

Fructosyltransferase와 Glucose oxidase 혼합효소계를 이용한 고순도 Fructo-oligosaccharides 생산에서 반응 메카니즘에 대한 수학적 모델

윤 종 원 · 최 윤 찬 · *이 민 규 · 송 승 구

부산대학교 화학공학과

*제주대학교 화학공학과

Mathematical Model for the Production of High-purity Fructo-oligosaccharides by the Mixed-enzyme System of Fructosyltransferase and Glucose Oxidase

Jong Won Yun, Yoon Chan Choi, *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 690-120, Korea

ABSTRACT

A simplified mathematical model for the production of high-purity fructo-oligosaccharides by the mixed-enzyme system of fructosyl transferase and glucose oxidase was proposed and compared with the experimental results. The kinetic parameters including K_m , V_{max} and K_{iG} were estimated at 40 °C, in which K_m values decreased and K_{iG} and V_{max} values increased compared with those of fructosyl transferase alone. The kinetics of the mixed-enzyme system was successfully described in the form of Michaelis-Menten equations. At the reasonable sucrose concentrations tested, the simulated sugar profiles were of good agreement with the experimental ones.

서 론

설탕으로부터 생산되는 fructo-oligosaccharides는 Bifidus인자, 저칼로리성, 충치예방효과뿐만 아니라 그의 여러 가지 생리활성 기능으로 인해 최근 건강 식품 소재로서 그 수요가 증가하고 있는 매우 유망한 기능성 감미료이다(1, 2). Fructo-oligosaccharides는 아스파라거스의 뿌리나 다른 식물의 잎과 줄기 등에서도 생합성되지만(3, 4) 매우 미량이고, *Aspergillus niger* 또는 *Aureobasidium pullulans* 등의 미생물 기원의 효소(fructosyltransferase)를 고

농도 설탕에 작용시켜 생산하는 방법에 의해 공업적으로 대량 생산할 수 있게 되었다(5-9). 상업적으로 생산되고 있는 제품은 fructo-oligosaccharides 함량이 55~60% (w/w)에 불과하고, 미반응된 설탕 15%, 그리고 부산물인 포도당이 25~30% 정도 혼합되어 있는 시럽이다(10-14). 따라서 fructo-oligosaccharides의 기능적 장점을 순수하게 이용하기 위해서는 설탕과 포도당이 제거된 고순도 제품의 개발이 요구되게 되었는데, 최근 이에 대한 연구가 진행되고 있어 곧 고순도 제품이 상업화될 수 있을 것으로 기대된다.

Fructosyltransferase에 의해 설탕으로부터 fructo-oligosaccharides를 생산할 때의 전환율이 55~60% 수준에서 더 이상 증가되지 않는 것은 이 효소의 효소화학적 특성, 즉 반응부산물로 반응중에 계속 축적되는 포도당에 의한 저해현상 때문인 것으로 이미 알려져 있다(12). 따라서 고순도의 제품을 얻기 위한 방법으로 일본의 Meiji제과의 연구그룹(15)과 Yun 등(16)은 약산성 양이온 교환 수지(XT-1007) 및 강산성 양이온 교환 수지(SK-1BL)를 각각 이용한 chromatographic separation에 의해 fructo-oligosaccharides를 고순도로 분리하고자 하였다. 그러나 설탕과 포도당은 fructo-oligosaccharides와 흡착특성이 유사하여 효과적인 분리가 어렵고 scale up이 곤란한 단점을 안고 있다.

최근 Yun과 Song 등(17, 18)은 glucose oxidase와 fructosyltransferase를 동시에 fructo-oligosaccharides 생산에 적용한 혼합효소 반응계를 이용하여 98%의 고순도 제품을 개발할 수 있었다고 보고하였다. 혼합효소계를 이용한 결과, glucose oxidase에 의해 포도당이 완전히 제거됨으로써 효소 저해현상이 제거되었고 그 결과 설탕이 거의 모두 fructo-oligosaccharides로 전환되는 결과를 얻었다. 이 공정은 glucose oxidase 반응에 산소 공급을 필요로 하고 고농도 설탕(50% 이상)을 반응 기질로 이용할 수 없으며 반응 부산물인 gluconic acid를 제거하여야 하는 등의 단점을 안고 있으나, 고순도 fructo-oligosaccharides 생산을 위한 상업적 공정으로 충분히 응용 가능할 것으로 기대된다.

Fructosyltransferase와 glucose oxidase의 혼합효소계에 의한 고순도 fructo-oligosaccharides 생성 반응에서는 fructosyltransferase 단일효소계에 의해 생성되는 생성물의 조성과는 현저한 차이를 나타내었다(17, 18). 설탕으로부터 fructosyltransferase에 의한 fructo-oligosaccharides 생성 반응 메카니즘에 의하면(12), 초기 생성물인 1-kestose (GF_2)가 fructosyltransferase의 기질로 이용되고 nystose (GF_3)가 생성되며, 계속해서 GF_3 로부터 fructofuranosyl nystose (GF_4)가 생성된다. 따라서 반응액 중에 이들 생성물이 고농도로 유지되어 있으면 일정한 비율에 따라 그 이후의 생성물들이 연속적으로 생성될 것이다. 그러나 혼합효소계에 의해 생성된 fructo-oligosaccharides의 조성은 전보(17, 18)에서의 실험결과에서처럼 fructosyltransferase 단일 효소계의 kinetics와는 상이하게 1-kestose 및 nystose가 각각 43.6, 54.7%(w/w)로 매우 고농도

로 유지되었음에도 불구하고 fructofuranosyl nystose는 극미량(1% 미만)이 생성되었다. 이것은 혼합효소계에서는 단일 효소계에서와 서로 다른 kinetics에 의해 fructo-oligosaccharides가 생산되는 것으로 해석할 수 있다.

본 연구에서는 fructosyltransferase와 glucose oxidase 혼합 효소계에 의한 고순도 fructo-oligosaccharides 생산을 위한 회분식 반응공정에서 혼합효소계에 대한 수학적 모델을 제안함으로써 전술한 혼합효소계의 kinetics를 규명하고 혼합효소반응종의 반응경향을 예측해 보고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

모든 반응의 기질로 사용된 설탕은 상업적으로 시판되는 식품 등급을 사용하였으며, 그외의 시약은 특급시약을 사용하였다. Glucose oxidase의 반응에 사용된 산소는 순도 99.5%의 순수한 산소를 사용하였다.

효소

Fructosyltransferase는 *Aureobasidium pullulans* KFCC 10245를 종균배지(raw sugar 10g/l, yeast extract 2g/l; pH 5.2)에서 30°C에서 2일간 배양한 다음, 50ml의 배지(sucrose 200 g/l, yeast extract 10g/l, K_2HPO_4 5g/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g/l, $NaNO_3$ 10g/l; pH 6.0)가 함유된 250ml flask에 접종하여 30°C에서 5일간 배양하였다. 최종 효소의 활성은 cell 내 효소의 경우 50unit/ml, cell외 효소의 경우 30unit/ml 정도였다. 배양 완료된 *A. pullulans* broth를 원심분리하여 증류수로 2회 세척한 다음 20% (w/v) 농도로 현탁시키고, 효소를 추출하기 위해 lysozyme(EC.3.2.1.17)인 Kitalase(Kumiai kagaku, 일본)를 2% (w/v)농도가 되게 첨가한 다음 45°C에서 2시간 동안 반응시킨 후 규조토로 여과하여 효소용액을 제조하였다.

Glucose oxidase는 Sigma Chemical Co.에서 생산된 효소(*A. niger* 기원, 25000units/g)를 별도의 정제과정없이 0.1 M citrate buffer(pH 5.5)에 현탁하여 사용하였다.

효소 활성의 측정

Fructosyltransferase 활성은 전보(12)에서와 동일한 방법으로 측정하였고, 55°C에서 1분간 1 μ mole

의 glucose를 생성하는데 필요한 효소의 양을 1unit로 정의하였다.

Glucose oxidase 활성 측정을 위해서 2ℓ 규모의 반응기(BIOLAB, B. Braun, 독일)에 400g/ℓ glucose 0.7ℓ를 넣고 온도를 40℃로 유지한 후 1ml의 glucose oxidase 용액을 첨가한 다음 0.7ℓ/min 속도로 순수한 산소를 공급하면서 반응을 수행하였다. 이때 14% 암모니아수를 이용하여 반응중에 pH를 5.5로 제어해 주었고 교반속도는 550rpm로 유지하였다. 반응 30분 후 샘플을 채취하여 HPLC를 이용하여 glucose 소모량을 정량하고 1분간 1mole의 glucose를 산화시키는데 필요한 효소의 양을 1unit로 정의하였다(18).

혼합효소의 반응

특별한 설명이 없는 한 혼합효소의 반응은 2ℓ 반응기를 이용하여 다음과 같은 조건하에서 25시간 동안 수행하였다: 초기 설탕농도, 600g/ℓ; 교반속도, 550rpm; 산소 공급속도, 0.7ℓ/min(1vvm); 효소첨가량, 설탕 그램당 fructosyltransferase 및 glucose oxidase 각각 10units; 온도, 40℃; pH, 5.5.

반응물의 분석

모든 반응물(당류)의 분석은 Aminex HPX-42C (300mm×7.8mm, BIO-RAD, 미국) column이 장착된 HPLC(Varian, 미국)를 사용하였고, detector는 RI-4 refractive index detector(Varian), 이동상으로 초순수를 사용(1ml/min)하였으며 column은 85℃로 일정하게 유지해 주었다(18).

결과 및 고찰

Fructosyltransferase 및 Glucose oxidase 혼합효소계에 대한 수학적 모델

Jung과 Yun(12) 등은 *A. pullulans* 기원 fructosyltransferase의 효소반응 메커니즘을 통해 fructo-oligosaccharides의 생성은 반응기질인 sucrose로부터 초기에 1-kestose(GF₂: G, glucose; fructose)와 glucose가 생성되어(GF+GF→GF₂+G) glucose는 반응 중에 계속 축적되고, GF₂는 다시 fructosyltransferase의 기질로 이용되는 일종의 disproportionation 반응(GF_n+GF_n→GF_{n-1}+GF_{n+1})에 의해 fructo-oligosaccharides가 생성된다고 보고한 바 있다. 이 모델에 의하면 저해제인 glucose의 농도가 감소하거나 완전히 제거될 경우 fructo-

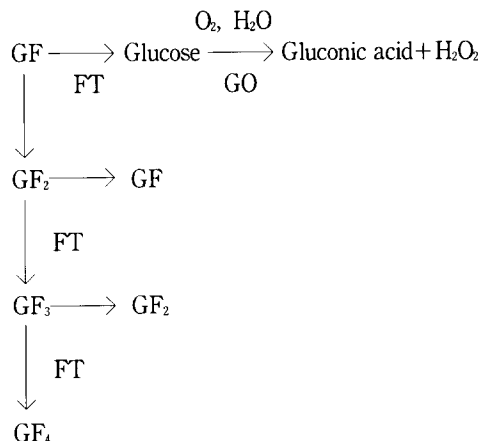


Fig 1. Proposed reaction scheme for the production of high-purity fructo-oligosaccharides by the mixed-enzyme system of fructosyltransferase and glucose oxidase: FT and GO refer to fructosyltransferase and glucose oxidase, respectively.

oligosaccharides 생성 속도가 증가하여 결국 최종 반응물 중의 fructo-oligosaccharides 함량이 증가하게 될 것이라는 것을 예측할 수 있다. 이러한 목적을 위해 산업적으로 적용 가능성이 있는 두 종류의 glucose 전환효소로는 glucose isomerase와 glucose oxidase를 들 수 있는데, 전자의 경우는 fructosyltransferase와 혼합효소계를 형성했을 때 효소 반응에서의 동력학적 인자가 변하게 되고, glucose isomerase의 가역반응성을 변화시키기 어려워 fructo-oligosaccharides의 전환율을 증가시킬 수 없었다(19). 그러나 glucose oxidase의 경우는 매우 효과적이어서 glucose를 완전히 제거하여 저해현상을 극복한 결과 98% 이상의 고순도 fructo-oligosaccharides의 생산이 가능하였다. Fructosyltransferase와 glucose oxidase의 혼합효소계에 대한 총괄 반응 속도식을 Fig. 1의 reaction network에 따라 전개하면 다음의 식(1)~(5)로 표현할 수 있다(초기 sucrose 농도를 8M로 가정).

여기서 180, 342, 504, 666, 828은 각각 glucose, sucrose, 1-kestose, nystose 및 fructo-furanosyl nystose의 분자량이다.

여기서 (8)식은 catalase가 충분량 존재할 때

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

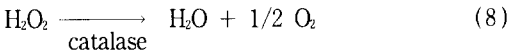
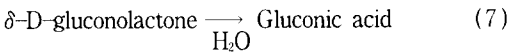
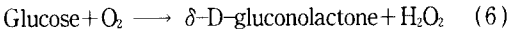
$$\frac{dK}{dt} = \frac{4 \times 504}{8 \times 342} \times \frac{V_{mS} \cdot S}{[K_{mS} + S + (K_{mS}/K_{iG})G]} - \frac{V_{mK} \cdot K}{(K_{mK} + K)} + \frac{504}{2 \times 666} \times \frac{V_{mN} \cdot N}{(K_{mN} + N)} \quad (2)$$

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

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

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

그리고 glucose oxidase에 의한 반응속도식은 다음의 식 (6)-(8)로 나타낼 수 있다.



glucose가 완전히 산화되는 반응속도식인데, 본 연구에서 사용한 혼합효소계에서는 catalase를 별도로 첨가하지 않고 glucose oxidase에 포함되어 있는 미량만이 이용되었으나 catalase의 specific activity는 다른 효소에 비해 대단히 높기 때문에 (8)식 반응을 무시할 수는 없다. 따라서 혼합효소계에서의 glucose oxidase의 주반응은 (6), (7)식에 의해 일어나고 (8)식의 반응이 부분적으로 일어난다고 할 수 있다.

많은 연구자들이 glucose oxidase에 대한 kinetics 표현에서 이 효소가 두 가지 반응기질(glucose, 산소)을 필요로 하는데도 불구하고 Michaelis-Menten 식을 이용하여 해석한 바 있다(20-24).

(5)식의 $-\frac{dG_{GO}}{dt}$, 즉 glucose oxidase에 의한 glucose의 감소 속도식은 다음의 3가지 Michaelis-Menten 식으로 나타낼 수 있다.

(1)중간 생성물 $\delta\text{-D-gluconolactone}$ 가 경쟁적 저해제로 작용하고, K_m , V_{max} 값이 반응액 중의 용존산소량에 비례하는 경우:

$$-\frac{dG_{GO}}{dt} = \frac{V_{mG}}{K_{mG}(1 + I/K_i) + G} = \frac{kOE_0G}{K_pO(1 + I/K_i) + G}$$

(2) 반응액 중의 glucose 농도에 비해 산소농도가 매우 낮지만 두 가지를 모두 반응기질로 고려한 two-substrate model을 적용할 경우:

$$-\frac{dG_{GO}}{dt} = \frac{kOE_0G}{OG + K_{mG}O(1 + I/K_i) = K_{mOG}}$$

(3) 생성된 H_2O_2 가 glucose oxidase 총괄 반응속도에 미치는 영향을 무시하고, (2), (3)의 조건을 모두 고려하지 않을 경우:

$$-\frac{dG_{GO}}{dt} = \frac{V_{mG}}{K_{mG} + G}$$

Gibson 등(25)은 $\delta\text{-D-gluconolactone}$ 의 저해 정도는 glucose oxidase의 kinetics에 거의 영향을 미치지 않을 정도로 매우 작다고 보고하였다. Cho 등(26)은 K_m , V_{max} 값이 모두 용존산소의 농도에 비례한다고 보고하였고, Hsieh 등(27)의 결과에서는 V_{max} 경우는 산소농도에 비례하나 K_m 는 무관하다고 보고하였다. 한편 Malikkides 등(28)은 생성된 H_2O_2 에 의해 glucose oxidase가 실활되는 정도를 측정할 결과 120시간 반응 후 초기 활성의 약 15% 정도가 실활되었다는 결과를 보고하였고, Tse 등(29)은 H_2O_2 에 의한 glucose oxidase의 실활 메커니즘을 여러 경우에 대해 정량적으로 해석하였다. 이들의 연구결과에 따르면, H_2O_2 의 영향은 75일 동안의 안정성 실험에서는 매우 크게 나타났으나 24시간 동안의 안정성은 거의 차이가 관찰되지 않았다고 보고하였다. 이상의 다른 연구자들의 연구결과와, 본 연구에서 산소의 순간 소모속도와 $\delta\text{-D-gluconolactone}$ 의 농도를 정량하기 어려운 점, 반응시간이 25시간으로 짧아 H_2O_2 에 의한 glucose oxidase의 실활 정도를 무시할 수 있는 점 등을 근거로 혼합효소계에서의 모델의 복잡성을 피하기 위하여 (3)항의 Michaelis-Menten 속도식을 적용하여 모델을 단순화하였다.

혼합 효소계에서의 동력학적 상수(K_m , V_{max} , K_{IG})

이미 전술한 바와 같이 fructosyltransferase와 glucose isomerase와의 혼합 효소계를 이용하여 fructo-oligosaccharides의 전환율을 증가시킬 수 없었던 이유가 혼합 효소계에서의 동력학적 상수값의 변화 때문임이 밝혀진 바 있는데 (19), 본 연구에서도 fructosyltransferase와 glucose oxidase 혼합 효소계에서 각각의 효소에 대한 동력학적 상수를 결정하였다. 먼저 fructosyltransferase에 대한 값은 혼합 효소반응에서와 동일한 조건(반응액 부피, 700ml; 온도, 40°C; pH, 5.5; 산소 공급속도, 700ml/min; 효소 사용량, fructosyltransferase 10units, glucose oxidase 10units)에서 초기 설탕농도를 변화시키면서 각각 30분간 반응시킨 후, 반응액을 HPLC로 분석하여 초기 반응속도를 결정하고 Lineweaver-Burk plot를 이용하여 kinetic parameter들을 결정하였다. 한편 glucose oxidase의 경우는 전술한 조건에서 설탕 대신 glucose를 반응기질로 사용하였고, glu-

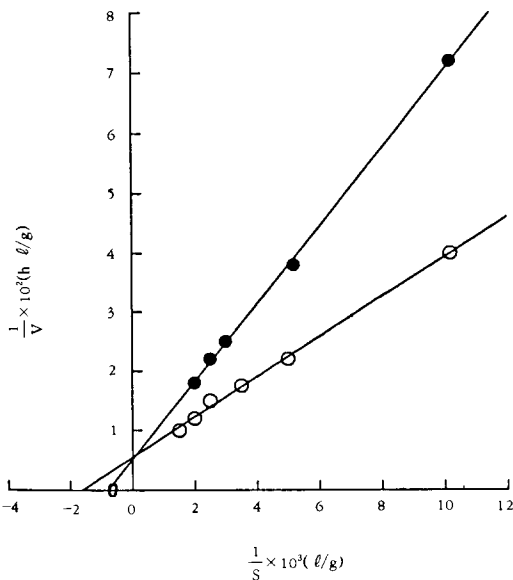


Fig 2. Lineweaver-burk plot for determining the kinetic parameters of fructosyltransferase in the mixed enzyme system of fructosyltransferase and glucose oxidase:10 units of fructosyltransferase and 10 units of glucose oxidase per gram sucrose, at 40°C; (○)without glucose, (●)40g/l of glucose was supplemented.

cose oxidase만으로 반응시켰다 (Fig. 2, 3). Table 1에서는 fructosyltransferase 단일 효소반응계에서와 혼합 효소계에서의 kinetic parameter 들을 서로 비교하였다. 반응온도와 효소 사용량이 서로 달라서 직접 비교할 수는 없으나, 여러 가지 기질에 대한 K_m , V_{max} , K_{IG} 값들이 모두 상이하게 나타났다. 이 결과는 전보(19)에서 보고한 glucose isomerase와의 혼합 효소계에서와는 다른 것을 알 수 있는데, glucose isomerase와의 혼합 효소계에서는 K_m 은 증가하였고 V_{max} 는 불변하였는데 비해, glucose oxidase와의 혼합 효소계에서는 K_m 은 감소하였고 V_{max} 는 증가하였다. 일반적으로 K_{IG} 가 증가할수록 효소반응에서의 저해현상 정도는 감소하는 것으로 알려져 있는데, 혼합 효소계에서의 fructosyltransferase에 대한 K_{IG} 값은 단일 효소계에서의 값 30g/l에 비해 다소 증가된 35g/l로 나타났다. 이런 결과로부터 혼합 효소계에 의해 고순도 fructo-oligosaccharides가 생성되는 것은 glucose에 의한 저해현상이 극복됨으로써 fructo-syltransferase의 transfructosylation 활성이 증가한 것과 glucose oxidase에 의해 glucose가 제거됨으로써 전체 fructo-oligosaccharides의 함량이 증가한 것이 주요한 원인으로 해석할 수 있

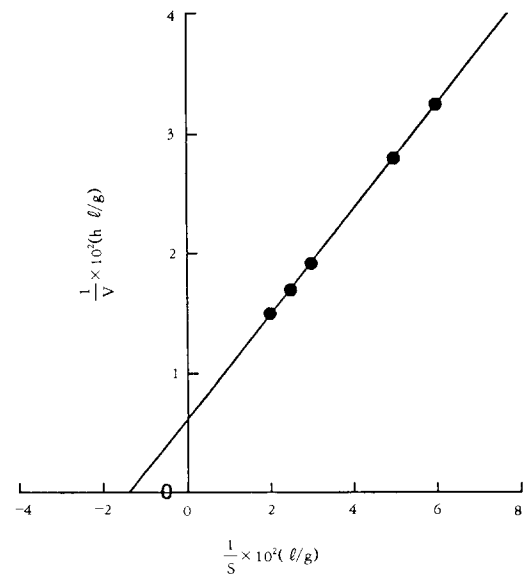


Fig 3. Lineweaver-burk plot for determining the kinetic parameters of glucose oxidase at 40°C:10 units of glucose oxidase per gram sucrose.

Table 1. Comparison of the kinetic parameters for fructosyltransferase alone with the mixed-enzyme system of fructosyltransferase and glucose oxidase in fructo-oligosaccharides production^{a)}.

Substrates	K _m (g/l)		V _{max} (g/l · h)		K _g (g/l)	
	FT	Mixed	FT	Mixed	FT	Mixed
Sucrose	330	300	130	170		
Glucose	—	72	—	15	30	35
1-kestose	750	690 ^{b)}	30	56 ^{b)}		
Nystose	850	835 ^{b)}	16	19 ^{b)}		

^{a)} The kinetic parameters for fructosyltransferase were cited from reference 12: FT and Mixed refer to the enzyme system of fructosyltransferase alone and the mixed-enzyme system of fructosyltransferase and glucose oxidase respectively.

^{b)} Predicted values.

었다.

모델의 검증

Fructo-oligosaccharides 생산에 있어서 중요한 인자 중의 하나는 반응기질인 설탕의 농도를 들 수 있는데, 이것은 생산성뿐만 아니라 농축공정 등의 downstream processing 비용에까지 직접 영향을 미치기 때문이다. 초기 설탕농도는 고농도일수록 유리하겠지만 고농도 당액(sugar solution)에서는 glucose oxidase 반응에 필요한 산소의 전달이 극히 제한되어 반응중에 산소의 농도가 매우 낮게 유지될 수밖에 없다. 이 결과 Fig. 4, 5에서 보여주는 바와 같이 400 및 500g/l 범위의 농도에서 90% 이상의 fructo-oligosaccharides 전환율(전체 반응물 중 fructo-oligosaccharides의 비율)이 가능하였으나 600g/l에서는 만족스러운 전환율을 얻을 수 없었다. 제안된 모델을 fructo-oligosaccharides 생산에 이상적인 설탕농도를 예측하는데 적용해 본 결과, 모델의 검증에 사용한 농도 범위, 즉 400, 500, 600g/l에 대해서 각 성분 당의 조성에 대한 실험치와 모델값이 대체로 잘 일치하였으나(Fig. 4-6), glucose의 경우는 실험치보다 모델치가 상당히 높게 나타났다. 이 결과는 모델식 중 glucose oxidation 반응속도식을 단순화하는 과정에서 나타난 오차로 판단된다. 또한 400, 500g/l에 대한 fructo-oligosaccharides의 총량(1-kestose, nystose)에 대해서도 실험치와 모델로부터 계산한 값이 서로 잘 일

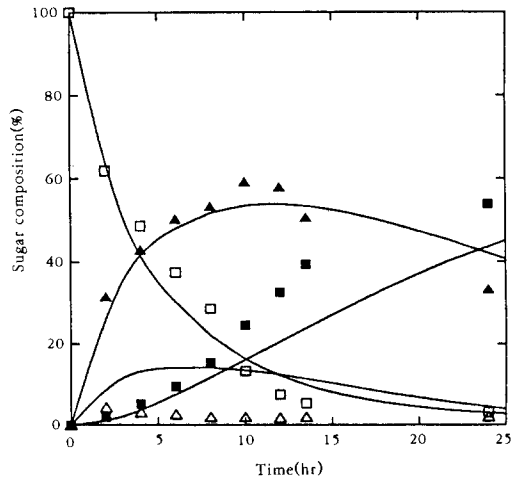


Fig 4. Sugar composition of the high-purity fructo-oligosaccharides by the mixed enzyme system of fructosyltransferase and glucose oxidase using 400g/l of sucrose as a substrate: (□) sucrose, (△) glucose, (▲) 1-kestose, (■) nystose, (—) model prediction

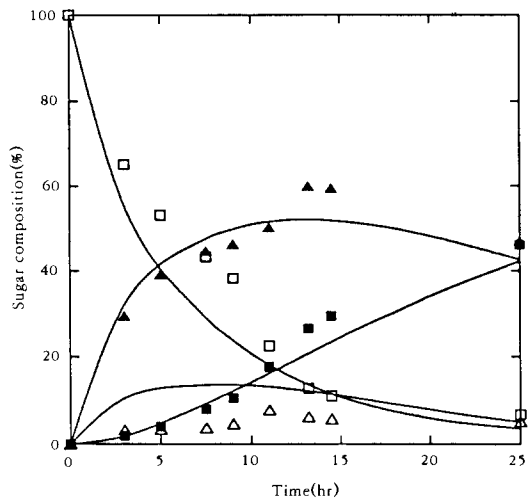


Fig 5. Sugar composition of the high-purity fructo-oligosaccharides by the mixed enzyme system of fructosyltransferase and glucose oxidase using 500g/l of sucrose as a substrate: (□) sucrose, (△) glucose, (▲) 1-kestose, (■) nystose, (—) model prediction

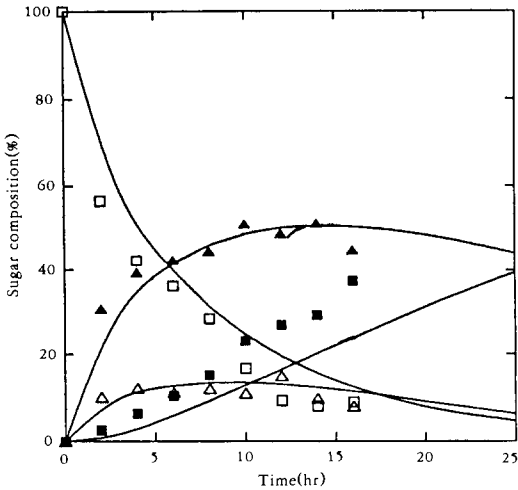


Fig 6. Sugar composition of the high-purity fructo-oligosaccharides by the mixed enzyme system of fructosyltransferase and glucose oxidase using 600g/l of sucrose as a substrate: (□) sucrose, (△) glucose, (▲) 1-kestose, (■) nystose, (—) model prediction.

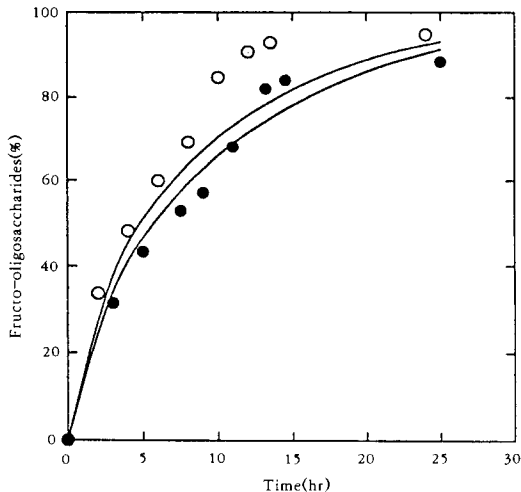


Fig 7. High-purity fructo-oligosaccharides produced by the mixed enzyme system of fructosyltransferase and glucose oxidase: (○) 400g/l of sucrose as a substrate, (●) 500g/l of sucrose as a substrate, (—) model prediction

치 하였다(Fig. 7). 이 결과들로부터 본 연구에서 제안된 혼합 효소계에 대한 단순화 모델은 적어도 혼합 효소 반응에 적당한 초기 설탕 농도를 예측가능하게 해주었다. 혼합 효소 반응조건, 예를 들면 효소 사용량, 반응온도, 산소 공급속도 등이 변하게 되면 변화된 조건에서 혼합 효소계에 대한 새로운 kinetic parameter 들을 구하여 모델에 적용하면 본 연구에서 제안된 모델을 그대로 적용할 수 있을 것으로 판단되었다.

요 약

Fructosyltransferase와 glucose oxidase의 혼합 효소계를 이용한 고순도 fructo-oligosaccharides 생산반응에서의 수학적 모델을 제안하고 실험적으로 검증한 결과 실험치와 모델 값이 서로 잘 일치하였다. 혼합 효소계에서 두 효소의 kinetic parameter 를 구한 결과, fructosyltransferase 단일 효소계에서의 값들에 비해 K_m 값들은 감소하였고, K_{iG} , V_{max} 값들은 증가하였다. 혼합 효소계의 반응메카니즘은 전체적으로 Michaelis-Menten kinetics로 표현할 수 있었고, 제안된 모델을 이용하여 고순도 fructo-oligosaccharides 생산에 이상적인 설탕농도를 예측할 수 있었다.

감 사

본 연구는 1993년도 한국과학재단 핵심연구과제연구의 일부로서 연구비를 지원해주신 과학재단에 감사드립니다.

사용기호

- E_0 : initial enzyme concentration(g/l)
- F : fructose concentration(g/l)
- G : total glucose concentration(g/l)
- G_{GO} : glucose concentration resulted from glucose oxidation(g/l)
- I : inhibitor concentration of glucose oxidase(g/l)
- K : 1-kestose(GF_2) concentration(g/l)
- K_i : product inhibition constant of glucose oxidase(g/l)
- K_p : proportional coefficient of K_m (-)
- k : proportional coefficient of V_{max} (l/unit-s)

- 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_{mO} : Michaelis constant for oxygen(g/ℓ)
- K_{mS} : Michaelis constant for sucrose(g/ℓ)
- N : nystose concentration(g/ℓ)
- O : oxygen concentration in reaction mixture(g/ℓ)
- P : fructofuranosyl nystose(GF_4) concentration(g/ℓ)
- S : sucrose concentration(g/ℓ)
- t : time (h)
- V_{mF} : maximum reaction velocity for fructose ($g/\ell \cdot h$)
- V_{mG} : maximum reaction velocity for glucose ($g/\ell \cdot h$)
- V_{mK} : maximum reaction velocity for 1-kestose ($g/\ell \cdot h$)
- V_{mN} : maximum reaction velocity for nystose ($g/\ell \cdot h$)
- V_{mS} : maximum reaction velocity for sucrose ($g/\ell \cdot h$)

참고문헌

1. 編輯部(1989), *Food Chemicals*(Japan), Oct., 10.
2. 編輯部(1990), 食品と開發(일본), **26**(10), 23.
3. I. S. Bhatia and K. S. Nandra(1979), *Phytochemistry*, **18**, 923.
4. N. Shiomi, J. Yamada and M. Izawa(1979), *Agric. Biol. Chem.*, **43**(11), 2233.
5. J. W. Yun, K. H. Jung, J. W. Oh and J. H. Lee(1990), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **24/25**, 299.
6. H. Hidaka, M. Hirayama and M. Sumi(1988), *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1181.
7. S. Hayashi, M. Nonokuchi, K. Imada and H. Ueno(1990), *J. Q. Industrial Microbiol.*, **5**, 395.
8. K. H. Jung, J. Y. Lim, S. J. Yoo, J. H. Lee and M. Y. Yoo(1987), *Biotechnol. Lett.*, **9**, 703.
9. J. W. Yun, K. H. Jung, Y. J. Jeon and J. H. Lee(1992), *J. Microbiol. Biotechnol.*, **2**(2), 98.
10. S. Hayashi, J. Kinoshita, M. Nonoguchi, Y. Takasaki and K. Imada(1991), *Biotechnol. Lett.*, **13**(6), 395.
11. S. Hayashi, K. Ito, M. Nonoguchi, Y. Takasaki and K. Imada(1991), *J. Ferment. Bioeng.*, **72**(1), 68.
12. K. H. Jung, J. W. Yun, K. R. Kang, J. Y. Lim and J. H. Lee(1989), *Enzyme Microb. Technol.*, **11**, 491.
13. J. W. Yun, Y. J. Jeon, M. G. Lee and S. K. Song(1993), *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **8**(3), 266.
14. J. W. Yun, M. G. Lee and S. K. Song(1993), *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **8**(4), 307.
15. 日高秀昌(1984), 日本公開特許公報 昭 59-95895, 587.
16. J. W. Yun, S. K. Song, J. H. Han, Y. J. Cho and J. H. Lee(1994), *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, In press.
17. J. W. Yun and S. K. Song(1993), *Biotechnol. Lett.*, **15**, 573.
18. J. W. Yun, M. G. Lee and S. K. Song(1994), *J. Ferment. Bioeng.*, In press.
19. J. W. Yun, J. S. Noh, M. G. Lee and S. K. Song(1993), *HWAHAKKONGHAK*, **31**, 846.
20. M. K. Weibel and H. J. Bright(1971), *Biochem. J.*, **124**, 801.
21. J. W. Parker and C. S. Schwartz(1987), *Biotechnol. Bioeng.*, **30**, 724.
22. P. H. S. Tse, J. K. Leypoldt and D. A. Gough(1987), *Biotechnol. Bioeng.*, **29**, 696.
23. T. Tsukamoto, S. Morita and J. Okata(1982), *Chem. Pharm. Bull.*, **30**(3), 782.
24. T. Tsukamoto, H. Nomura, S. Morita and J. Okata(1983), *Chem. Pharm. Bull.*, **31**(10), 3377.
25. Q. H. Gibson, B. E. P. Swoboda and V. Massey(1964), *J. Biol. Chem.*, **239**, 3927.
26. Y. K. Cho and J. E. Bailey(1977), *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 185.
27. D. P. H. Hsieh, R. S. Silver and R. I. Mateles(1969), *Biotechnol. Bioeng.*, **11**, 1.
28. C. O. Malikkides and R. H. Weiland(1982), *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 2419.
29. P. H. S. Tse and D. A. Gough(1987), *Biotechnol. Bioeng.*, **29**, 705.