

단 신

## Amyloglucosidase에 의한 Fructo-oligosaccharides 생산의 반응메카니즘

윤종원 · 이민규\* · 송승구†

부산대학교 화학공학과

\*제주대학교 화학공학과

(1994년 1월 20일 접수, 1994년 4월 27일 채택)

## Reaction Mechanism for the Production of Fructooligosaccharides by Amyloglucosidase

Jong Won Yun, Min Gyu Lee\* and Seung Koo Song†

Department of Chemical Engineering, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

\*Department of Chemical Engineering, Cheju National University, Cheju 690-756, Korea

(Received 20 January 1994; accepted 27 April 1994)

### 요 약

Amyloglucosidase에 의한 fructooligosaccharides 생산에서의 효소반응 메카니즘을 수학적 모델을 통해 규명하였다. Amyloglucosidase는 기존의 fructooligosaccharides 생산효소인 fructosyltransferase와 거의 동일한 메카니즘에 의해 fructooligosaccharides를 생산하는 것으로 밝혀졌다. 효소 동력학적 인자 중  $K_m$  및  $K_i$  값들은 fructosyltransferase에 비해 큰 값을,  $V_{max}$ 는 낮은 값을 나타내었다. 제안된 모델을 두 기질농도에 대한 실험치와 비교해 본 결과 대체로 서로 잘 일치하였다.

**Abstract**—A mathematical model for the production of fructooligosaccharides by amyloglucosidase was proposed and compared with experimental results. The reaction mechanism of amyloglucosidase in fructooligosaccharides production was very similar to that of fructosyltransferase except that fructose was accumulated at a high level. The kinetic parameters such as Michaelis constants( $K_m$ ) and inhibition constant( $K_i$ ) were higher, whereas maximum reaction velocities( $V_{max}$ ) were low compared with those of fructosyltransferase. Although data points were scattered for profiles of sucrose and 1-kestose to some extent, good agreement was generally found between the proposed model and experimental results.

### 1. 서 론

Amyloglucosidase는 전분의 당화공정 중에서 dextrin을 포도당으로 가수분해시키는데 상업적으로 널리 이용되는 효소로서 glucose unit의  $\alpha$ -(1,4) 및  $\alpha$ -(1,6) 결합을 가수분해하는 것으로 잘 알려져 있다[1]. 이 효소를 이용한 당화공정에서 발생하는 문제점 중의 하

나는, 당화반응이 진행되는 동안 포도당으로부터 isomaltose, isomaltotriose, panose 등의 올리고당류의 전이반응이 일어나 수율이 감소하는 현상이다[2]. 많은 연구자들이 특히 이 효소의 전이반응에 의한 올리고당류의 합성에 관해 관심을 가졌는데, 주로 반응 메카니즘에 대한 연구결과가 많이 발표되어 있다[3-5].

Isomaltooligosaccharides[6, 7], fructooligosacchari-

des[8-10] 등의 올리고당류는 최근에 충치예방 효과, Bifidus 인자, 저 칼로리성 등의 여러 가지 기능성이 입증되면서 관심이 크게 증가되고 있다[11-12]. 특히 fructooligosaccharides는 감미질이 설탕과 유사하고 다른 올리고당에 비해 그 제조 공정이 단순한 편이어서 이미 공업적으로 대량생산되고 있으며 수요도 점점 증가하는 추세에 있다[13-14]. 저자들은 이미 *Aureobasidium pullulans* 기원의 fructosyltransferase를 이용하여 설탕으로부터 fructooligosaccharides 생산에 관한 제조 공정, 효소화학적 특성 등에 관해 보고하였고[15-18], fructooligosaccharides의 함량을 증가시키기 위한 방법으로 glucose isomerase, glucose oxidase 등의 혼합효소계, 그리고 chromatography에 의한 분리 정제방법을 적용한 바 있다[19-22]. 이러한 방법들 중에서 glucose oxidase와 fructosyltransferase의 혼합효소계가 고함량 fructooligosaccharides의 생산에 가장 효과적이었는데, 실제로 혼합효소계에 의해 98% 순도의 제품생산이 가능하였다[20, 21]. 이 공정은 반응 중에 30%(w/w) 정도로 생성되어 fructosyltransferase의 저해제로 작용하는 포도당을 glucose oxidase에 의해 완전히 제거해 줌으로써 fructooligosaccharides의 함량을 증가시키는 방법이다. 제품의 높은 순도와 공정의 scale-up이 비교적 쉬운 장점이 있지만 이 공정은 glucose oxidase 반응에 의해 부산물로 생성되는 gluconic acid 및 과산화 수소의 제거에 필요한 별도의 정제과정이 부가될 뿐 아니라, 제거된 포도당으로 인한 수율감소 등의 문제점이 있다. 따라서 저자들은 amyloglucosidase의 전이반응 활성을 이용하여 포도당을 올리고당류로 합성시키는 방법에 의해서 포도당에 의한 저해 현상을 낮추어 fructooligosaccharides의 전환률을 증가시키는 동시에, isomaltoligosaccharides와 fructooligosaccharides가 혼합된 새로운 조성의 올리고당의 생산을 시도하고자 하였다. 먼저 amyloglucosidase에 대한 기본적인 kinetics를 연구하는 과정에서 amyloglucosidase가 설탕을 기질로 이용하여 fructooligosaccharides를 합성한다는 매우 흥미로운 사실을 발견하게 되었다.

저자들은 전보[23]에서 amyloglucosidase에 의한 설탕으로부터 fructooligosaccharides 생산에서 설탕농도, 효소사용량, 반응온도 및 pH 등을 최적화한 결과, fructooligosaccharides 합성에 가장 좋은 반응조건은 설탕 농도 500-800 g/l, 반응온도 55°C, pH 5.5, 그리고 효소 농도는 설탕 그램당 24 units인 것을 밝힌 바 있다.

본 연구에서는 amyloglucosidase에 의한 fructooligosaccharides의 생산반응 메카니즘을 규명함으로써 기존의 fructooligosaccharides 생산효소인 fructosyltransferase의 경우와 비교하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2-1. 시약

효소활성 측정 및 반응기질로 사용된 설탕은 식품등급(제일제당)을 사용하였으며 그 이외의 시약들은 일반 시약등급을 사용하였다.

### 2-2. 효소

Amyloglucosidase는 NOVO사에 생산된 *Aspergillus niger* 기원의 AMG 400 L(Type Lo-prot)을 별도의 정제과정 없이 사용하였다.

### 2-3. 효소 활성의 측정

Amyloglucosidase의 올리고당 합성활성(transfructosylating activity)은 이 효소의 주 기능인 가수분해 활성의 측정방법과는 다른 조건에서 측정하였다. 즉, 800 g/l sucrose 7.5 ml, 0.1 M citrate buffer 2.3 ml, 효소액 0.2 ml의 혼합용액을 55°C에서 60분간 반응시키고 100°C에서 10분간 실활시킨 후 HPLC를 이용하여 생성된 GF<sub>2</sub>(G, glucose; F, fructose)를 정량하였다. 1분간 1 μmole의 GF<sub>2</sub>를 생성하는데 필요한 효소의 양을 1 unit로 정의하였다.

### 2-4. 반응물의 분석

모든 당류의 분석은 Aminex HPX-42C(300 mm×7.8 mm, BIO-Rad, USA) column이 장착된 HPLC(Varian, USA)를 사용하였으며, detector로는 RI-4 refractive index detector, 이동상으로 초순수(18 megaohm/cm)를 사용(1 ml/min)하였으며 column 온도는 85°C로 일정하게 유지해 주었다.

### 2-5. 효소반응실험

특별한 설명이 없는한, 효소반응은 반응기질 50 ml와 기질 그램당 24 units의 효소를 함유한 250 ml 플라스크를 이용하여 진탕수조에서 pH 5.5, 온도 55°C의 조건에서 25시간 동안 수행하였다.

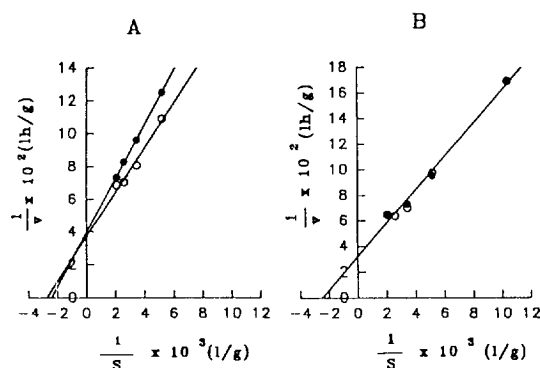
### 2-6. 효소 동력학적 인자의 결정

효소의 동력학적 인자는 100-500 g/l 농도범위의 기질 8 ml에 효소용액 0.4 ml(pH 5.5)를 첨가하여 1시간 동안 반응하고 100°C에서 10분간 효소를 실활시킨 후, HPLC로 GF<sub>2</sub> 생성량을 정량하여 초기 반응속도를 구한 다음 Lineweaver-Burk plot을 이용하여 결정하였다. 저해상수 결정의 경우는 glucose 또는 fructose를 각각 40 g/l가 되게 첨가한 후 동일한 방법으로 측정하였다. GF<sub>2</sub>에 대한 값들은 설탕에 대한 값들과 fructosyltransferase

**Table 1. Comparison of kinetic parameters of amyloglucosidase with those of fructosyltransferase in the production of fructooligosaccharides\***

Substrates	$K_m$ (g/l)		$V_{max}$ (g/lh)		$K_f$ (g/l)	
	FT	AMG	FT	AMG	FT	AMG
Sucrose	330	340	130	65	-	-
Glucose	-	-	-	-	30	87
GF <sub>2</sub>	750	770	30	25	-	-

\*Reactions were carried out carried with 64 units of enzyme for 1 hr at 55°C and pH 5.5; FT and AMG refer to fructosyltransferase and amyloglucosidase, respectively.



**Fig. 1. Lineweaver-Burk plots of enzyme reaction rates using sucrose as a substrate with and without glucose or fructose.**

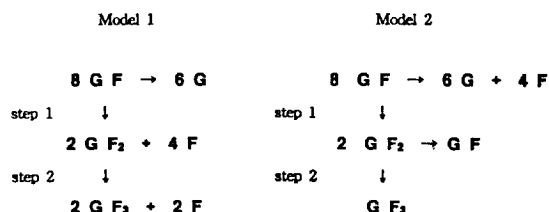
(A)(○) without glucose, (●) 40 g/l glucose supplemented; (B)(○) without fructose, (●) 40 g/l fructose supplemented.

rase의 경우를 고려하여 그 값을 예측하였다. 또한 GF<sub>2</sub> 및 GF<sub>3</sub>에 의한 효소반응 저해정도는 fructosyltransferase의 경우와 같이 무시하였다[18].

### 3. 결과 및 고찰

#### 3-1. Amyloglucosidase의 효소 동력학적 특성

Amyloglucosidase의 두 가지 기질에 대한 동력학적 인자들을 Table 1에 나타내었다. Fructosyltransferase의 경우와 비교하여  $K_m$  및  $K_f$ 는 큰 값을 나타내었고  $V_{max}$  값들은 작게 나타났다. 한편 glucose와는 달리 fructose의 경우는 fructooligosaccharides 생산반응에서 반응속도를 증가시키거나 감소시키지 않았다(Fig. 1B). 이런 점들은 기존의 fructooligosaccharides 생산효소인 fructosyltransferase와 매우 유사한 특성이다[18].



**Fig. 2. Proposed models of reaction mechanism for the production of fructooligosaccharides by an amyloglucosidase.**

#### 3-2. 효소반응 메커니즘에 대한 수학적 모델

Fructosyltransferase에 의한 실험으로부터 fructooligosaccharides의 생성 메커니즘은 Jung 등[18]에 의해 규명된 바 있는데, 이 효소는  $2\text{GF}_n \rightarrow \text{GF}_{n-1} + \text{GF}_{n+1}$ 과 같은 일종의 disproportionation 반응 메커니즘에 따라 fructooligosaccharides를 생성한다고 밝혀져 있다. 이 반응속도식은 고정화 효소계 뿐 아니라 glucose isomerase, glucose oxidase 등과의 혼합효소계 중에서도 fructosyltransferase 반응메커니즘을 표현하는데까지 적용된 바 있다[17, 19, 24]. Amyloglucosidase에 의한 fructooligosaccharides의 생성메커니즘은 fructosyltransferase의 경우와는 달리 반응 중에 고농도의 fructose가 생성된 실험결과로부터 초기 설탕 농도를 8 M으로 가정하여 Fig. 2와 같은 두 가지 모델을 생각할 수 있다. 두 모델은 fructose의 생성메커니즘에서 서로 차이를 보이는데, 먼저 Model 1은 효소의 최초 기질인 설탕으로부터 fructose가 생성되고 생성된 fructose는 다시 fructose unit의 donor로 작용, 생성물인 GF<sub>2</sub>와 결합하여 GF<sub>3</sub>를 생성하는 메커니즘이다. 이 모델의 타당성은 GF<sub>2</sub> 또는 GF<sub>3</sub>를 fructose와 함께 반응시켜 그 생성물을 분석하는 방법에 의해 간단히 검증할 수 있었다. 효소반응 결과 Model 1의 step 2 반응은 일어나지 않았다. 한편 Model 2의 경우에 대해 반응 속도식을 전개하면 다음의 식 (1)-(5)가 된다.

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{V_m S}{[K_m S + S + (K_m S / K_G) G]} + \frac{1 \times 342}{2 \times 504} \times \frac{V_m K}{(K_m K + K)} \quad (1)$$

$$\frac{dK}{dt} = \frac{2 \times 504}{8 \times 342} \times \frac{V_m S}{[K_m S + S + (K_m S / K_G) G]} - \frac{V_m K}{(K_m K + K)} \quad (2)$$

$$\frac{dN}{dt} = \frac{1 \times 666}{2 \times 504} \times \frac{V_m K}{(K_m K + K)} \quad (3)$$

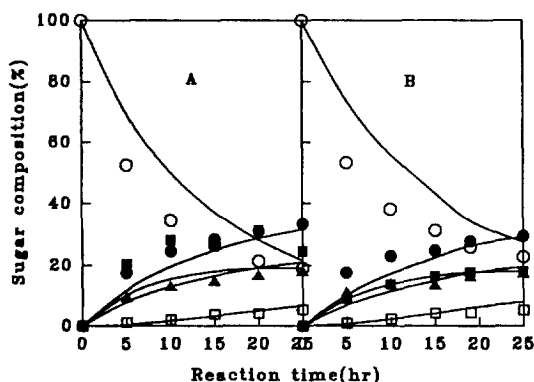


Fig. 3. Comparison of experimental data with the mathematical model at 55°C and pH 5.5.

(A) 558 g/l, (B) 727 g/l sucrose, (○) sucrose, (●) glucose, (▲) fructose, (■) GF<sub>2</sub>, (□) GF<sub>3</sub>, (—) model prediction.

$$\frac{dG}{dt} = \frac{6 \times 180}{8 \times 342} \times \frac{V_{mS}S}{[K_{mS} + S + (K_{mS}/K_{iG})G]} \quad (4)$$

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

여기서 342, 504, 666은 각각 설탕, GF<sub>2</sub> 및 GF<sub>3</sub>의 분자량이다.

### 3-3. 모델의 검증

제안된 모델의 타당성을 검토하기 위하여 임의의 두 설탕농도(558, 727 g/l)에 대한 실제 효소 반응결과와 비교하였다. 이미 전보[23]에서 400 g/l 이하의 저농도 설탕을 기질로 이용할 경우 amyloglucosidase는 fructooligosaccharides 합성활성을 거의 나타내지 않는 것이 확인되었기 때문에 500 g/l 이상의 설탕농도에 대해 모델의 검증 실험을 하였다. Fig. 3에서 보여주는 바와 같이, 실험치와 모델로부터의 모사값은 설탕과 GF<sub>2</sub>의 경우 다소의 data scattering이 있었으나 전체적으로 잘 일치하였다.

## 4. 결 론

전분 dextrin의 당화 효소로 잘 알려져 있는 amyloglucosidase를 이용하여 설탕으로부터 fructooligosaccharides 생성 메카니즘을 규명하기 위하여 수학적 모델을 제안하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

(1) Amyloglucosidase에 의한 fructooligosaccharides 생산 메카니즘은 기존의 fructosyltransferase와 매우 유사하나 반응 초기 단계에서 fructose가 고농도로 축적

되는 점이 서로 다르다.

(2) Amyloglucosidase의 동력학적 인자 중에서  $K_m$  및  $V_{max}$  값들은 fructosyltransferase에 비해 낮았으나, glucose의 저해상수값은 크게 나타났고 다른 반응 부산물인 fructose는 반응 속도에 영향을 미치지 않았다.

## 사용기호

- F : fructose concentration [g/l]
- G : glucose concentration [g/l]
- K : 1-kestose(GF<sub>2</sub>) concentration [g/l]
- $K_{iG}$  : competitive inhibition constant for glucose [g/l]
- $K_{mG}$  : Michaelis constant for glucose [g/l]
- $K_{mK}$  : Michaelis constant for 1-kestose [g/l]
- $K_{mS}$  : Michaelis constant for sucrose [g/l]
- N : nystose(GF<sub>3</sub>) concentration [g/l]
- S : sucrose concentration [g/l]
- t : time [h]
- $V_{mK}$  : maximum velocity for 1-kestose [g/l·h]
- $V_{mS}$  : maximum velocity for sucrose [g/l·h]

## 참고문헌

- Reilly, P. J.: Applied Biochemistry and Bioengineering(Wingard, L. B. et al., eds), Vol. 2, p. 185, Academic Press, Inc., New York(1979).
- Kennedy, J. F., Cabral, J. M. S. and Kalogerakis, B.: *Enzyme. Microb. Technol.*, **7**, 22(1985).
- Adachi, S., Udea, Y. and Hashimoto, K.: *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 121(1984).
- Shiraishi, F., Kawakami, K. and Kusunoki, K.: *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 498(1985).
- Beschkov, V., Marc, A. and Engasser, J. M.: *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 22(1984).
- Kuriki, T., Tsuda, M. and Imanaka, T.: *J. Ferment. Bioeng.*, **73**(3), 198(1992).
- Kuruki, T., Yanase, M., Takata, H., Takesada, Y., Imanaka, T. and Okada, S.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**(4), 953(1993).
- Hayashi, S., Itho, K., Nonoguchi, M., Takasaki, Y. and Imada, K.: *J. Ferment. Bioeng.*, **72**(1), 68(1991).
- Hidaka, H., Eida, T. and Saitoh, Y.: *Nippon Nogei-kagaku Kaishi*, **61**, 915(1987).
- Hidaka, H., Hirayama, M. and Sumi, N.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**(5), 1181(1988).
- McKellar, R. C. and Modler, H. W.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **31**, 537(1989).

12. Hidaka, H., Eida, T., Takizawa, T., Tokunaga, T. and Tashiro, Y.: *Bifidobacteria Microflora.*, **5**, 37 (1986).
13. 編集部: *Food Chemicals*(Japan), **Oct.**, 10(1989).
14. 編集部: *食品と開発*(Japan), **26**(10), 23(1990).
15. Yun, J. W., Jung, K. H., Oh, J. W. and Lee, J. H.: *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **24/25**, 299(1990).
16. Yun, J. W., Jung, K. H., Jeon, Y. J. and Lee, J. H.: *J. Microbiol. Biotechnol.*, **2**(2), 98(1992).
17. Yun, J. H., Jeon, Y. J., Lee, M. G. and Song, S. K.: *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **8**(3), 266(1993).
18. Jung, K. H., Yun, J. W., Kang, K. R., Lim, J. Y. and Lee, J. H.: *Enzyme Microb. Technol.*, **11**, 491(1989).
19. Yun, J. W., Noh, J. S., Lee, M. G. and Song, S. K.: *HWAHAK KONGHAK*, **31**(6), 846(1993).
20. Yun, J. W. and Song, S. K.: *Biotechnol. Lett.*, **15**(6), 573(1993).
21. Yun, J. W., Lee, M. G. and Song, S. K.: *J. Ferment. Bioeng.*, **77**(2), 159(1994).
22. Yun, J. W., Song, S. K., Han, J. H., Cho, Y. J. and Lee, J. H.: *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **9**(1), 35 (1994).
23. Yun, J. W., Noh, J. S., Song, S. J. and Song, S. K.: *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, In press(1994).
24. Yun, J. W., Choi, Y. C., Lee, M. G. and Song, S. K.: *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **9**(1), 40(1994).