferase and glucose isomerase. Despite of decrease in glucose concentration which acts as an inhibitor of fructosyltransferase during the production of fructo-oligosaccharides, the concentration of fructo-oligosaccharides was not high due to the altered kinetic parameters in the mixed-enzyme system. To confirm these results, a mathematical model for the mixed-enzyme system was proposed and compared with the experimental results, which showed good agreement with experimental data. Surprisingly, the K_m values and inhibition constant of glucose(K_{IG}) for fructosyltransferase in the mixed-enzyme system were different from those of fructosyltransferase alone. The fructose isomerized from glucose by glucose isomerase did not act as a sucrose acceptor, which meant the isomerized fructose did not play a part in the production of fructo-oligosaccharides.

1. 서 론

최근 건강 지향의 식생활 경향에 따라 설탕, 전분당 등의 기존 감미료의 단점을 극복하는 동시에 칼로리가 낮거나 인체내에서 *Bifidus factor*로 작용되는 등의 새로운 기능성을 갖는 대체감미료의 개발이 '80년대 후반부터 일본을 중심으로 활발히 진행되고 있다[1, 2]. 특히 fructo-, galacto-oligosaccharides 등의 새로운 올리고 당류와 전분을 이용한 malto-, isomalto-oligosaccharides 등의 올리고 당류의 개발에 초점이 모아지고 있는데[3-7], 이미 일본에서는 이들 제품이 산업적 규모로 생산되고 있다. 현재 국내에서는 fructo-oligosaccharides(FOS)가 유일하게 생산되고 있으며, *Aureobasidium pullulans* 기원의 fructosyltransferase를 whole cell 상태로 Ca-alginate gel에 고정화한 후 충전탑형 반응기를 이용하여 연속생산하는 공정이 대표적이다[8].

전술한 바와 같이 FOS의 기능성이 우수함에도 불구하고 실제 상업적으로 생산되고 있는 FOS 시럽은 미반응된 sucrose(10-15%)와 30%(w/w) 이상의 glucose를 함유하고 있어 실제 FOS의 함량은 55-60%(w/w)에 불과하다[3, 8-11]. 이것은 FOS 생산효소인 fructosyltransferase(FTase)의 효소화학적 특성, 즉 반응 부산물인 glucose에 의해 FTase가 저해를 받아 반응기질인 sucrose의 전환율이 85-90%에 도달한 후 더 이상 반응이 진행되지 못하기 때문인 것으로 알려져 있다[10]. 따라서 본 연구자들은 FTase에 저해제로 작용하는 반응 부산물인 glucose를 반응중에 제거하거나 그 농도를 낮추어 주는 방법에 의해 고효율의 FOS 생산을 검토한 결과, 두 종류의 glucose 전환 효소, 즉 glucose oxidase(GO)와 glucose isomerase(GI)를 FTase와 함께 사용한 혼합효소계를 이용하여 함량이 높은 FOS 생산방법에 관심을 갖게 되었다.

먼저 GO를 이용한 전보[12]에서의 연구 결과, glucose가 완전히 gluconic acid로 전환되어 90% 이상의 FOS 제품을 생산할 수 있었다. 그러나 이 경우는 glucose 제거에 의한 총당(total sugar)의 손실을 피할 수 없고, gluconic acid의 제거 공정이 부가되는 등 경제적 측면에서 몇 가지 문제점이 예상된다.

따라서 본 연구에서는 glucose isomerase를 FTase와 함께 사용하여 glucose를 fructose로 일부 전환시켜 glucose 저해 효과를 줄여주는 것과, GI에 의해 생성되는 fructose가 sucrose의 acceptor로 작용되어 FOS 함량을 증가시킬 수 있는 가능성을 검토하는 동시에 fructose가 함유됨으로써 감미도가 향상된 새로운 당 조성(sugar composition)의 FOS의 생산 가능성을 검토하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2-1. 시약

효소활성 측정 및 반응기질로 사용된 sucrose는 food grade(제일제당)를 사용하였으며 그 이외의 시약들은 일반 시약등급을 사용하였다.

2-2. 효소

Aureobasidium pullulans KFCC 10245를 raw sugar 10 g/l, yeast extract 2 g/l(pH 5.2)의 배지에서 30°C에서 2일간 배양한 다음, 50 ml의 배지(sucrose 200 g/l, yeast extract 10 g/l, K_2HPO_4 5 g/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/l, $NaNO_3$ 10 g/l; pH 6.0)가 들어 있는 250 ml flask를 이용하여 30°C에서 5일간 배양하였다. 배양 완료된 *A. pullulans* broth를 원심분리하여 증류수로 2회 세척한 다음 20%(w/v) 농도로 현탁시키고, Kitalase(Kumiai kagaku, Japan)를 2%(w/v) 농도가 되게 첨가한 다음 45°C에서 2시간 동안 반응시키고 규조토로 여과하여 FTase 효소 용액을 제조하였다. 한편 glucose isomerase는 G-zyme 998(Biosystem Co., UK)을 구입하여 사용하였다.

2-3. 효소 활성의 측정

FTase 활성은 전보[10]에서와 동일한 방법으로 측정하였고, 55°C에서 1분간 1 μ mole의 glucose를 생성하는데 필요한 효소의 양을 1 unit로 정의하였다. GI 활성은 55°C, pH 6.5에서 1분간 1 μ mole의 fructose를 생산하는데 필요한 효소량을 1 unit로 정의하였다.

2-4. 반응물의 분석

모든 반응물(당류)의 분석은 Aminex HPX-42C(300 mm \times 7.8 mm, BIO-RAD, USA) column이 부착된 HPLC(Varian, USA)를 사용하였으며, detector로는 RI-4 refractive index detector, 이동상으로 물을 사용(1 ml/min)하였으며 column 온도는 85°C로 일정하게 유지해주었다[12].

2-5. 모델의 확인실험

FTase 및 GI에 대한 여러 가지 kinetic parameter(K_m , K_i , V_{max})값들은 50 ml 기질이 들어있는 250 ml flask를 이용하여 55°C에서 FTase의 경우 pH 5.5, 5 unit/g·substrate, GI의 경우 pH 6.5, 4030 unit/g·substrate의 조건에서 30분 동안 반응을 수행한 후 초기 반응속도를 구하고 Lineweaver-Burk plot을 이용하여 구하였다. 모델의 확인 실험은 250 ml 삼각플라스크에 650 g/l sucrose 용액 50 ml를 넣고 55°C, pH 5.5에서 25시간 동안 반응시켰다.

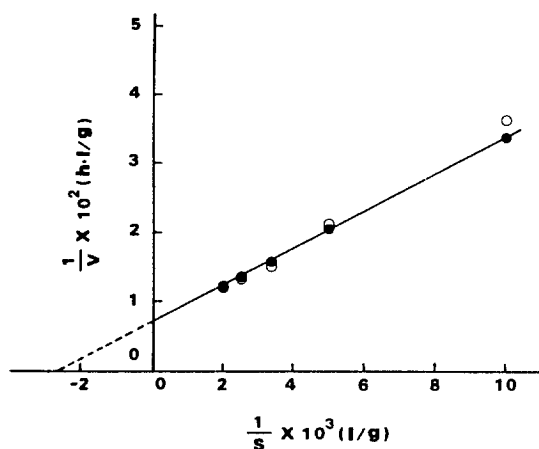


Fig. 1. Lineweaver-Burk plot showing the effect of fructose on the velocity of fructosyltransferase using sucrose as a substrate: (○); without fructose, (●); with 40 g/l fructose supplemented.

3. 결과 및 고찰

3-1. Fructose에 의한 FTase inhibition 확인 실험

GI에 의해 생성되는 fructose가 glucose의 경우와 유사하게 FTase 반응에 저해작용을 나타내는가를 실험하였다. Fig. 1에서 보여주는 바와 같이 반응기질인 sucrose에 40 g/l (0.22 M)의 fructose를 첨가하여 반응속도를 측정된 결과, 효소활성에 아무런 영향을 나타내지 않는 것으로 나타났다. 이 결과는 Gupta 등[13]이 *Fusarium oxysporum* 기원의 FTase를 sucrose와 반응시켰을 때, 첨가된 fructose가 0.1 M 이하의 농도에서는 효소활성을 촉진시키고 1 M 이상에서는 효소활성에 무관하다고 보고하였는데 두 효소간의 fructose 전이활성이 서로 다른 것으로 보인다. 이 결과만을 볼 때 FTase 반응중에 계속 축적되는 저해제인 glucose를 GI가 fructose로 전환시켜 그 농도를 절반 정도로 낮추어 줌으로써 FOS 반응 수율을 증가시킬 수 있을 것으로 예상되었다. 그러나 실제로 FTase와 GI의 혼합효소계를 이용하여 반응성을 고찰한 결과 GI는 FOS 수율향상에 큰 영향을 미치지 못하였다. 이 현상을 규명하기 위하여 FTase와 GI 혼합효소계에 대한 수학적 모델을 제안하였다.

3-2. Glucose isomerase의 kinetic parameters

전술한 조건에서 glucose와 fructose를 반응기질로 사용하여 GI의 K_m , V_{max} 값을 측정된 결과를 Table 1에 나타내었다. Glucose 및 fructose에 대한 K_m 값은 각각 85, 156 g/l로 나타나 GI가 fructose 보다 glucose에 대한

Table 1. Kinetic parameters for the fructosyltransferase alone and mixed-enzyme system of fructosyltransferase and glucose isomerase in fructo-oligosaccharides production at 55°C^{a)}

Substrates	K_m (g/l)		V_{max} (g/l·h)		K_{iG} (g/l)	
	Single	Mixed	Single	Mixed	Single	Mixed
Sucrose	330	560	130	130		
GF ₂	750	773 ^{b)}	30	30		
GF ₃	850	930 ^{c)}	16	16	30.2	6.08
Glucose	—	85	—	36		
Fructose	—	156	—	93		

^{a)} Single and mixed refers to the enzyme system of fructosyltransferase alone and mixed-enzyme of fructosyltransferase and glucose isomerase respectively.

^{b), c)} predicted values

affinity가 큰 것으로 확인되었고, V_{max} 값은 각각 36, 93 g/l·h로 나타났다. Takasaki 등[14]이 *Streptomyces* sp. 기원의 GI를 이용하여 구한 값과는 차이가 있으나 K_{mF}/K_{mG} 및 V_{mF}/V_{mG} 의 비는 이들의 연구결과와 거의 유사한 것으로 나타났다.

3-3. FTase 및 GI 혼합효소계에 대한 수학적 모델

Jung과 Yun[10] 등은 FTase의 효소반응 메커니즘을 통해 FOS의 생성은 반응기질인 sucrose로부터 초기에 1-kestose(GF₂: G; glucose, F; fructose)와 glucose가 생성되어(GF + GF → GF₂ + G) glucose는 반응중에 계속 축적되고, GF₂는 다시 FTase의 기질로 이용되는 일종의 disproportionation 반응(GF_n + GF_n → GF_{n-1} + GF_{n+1})에 의해 FOS가 생성된다고 보고한 바 있다. 이 모델에 따르면 inhibitor인 glucose의 농도가 줄어들면 FOS 생성속도가 증가하여 결국 최종 반응물중의 FOS 함량이 증가하게 될 것이다. 그러나 FTase 단일 효소계를 사용한 경우에 비해 FTase와 GI 혼합효소계를 이용하여 반응한 경우 반응중의 glucose를 glucose isomerase에 의해 fructose로 43% 정도 전환시켜[15] 농도를 크게 낮추어 주었음에도 불구하고 거의 동일한 FOS 전환율을 나타내었다. 이 현상은 다음의 모델로 설명할 수 있었다. FTase와 GI 혼합효소계를 이용하여 sucrose로부터 FOS가 생성될 때의 반응속도식은 Fig. 2의 reaction network에 따라 다음의 식들로 표현할 수 있다.

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{V_{mS} \cdot S}{[K_{mS} + S + (K_{mS}/K_{iG})G]} + \frac{2 \times 342}{4 \times 504} \cdot \frac{V_{mK} \cdot K}{(K_{mK} + K)} \quad (1)$$

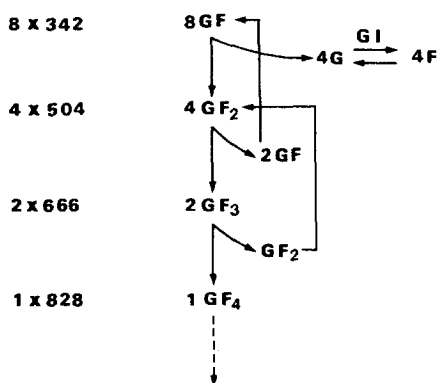


Fig. 2. Network of the proposed reaction mechanism for the production of fructo-oligosaccharides by the mixed-enzyme system of fructosyltransferase and glucose isomerase.

$$\frac{dK}{dt} = \frac{4 \times 504}{8 \times 342} \cdot \frac{V_{mS} \cdot S}{[K_{mS} + S + (K_{mS}/K_{iG})G]} - \frac{V_{mK} \cdot K}{(K_{mK} + K)} + \frac{504}{2 \times 666} \cdot \frac{V_{mN} \cdot N}{(K_{mN} + N)} \quad (2)$$

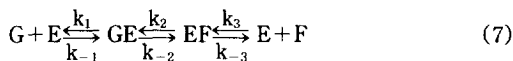
$$\frac{dN}{dt} = \frac{2 \times 666}{4 \times 504} \cdot \frac{V_{mK} \cdot K}{(K_{mK} + K)} - \frac{V_{mN} \cdot N}{K_{mN} + N} \quad (3)$$

$$\frac{dP}{dt} = \frac{828}{2 \times 666} \cdot \frac{V_{mN} \cdot N}{(K_{mN} + N)} \quad (4)$$

$$\frac{dG}{dt} = \frac{4 \times 180}{8 \times 342} \cdot \frac{V_{mS} \cdot S}{[K_{mS} + S + (K_{mS}/K_{iG})G]} + \frac{dG'}{dt} \quad (5)$$

$$\frac{dF}{dt} = -\frac{dG'}{dt} \quad (6)$$

여기서 dG'/dt 는 glucose isomerase의 반응속도식으로서 다음과 같은 가역 효소 반응 scheme에 의해 속도식을 전개하였다.



정상상태에서 중간생성물 GE, EF의 농도변화를 무시하면 dG'/dt 는 다음의 식 (8)로 정리할 수 있다.

$$\frac{dG'}{dt} = \frac{-E_0(k_1 k_2 k_3 - k_{-1} k_{-2} k_{-3} F)}{k_{-1} k_{-2} + k_{-1} k_3 + k_2 k_3 + k_1 (k_{-2} + k_3 + k_2) G + k_{-3} (k_{-1} + k_2 + k_{-2}) F} \quad (8)$$

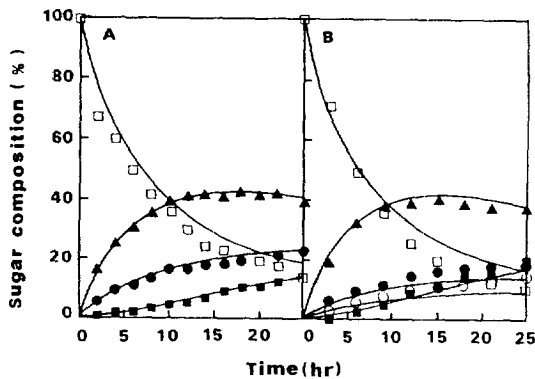


Fig. 4. Reaction profile for the production of fructo-oligosaccharides by a fructosyltransferase alone(A) and by the mixed-enzyme of fructosyltransferase and glucose isomerase(B): (○); fructose, (●); glucose, (□); sucrose, (▲); GF₂, (■); GF₃, (▨); GF₄, (▩); model predictions.

Table 2. Comparison of typical sugar composition of reaction products with fructosyltransferase and mixed-enzyme system of fructosyltransferase and glucose isomerase at 55°C^{a)}

Sugars	Composition(%, w/w) ^{b)}	
	Single	Mixed
Glucose	31.36	17.59
Fructose	0	14.63
Sucrose	12.11	8.55
GF ₂	39.20	37.55
GF ₃	16.00	20.36
GF ₄	1.33	1.34
$\sum_{n=2}^4 GF_n$	56.53	59.25

^{a)} Reaction was carried out with 650 g/l of sucrose at 55°C for 25 hrs.

^{b)} Single and mixed refers to the enzyme system of fructosyltransferase alone and mixed-enzyme of fructosyltransferase and glucose isomerase respectively.

단일효소계에서는 30.2 g/l로 나타났으나, FTase, GI 혼합효소계에서는 그 값이 6.08 g/l로 5배 정도 낮게 나타나 서로 유사한 기질에 특이성을 갖는 두 효소간에 경쟁적 작용이 존재하여 GI가 FTase에 대해 negative interaction을 나타낸 것으로 볼 수 있다. 결론적으로 혼합효소계를 이용하여 반응중에 inhibitor인 glucose level을 낮추어 주었음에도 불구하고 sucrose, GF₂, GF₃ 등에 대한 FTase의 K_m 값의 증가와 K_{ic} 값의 감소로 인하여 FOS 수율향상에는 큰 영향을 나타내지 못하였다 (Fig. 4, Table 2).

3-4. 모델의 확인 실험

Table 1에서 구한 kinetic parameter들을 모델식들에 적용하여 각 성분들에 대한 농도 profile을 예측하고 (BASIC language), 임의의 초기 sucrose 농도 650 g/l에 대하여 실험치와 비교한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. FTase 단일효소계에서는 모든 성분에 대한 농도 profile이 모델값과 실험치가 서로 잘 일치하였으나[10], 혼합효소계의 경우 sucrose, GF₂는 다소의 data scattering이 있었으나 그외의 성분들에 대해서는 서로 잘 일치하였다. 한편 GI가 생성하는 fructose에 대해서는 FTase의 전이활성(fructose-transferring activity)이 없는 것으로 보인다. 이 결과로부터 FTase는 반응기질인 sucrose를 가수분해시켜 생성된 fructose만을 전이시키는, 즉 selftransfer 반응에 의해서만 FOS를 생산하는 것을 확인할 수 있었다. Fujita 등[16]은 본 연구에서 사용한 효소와 유사한 성질을 가진 *Arthrobacter* 기원의 β -fructofuranosidase를 이용하여 여러 가지 기질에 대한 selftransfer 특성을 보고한 바 있는데, raffinose와 sucrose에 대한 selftransfer 반응속도가 다른 기질에 비해 우수하다고 보고한 바 있다.

3-5. 반응물의 조성비교

전술한 바와 같이 혼합효소계를 FOS 생산공정에 적용할 경우 혼합효소계의 특성으로 인해 FOS 전환률은 크게 증가시키지는 못하였으나 Table 2에서 보여주듯이 최종 반응액중의 sucrose와 glucose의 농도를 낮추어 줄 수 있었고 fructose가 15% 정도 함유됨으로써 감미도가 낮은 결점을 가지고 있는 기존의 프락토 올리고당에 비해 제품의 감미도가 35% 정도 증가된 새로운 조성의 FOS 생산이 가능하였다.

4. 결 론

Fructosyltransferase와 glucose isomerase의 혼합효소계를 프락토 올리고당의 생산공정에 적용한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

(1) Fructosyltransferase 반응중에 반응저해제로 작용하는 glucose 농도를 glucose isomerase에 의해 낮은 농도로 유지해 주었으나 프락토 올리고당의 전환률은 크게 증가하지 않았다.

(2) 혼합효소계를 이용한 fructo-oligosaccharides 생산에 대한 수학적 모델을 제안하고 실험을 통해 검증한 결과, fructosyltransferase 단일효소계의 경우와 비교했을 때 혼합효소계에서 효소 반응의 동력학적 상수(K_m , K_i) 값들이 변화함을 알 수 있었고 제안된 모델은 실험 결과와 잘 일치하였다.

(3) 혼합효소계에서 glucose isomerase에 의해 생성된 fructose로 인하여 감미도가 증가된 새로운 조성의 프락토 올리고당을 얻을 수 있었다.

(4) Glucose isomerase에 의해 유리된 fructose는 fructosyltransferase에 의해 전이되지 않는 것이 확인되어, 프락토 올리고당의 생산은 fructosyltransferase의 selftransfer 반응에 의해서만 생성되는 것으로 밝혀졌다.

사용기호

E_0	: initial enzyme concentration
F	: fructose concentration [g/l]
G	: total glucose concentration [g/l]
G'	: glucose concentration during the reaction by glucose isomerase [g/l]
K	: 1-kestose(GF_2) concentration [g/l]
k	: reaction constant in Eq. (8) [h^{-1}]
K_{IG}	: competitive inhibition constant for glucose [g/l]
K_{mF}	: Michaelis constant for fructose [g/l]
K_{mG}	: Michaelis constant for glucose [g/l]
K_{mK}	: Michaelis constant for 1-kestose [g/l]
K_{mN}	: Michaelis constant for nystose [GF_3 , g/l]
K_{mS}	: Michaelis constant for sucrose [g/l]
N	: nystose(GF_3) concentration [g/l]
P	: fructofuranosyl nystose(GF_4) concentration [g/l]
S	: sucrose concentration [g/l]
t	: time [h]
V_{mF}	: maximum velocity for fructose [g/l·h]
V_{mG}	: maximum velocity for glucose [g/l·h]
V_{mK}	: maximum velocity for 1-kestose [g/l·h]
V_{mN}	: maximum velocity for nystose [g/l·h]
V_{mS}	: maximum velocity for sucrose [g/l·h]

참고문헌

1. 편집부: *Food Chemicals*(Japan), Oct., 10(1989).
2. 편집부: *식품과 개발*(일본), 26(10), 23(1990).
3. Yun, J. W., Jung, K. H., Oh, J. W. and Lee, J. H.: *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 24/25, 299(1990).
4. Hidaka, H., Hirayama, M. and Sumi, M.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 1181(1988).
5. Hayashi, S., Nonokuchi, M., Imada, K. and Ueno, H.: *J. Industrial Microbiol.*, 5, 395(1990).
6. Kohomoto, T., Tsuji, K., Kaneko, T., Shiota, M., Fukui, F., Takaku, H., Nakagawa, Y., Ichikawa, T. and Kobayashi, S.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56(6), 937(1992).
7. Jung, K. H., Lim, J. Y., Yoo, S. J., Lee, J. H. and Yoo, M. Y.: *Biotechnol. Lett.*, 9, 703(1987).
8. Yun, J. W., Jung, K. H., Jeon, Y. J. and Lee, J. H.: *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2(2), 98(1992).
9. van Balken, J. A. M., van Dooren, Th. J. G. M., van den Tweel, W. J. J., Kamphuis, J. and Meijer, E. M.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 35, 216(1991).
10. Jung, K. H., Yun, J. W., Kang, K. R., Lim, J. Y. and Lee, J. H.: *Enzyme Microb. Technol.*, 11, 491(1989).
11. Yun, J. W., Jeon, Y. J., Lee, M. G. and Song, S. K.: *한국생물공학회지*, 8(3), 266(1993).
12. Yun, J. W. and Song, S. K.: *Biotechnology Lett.*, 15(6), 573(1993).
13. Gupta, A. K. and Bhatia, I. S.: *Phytochemistry*, 19, 2557(1980).
14. Takasaki, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, 31(3), 309(1967).
15. Hemmingsen, S. H.: *Applied Biotechnology and Bioengineering* vol. 2, p. 157, Academic Press Inc., New York(1979).
16. Fujita, K., Hara, K., Hashimoto, H. and Kitahata, S.: *Agric. Biol. Chem.*, 54(10), 2655(1990).