

*Aureobasidium pullulans*의 포도당전이활성에 의한 맥아당으로부터 이소말토올리고당 생산의 속도론적 고찰 및 수학적 모델

윤종원 · 서정호 · 송승구[†]

부산대학교 화학공학과
(1994년 7월 13일 접수, 1994년 9월 2일 채택)

Kinetic Study and Mathematical Model for the Production of Isomalto-oligosaccharides from Maltose by Transglucosylation of *Aureobasidium pullulans*

Jong Won Yun, Jung Ho Suh and Seung Koo Song[†]

Department of Chemical Engineering, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea
(Received 13 July 1994; accepted 2 September 1994)

요 약

*Aureobasidium pullulans*의 포도당 전이활성에 의한 맥아당으로부터 이소말토올리고당 생산의 속도론을 통해 이소말토올리고당의 생성메카니즘을 제안하고 실험적으로 검증하였다. 이소말토올리고당의 생성반응은 반응초기에 맥아당으로부터 panose가 생성되고 포도당이 유리된 후, panose를 다시 기질로 이용하여 DP4 이소말토올리고당이 생성되었으며, 이 때 맥아당이 함께 유리되는 disproportionation 반응메카니즘을 따랐다($G_n + G_n \rightarrow G_{n-1} + G_{n+1}$). 맥아당을 기질로 효소반응을 수행하고 동력학적 인자를 산출한 결과, K_m , V_{max} 는 각각 154.5 g/l, 127.5 g/l·h로 나타났으며, 반응생성물인 panose와 포도당이 모두 경쟁적 저해제로 작용되었으며, 이 때 각각의 저해상수(K_{IG} , K_{IP})는 15.3 g/l, 9.8 g/l이었다. Panose에 대한 K_m , V_{max} 는 각각 55.6 g/l, 23.7 g/l·h이었으며, 이 경우에도 포도당이 경쟁적 저해제로 작용하였고 저해상수는 6.3 g/l이었다. 제안된 모델을 검증하기 위하여 임의의 두 기질농도, 300, 500 g/l 맥아당을 기질로 반응을 수행하여 수치모사 결과와 비교한 결과, 모든 반응 및 생성물들의 농도 profile이 서로 잘 일치하였다.

Abstract—A mathematical model for the production of isomalto-oligosaccharides from maltose by transglucosylation reaction of *Aureobasidium pullulans* was proposed based on the kinetic study, and the predicted values were compared with the experimental results for two maltose concentrations. The formation of isomalto-oligosaccharides occurred from a consecutive set of disproportionation reactions (viz. $G_n + G_n \rightarrow G_{n-1} + G_{n+1}$). The Michaelis-Menten constants for maltose and panose were 154.5 g/l and 55.6 g/l, respectively at 50°C. Competitive inhibition by glucose and panose was observed from kinetic analysis for the substrate maltose where the inhibition constants were 15.3 g/l, 9.8 g/l, respectively. In a similar manner, glucose was also proved a competitive inhibitor when panose was used as substrate, in which the inhibition constant was found to be 6.3 g/l. The predicted carbohydrate profiles of the proposed model gave good agreements with the experimental results.

1. 서 론

설탕 및 고과당 시럽(high fructose corn syrup) 등의 종래의 감미료는 최근 여러 가지 기능성을 나타내는 올리고당류가 개발되면서부터 감미료시장에서 새로운 국면을 맞게 되었다. 프락토올리고당[1-5], (이소)말토올리고당[6-7], 대두올리고당[8] 등의 올리고당류는 기존의 감미료가 갖고 있던 단점들을 극복하는 동시에 충치 예방[9], 장내 유용 세균의 증식[10], 저 칼로리성[11] 등의 여러 가지 유용한 장점(기능성)을 지니고 있기 때문에 새로운 식품소재로서 관심이 증가하고 있고 실제로 상업적으로 대량 생산되어 광범위하게 이용되고 있다. 특히 이소말토올리고당(isomalto-oligosaccharides, IMO)은 전분으로부터 생산되므로(상업적 공정), 올리고당류 중에서 가장 제조 가격이 저렴하여 말토올리고당과 함께 일본의 올리고당 시장에서 가장 큰 수요를 형성하고 있다[12]. IMO는 그 명칭을 볼 때, glucose 분자들이 α -1,6 결합을 이루고 있는 isomaltotriose, isomaltotetraose 등의 올리고당류를 총칭하는 것이지만, 실제로는 이당류인 isomaltose 뿐만 아니라 α -1,6 결합과 α -1,4 결합으로 이루어져 있는 panose, isopanose 또는 그 계열의 올리고당류를 모두 포함시키는 것이 일반적이다[6-7]. IMO의 제조 공정은 다음과 같이 크게 3가지로 나눌 수 있다. 첫째, 전분에 α -amylase, (neo)pullulanase, α -glucosidase 등의 전분 분해효소를 작용시켜 제조하는 방법[13], 둘째, 맥아당에 α -glucosyltransferase를 작용시켜 생산하는 방법[14], 셋째, pullulan을 원료로 pullulan 분해효소를 이용하여 생산하는 공정이 보고되어 있다[15]. 최근 Kuriki 등[15, 16]은 전분의 α -1,6 및 α -1,4 결합을 동시에 분해할 뿐 아니라, 분해된 당류로부터 α -1,6 및 α -1,4 결합의 올리고당을 합성할 수 있는 새로운 neopullulanase를 이용하여 기존의 공정에 비해 수율이 향상된 공정을 개발하는 등 새로운 기술개발이 계속 진행되고 있다.

본 연구에서 사용한 불완전 곰팡이류의 일종인 *A. pullulans*는 배양조건, 특히 탄소원의 종류에 따라 induction되는 효소의 종류가 다르다. 설탕을 탄소원으로 배양할 경우, 설탕으로부터 프락토올리고당을 합성하는 과당전이활성 효소(fructosyltransferase)를 분비하기도 하고, 맥아당배지에서 배양할 경우, 맥아당으로부터 IMO를 합성하는 포도당전이활성(transglucosylation)효소를 분비한다는 사실을 발견한 바 있다[17, 18].

IMO의 생성메카니즘에 대한 연구는 amyloglucosidase에 의해 포도당으로부터 역합성되는 경우에 대해서 몇몇 연구자들에 의해 보고된 바 있으나[19-21], 맥아당을 기질로하여 포도당전이활성에 의해 합성되는 경

우에 대한 메카니즘은 지금까지 보고된 바가 없다.

본 연구에서는 *A. pullulans* 균체로부터 추출된 효소의 포도당전이활성을 이용한 맥아당으로부터 IMO 생산의 속도론을 고찰하고 수학적 모델을 제안함으로써 IMO의 생성메카니즘을 규명하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2-1. 시약

효소반응의 기질 및 HPLC 분석의 표준물질로 사용한 maltose, isomaltose, maltotriose, isomaltotriose, panose 등은 Sigma Chemical Co.의 특급 시약을 사용하였고, 그 이외의 시약들은 일반 시약급을 사용하였다.

2-2. 미생물 배양

Aureobasidium pullulans KFCC 10245를 0.7%(w/v) sucrose, 8% 맥아당, 0.3% yeast extract, 0.3% K_2HPO_4 , 0.2% KCl, 0.2% $MgSO_4$ 의 배지 50 ml가 함유된 250 ml flask를 이용하여 25°C에서 96시간 동안 배양한 다음, 원심분리(3000×g)하여 균체를 회수하였다.

2-3. 효소

효소액을 얻기 위하여 회수된 균체를 증류수로 2회 세척하여 적정농도로 현탁시킨 후 lysozyme인 Kitalase (Kumiai-kagaku, 일본)를 2%(w/v) 농도로 첨가하여 45°C에서 90분간 반응시킨 후 여과하였다. 여과액을 투석(MWCO 12,000-14,000 membrane tube, Spectrum medical Ind., Inc., 미국)시키고, 막(Centriprep-30 concentrator, Amicon, 미국)을 이용하여 농축한 다음 효소용액(crude enzyme solution)으로 사용하였다.

2-4. 효소활성의 측정

500 g/l 맥아당 6.5 ml, 0.1 M citrate buffer(pH 5.5) 2.3 ml, 효소액 1 ml의 혼합용액을 50°C에서 60분간 반응시키고 100°C에서 10분간 실활시킨 후, HPLC를 이용하여 생성된 panose의 양을 정량하였다. 1분간 1 μ mole의 panose를 생성하는데 필요한 효소의 양을 1 unit로 정의하였다.

2-5. 반응 생성물의 분석

모든 당류의 분석은 Aminex HPX-42C(300 mm×7.8 mm, Bio-Rad, 미국)칼럼이 장착된 HPLC(Varian, 미국)를 사용하였으며, 검출기는 RI-4 refractive index detector, 이동상으로 초순수(18 megaohm/cm)를 사용하였고(0.6 ml/min), 컬럼 온도는 85°C로 일정하게 유지해주었다.

Table 1. Kinetic analysis for model description

Substrate	Concentration of reaction products(g/l)		Molar ratio G_{n+1}/G_{n-1}
	G_{n+1}	G_{n-1}	
Glucose(G)			
200 g/l	0	0	-
Maltose(GG)			
200 g/l	6.17	2.27	0.97
300 g/l	9.25	2.82	1.17
500 g/l	15.08	5.23	1.03
Panose(G ₃)			
50 g/l	4.38	2.30	0.98
100 g/l	8.24	3.78	1.12
200 g/l	11.21	5.48	1.05

2-6. 반응속도론 실험

맥아당에 대한 동력학적 인자(kinetic parameters)를 결정하기 위하여 83-333 g/l 농도범위의 맥아당 250 μ l, 효소액 50 μ l(864 unit/ml, 0.1 M citrate buffer)를 Eppendorf tube에 넣고 50°C 에서 반응속도가 선형적으로 증가하는 범위인 10분동안 반응시켜 초기 반응속도를 구하였다. 주 반응생성물인 panose 또는 포도당에 의한 효소반응 저해현상을 고찰하기 위하여, 전술한 바와 같이 맥아당에 포도당 또는 panose를 각각 33 g/l 농도가 되게 첨가하여 반응속도를 비교하였다. Panose에 대한 동력학적 인자의 결정 실험에서는 8-33 g/l 농도범위의 panose 250 μ l, 효소액 50 μ l을 사용하였으며, 33 g/l의 포도당을 첨가하여 저해정도를 관찰하였다. 모든 반응 속도는 초기기질의 감소속도를 측정하였고, Lineweaver-Burk plot을 통해 여러 가지 동력학적 인자들을 구하였다.

2-7. 모델의 검증

특별한 설명이 없는 한, 효소반응은 맥아당 50 ml와 효소액 10 ml를 함유한 250 ml 플라스크를 이용하여 진탕수조에서 pH 5.5, 온도 50°C 의 조건으로 25시간 동안 수행하였다. 모델의 검증을 위한 수치모사에서는 BASIC language를 사용하여 연립미분방정식의 해를 구하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 속도론 해석

IMO 생성반응 메커니즘의 모델을 전개하기 위하여, 여러 가지 기질에 대해 순간반응(10분 이내)을 진행시키고 반응 생성물을 HPLC로 분석하여 생성물들의 몰비

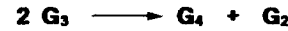
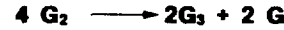


Fig. 1. Proposed reaction mechanism for the production of isomalto-oligosaccharides from maltose by trans-glucosylation activity of *A. pullulans*. G, G₂, G₃ and G₄ indicate glucose, maltose, panose and DP4 isomalto-oligosaccharides, respectively.

(molar ratio)를 비교하여 Table 1에 나타내었다. Fig. 1에 도식한 메카니즘은 초기기질인 맥아당으로부터 panose와 포도당이 등몰로 생성되고, 생성된 panose로부터 중합도 4(DP4) IMO와 맥아당이 등몰로 생성되었다. 한편 역반응을 확인하기 위하여 등몰의 panose와 포도당의 혼합액을 기질로 순간반응시킨 결과 맥아당은 유리되지 않았고, 포도당을 기질로 반응시켰을 때 반응 생성물은 나타나지 않았다. 종합하면, IMO 생성반응은 반응 첫 단계에서 맥아당으로부터 panose와 포도당이 등몰로 생성되고(4G₂→2G₃+2G), 다음 단계에서 panose로부터 DP4 IMO(G₁→6G₁→4G₁→4G 또는 G₁→6G₁→4G₁→6G 등의 panose derived oligosaccharides: G는 glucosyl unit이고, 1, 4, 6은 각각 glucopyranose ring에서의 결합위치)와 맥아당이 생성되는(2G₃→G₄+G₂) disproportionation 형태의 반응메카니즘(2G_n→G_{n-1}+G_{n+1})을 따르는 것으로 가정하여 모델을 전개하였다. 역반응 확인실험결과를 근거로 전체모델식에서 역반응은 고려하지 않았다. Table 1의 속도론 자료에서 반응생성물들의 몰비(G_{n+1}/G_{n-1})가 사용된 기질의 농도에 관계없이 거의 1로 나타난 것을 볼 때, 본 연구에서 사용한 효소용액은 가수분해효소(maltase 등) 활성이 무시할 정도로 작아 포도당전이활성 연구재료로 적합하였음을 알 수 있었다.

3-2. 모델의 전개

Fig. 1에서처럼 제안된 메카니즘에 따라 반응속도식을 전개하면 다음의 식 (1)-(4)가 된다(초기 기질인 맥아당 농도를 4 M로 가정).

$$\frac{dM}{dt} = -\frac{V_{max}M}{M + K_{mM}(1 + G/K_{IG} + P/K_{IP})} + \frac{342}{2 \times 504}$$

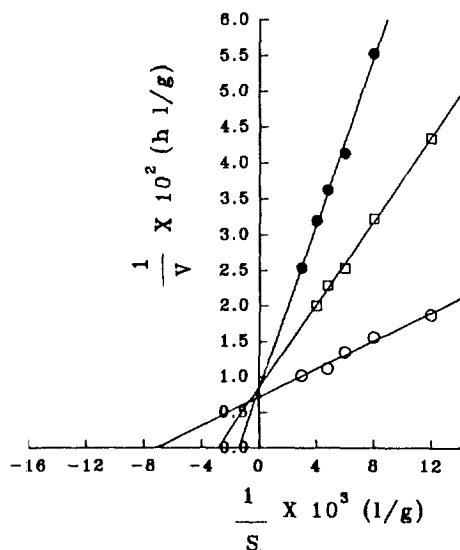


Fig. 2. Lineweaver-Burk plot showing the effect of glucose and panose on the transglucosylation activity of *Aureobasidium pullulans*: (○) maltose substrate, (□) maltose substrate supplemented by 8.5 g/l panose, (●) maltose substrate supplemented by 33 g/l glucose.

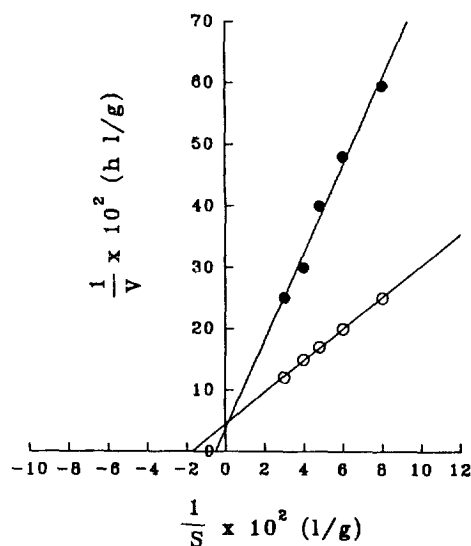


Fig. 3. Lineweaver-Burk plot showing the effect of glucose on the transglucosylation activity of *Aureobasidium pullulans*: (○) panose substrate, (●) panose substrate supplemented by 33 g/l glucose.

Table 2. Kinetic parameters for maltose and panose

Substrate	K_m (g/l)	V_{max} (g/l·h)	K_{IG} (g/l)	K_{IP} (g/l)
Maltose	154.5	127.5	15.3	9.8
Panose	55.6	23.7	6.3	-

$$\times \frac{V_{max}P}{P + K_mP(1 + G/K_{IGP})} \quad (1)$$

$$\frac{dP}{dt} = \frac{2 \times 504}{4 \times 342} \times \frac{V_{maxM} \times M}{M + K_mM(1 + G/K_{IG} + P/K_{IP})} - \frac{V_{maxP} \times P}{P + K_mP(1 + G/K_{IGP})} \quad (2)$$

$$\frac{dG_a}{dt} = \frac{666}{2 \times 504} \times \frac{V_{maxP} \times P}{P + K_mP(1 + G/K_{IGP})} \quad (3)$$

$$\frac{dG}{dt} = \frac{2 \times 180}{4 \times 342} \times \frac{V_{maxM} \times M}{M + K_mM(1 + G/K_{IG} + P/K_{IP})} \quad (4)$$

여기서 180, 342, 504, 666은 각각 포도당, 맥아당, panose, 그리고 DP4 IMO의 분자량이다. 맥아당에 대한 속도식[식 (1)]에서는 생성물인 포도당과 panose의 경쟁적 저해항(G/K_{IG} , P/K_{IP})을 각각 반영하였고, panose에 대한 속도식[식 (2)]에서는 포도당에 의한 경쟁적

저해항(K_{IGP})을 반영하였다. 한편 기질저해현상(substrate inhibition)은 실험농도범위인 83-333 g/l에서는 나타나지 않았으므로 모델식에 반영하지 않았다.

3-3. 동력학적 인자의 결정

제안된 모델식에 대한 수치해를 구하기 위하여 먼저 Michaelis-Menten 상수(K_m), 최대반응속도값(V_{max})을 두 가지 기질(맥아당, panose)에 대해 각각 구하였다. Fig. 2는 IMO 생성반응에서 초기기질인 맥아당을 기질로 효소반응시켰을 때, 주요한 두 가지 반응생성물인 포도당과 panose를 각각 첨가하였을 경우 반응속도에 미치는 영향을 보여주는 Lineweaver-Burk plot이다. 포도당과 panose를 맥아당 기질에 각각 33 g/l 첨가하였을 때 모두 경쟁적 저해제(competitive inhibitor)로 작용되었음을 알 수 있었다. Fig. 2로부터 구한 맥아당에 대한 K_m , V_{max} , 그리고 포도당 및 panose에 의한 저해상수 K_{IG} , K_{IP} 를 각각 구하여 Table 2에 정리하였다. 한편 IMO의 생성반응에서는 panose를 기질로 이용하여 DP4 IMO가 생성되는데, 이 과정의 속도론을 고찰하기 위하여 panose를 초기기질로 사용하고 포도당을 역시 33 g/l 첨가하여 반응속도를 비교한 결과, 맥아당을 초기기질로 이용한 경우와 마찬가지로 포도당이 이 반응에서도 경쟁적 저해제로 작용하였음을 알 수 있었고(Fig. 3), 이로부터 panose에 대한 동력학적 인자들을 각각

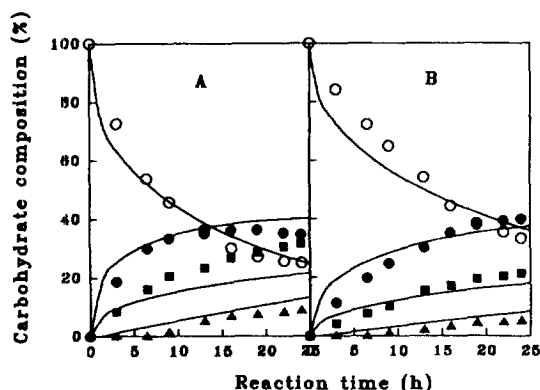


Fig. 4. Comparison of the carbohydrate composition of isomalto-oligosaccharides produced by transglucosylation activity of *Aureobasidium pullulans* between the experimental and the predicted values: (A) 300 g/l maltose as an initial substrate, (B) 500 g/l maltose as an initial substrate; (○) maltose, (●) panose, (■) glucose, (▲) DP4 isomalto-oligosaccharides, (—) model predictions.

구하였다(Table 2).

3-4. 모델의 검증

제안된 모델을 검증하기 위하여 임의의 두 맥아당농도, 300 g/l 및 500 g/l에 대하여 효소반응을 수행하고 제안된 모델에 대한 수치해와 비교하였다. Fig. 4는 효소반응 중의 반응 및 생성물들의 조성(전체반응 및 생성물에 대한 백분율)을 실험치와 수치모사값을 비교하여 나타난 것인데, 거의 모든 성분에 대하여 서로 잘 일치함을 보여줌으로써 본 연구에서 제안된 IMO 생성 메카니즘의 타당성을 확인할 수 있었다.

Jung 등[22]은 본 연구에서와 동일한 미생물 기원의 과당전이효소(fructosyltransferase, EC. 2.4.1.9)에 의한 설탕으로부터 프락토올리고당(fructo-oligosaccharides)의 생성 메카니즘을 규명한 바 있는데, 이 경우도 IMO 생성반응의 경우와 마찬가지로 disproportionation 형태의 반응메카니즘($GF_n + GF_n \rightarrow GF_{n-1} + GF_{n+1}$; G, glucose; F, fructose)에 의해 생성된다고 보고한 바 있다.

4. 결 론

*Aureobasidium pullulans*의 포도당전이활성 효소를 이용하여 맥아당으로부터 이소말토올리고당 생성반응의 속도론 연구를 통하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

(1) 속도론 해석결과, 맥아당을 기질로 이용할 경우, 반응생성물인 panose와 포도당이 모두 경쟁적 저해제로

작용되었고, panose의 경우에도 포도당이 경쟁적 저해제로 작용하였다.

(2) 이소말토올리고당의 생성반응은 disproportionation 형태의 반응메카니즘($G_n + G_n \rightarrow G_{n-1} + G_{n+1}$)에 따라 panose와 중합도 4의 이소말토올리고당이 생성되었다.

(3) 임의의 두 맥아당 농도 300, 500 g/l에 대해 모델검증 실험을 수행한 결과, 모든 반응 및 생성물들의 농도 profile이 수치모사 결과와 잘 일치하였다.

사용기호

- G : concentration of glucose [g/l]
- G_4 : concentration of isomaltooligosaccharides of DP 4 [g/l]
- K_{IG} : competitive inhibition constant of glucose for maltose [g/l]
- K_{IGP} : competitive inhibition constant of glucose for panose [g/l]
- K_{IP} : competitive inhibition constant of panose [g/l]
- K_{mM} : michaelis constant for maltose [g/l]
- K_{mP} : michaelis constant for panose [g/l]
- M : concentration of maltose [g/l]
- P : concentration of panose [g/l]
- t : time [h]
- V_{maxM} : maximum reaction rate for maltose [g/l·h]
- V_{maxP} : maximum reaction rate for panose [g/l·h]

참고문헌

1. Hayashi, S., Itho, K., Nonoguchi, M., Takasaki, Y. and Imada, K.: *J. Ferment. Bioeng.*, **72**, 68(1991).
2. Adachi, S., Udea, Y. and Hashimoto, K.: *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 121(1984).
3. Hidaka, H., Hirayama, M. and Sumi, N.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1181(1988).
4. Yun, J. W., Jung, K. H., Oh, J. W. and Lee, J. H.: *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **24/25**, 299(1990).
5. Yun, J. W., Jung, K. H., Jeon, Y. J. and Lee, J. H.: *J. Microbiol. Biotechnol.*, **2**, 98(1992).
6. Kohmoto, T., Fukui, F., Takaku, H. and Mitsuoka, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 2157(1991).
7. Komoto, T., Fukui, F., Takaku, H., Machida, Y., Arai, M. and Mitsuoka, T.: *Bifidobacteria Microflora*, **7**, 61(1988).
8. Wada, K., Watanabe, J., Mizutani, J., Tomoda, M., Suzuki, H. and Saitoh, Y.: *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **66**, 127(1992).

9. ネオシュカ-研究會：第2回ネオシュカ-研究會報告書(Japanese)(1984).
10. Hidaka, H., Eida, T., Takizawa, T., Tokunaga, T. and Tashiro, Y.: *Bifidobacteria Microflora*, **5**, 37 (1986).
11. Oku, T., Tokunaga, T. and Hosoya, N.: *J. Nutr.*, **114**, 1574(1984).
12. Food Chemical(Japanese), Oct., p.21(1989).
13. Takaku, H.: Handbook of Amylase and Related Enzymes, p.215-217, The Amylase Research Society of Japan ed. Pergamon Press, Oxford(1988).
14. Ooshima, T., Fujiwara, T., Takei, T. and Izumitani, A.: *Microbiol. Immunol.*, **32**, 1093(1988).
15. Kuruki, T., Yanase, M., Takata, H., Takesada, Y., Imanaka, T. and Okada, S.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 953(1993).
16. Kuriki, T., Tsuda, M. and Imanaka, T.: *J. Ferment. Bioeng.*, **73**, 198(1992).
17. Yun, J. W., Lee, M. G. and Song, S. K.: *Biotechnol. Lett.*, **16**(4), 359(1994).
18. Yun, J. W., Noh, J. S., Song, J. Y. and Song, S. K.: *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **77**, 159(1994).
19. Meagher, M. M., Nikolov, Z. L. and Reilly, P. J.: *Biotechnol. Bioeng.*, **34**, 681(1989).
20. Nikolov, Z. L., Meagher, M. M. and Reilly, P. J.: *Biotechnol. Bioeng.*, **34**, 694(1989).
21. Beschkov, V., Marc, A. and Engasser, J. M.: *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 694(1984).
22. Jung, K. H., Yun, J. W., Kang, K. R., Lim, J. Y. and Lee, J. H.: *Enzyme Microb. Technol.*, **11**, 491(1989).