

생전분을 당공여체로 한 Stevioside의 당전이 반응의 동력학적 해석

박 동 찬 · 백 승 결 · 이 용 현
경북대학교 자연과학대학 유전공학과

Kinetic Analysis of Transglycosylation Reaction of Stevioside Using Raw Starch as a Glycosyl Donor

Dong-Chan Park, Seung-Gul Baek and Yong-Hyun Lee

Department of Genetic Engineering, College of Natural Sciences
Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

ABSTRACT

Kinetic equations for transglycosylation of stevioside in the attrition coupled reaction system using raw starch as a glycosyl donor were derived considering that the reaction was carried out through two steps; production of cyclodextrin(CD) from raw starch in the attrition coupled reaction system, and then transglycosylation of glycosyl residues to stevioside from produced CD. Kinetic constants of derived equation were evaluated. The simulation result showed that the derived kinetic equations could predict the experimental data reasonably well, and that can be utilized for optimization and scale-up of transglycosylation reactor and process developments.

서 론

당전이 stevioside는 cyclodextrin glucanotransferase(CGase)와 같은 당전이 효소를 이용하여 stevioside에 한 개 이상의 glucose 분자를 α -1,4-glycosidic bond로 전이시켜 얻어지는 대체 감미료로서 현재 산업적으로 대량생산되어 이용되고 있다(1-4).

당전이 stevioside에 관한 연구는 주로 당전이 효소의 개발(5-7), 고정화 효소를 이용한 새로운 효소반응기 개발(8), CGase의 당전이 반응 기작 규명(9-12), 그리고 CGase의 당전이 반응을 이용한 신규 물질 개발(13, 14) 등의 각도에서 주로 연구되고 있다. 그러나 규명된 기작의 수량적 분석을 시도한 연구는 물론 CGase에 의한 CD와 stevioside의 당전이 반응 kinetics에 관한 연구는 수행된 바 없

다.

본 연구실에서는 생전분을 당공여체로 하는 분쇄 마찰매체 함유 불균일상 효소반응계에서 CGase의 당전이 반응에 관한 기초 연구를 수행한 바 있으며, 이와 같은 생전분을 당공여체로 하는 당전이 반응은 액화 전분을 당공여체로 사용하는 기존의 방법에 비하여 당전이 stevioside 생성 속도와 수율이 높고, maltooligo당의 축적이 적으며, 또한 미반응 잔류 생전분의 분리가 쉬워 당전이 stevioside의 분리 정제가 용이한 등 많은 장점이 있어 산업적 활용 가능성이 큼을 보고한 바 있다(15).

또한 stevioside의 당전이 반응 mechanism을 검토하였으며, 그 결과 당공여체인 생전분으로부터 CD가 먼저 생성되고, 생성된 CD가 다시 개환되어 stevioside에 당이 전이되며, CD와 stevioside간의 당전이 반응은 random sequential bireactant reac-

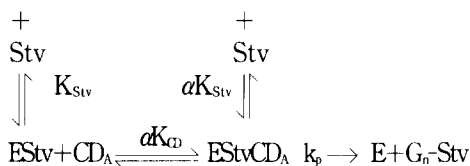
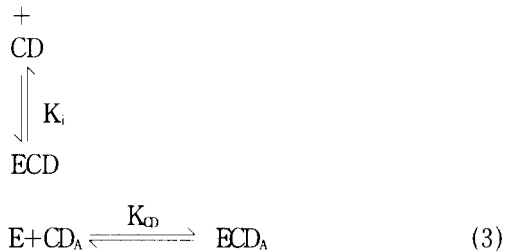
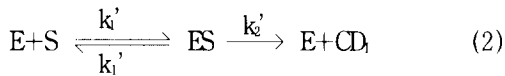
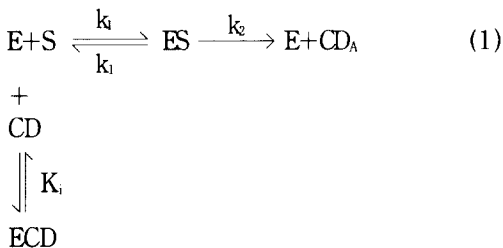
tion mechanism으로 진행됨을 보고한 바 있다(16). 또한 생성된 CD 중 α -, β -CD가 주로 당공여체로 이용되고, 또한 수개의 glucose($G_1 \sim G_n$) 분자가 stevioside에 α -1,4-glycosidic bond로 결합되어 있음을 확인한 바 있다(16).

본 연구는 생전분을 당공여체로 하는 분쇄마찰매체 함유 불균일상 효소반응계에서 stevioside 당전이 반응의 동력학적 분석에 관한 연구로서, 생전분으로부터 CD가 생성되는 반응과 생성된 CD와 stevioside간의 당전이 반응으로 나누어 반응식들을 유도하였다. 또한 각종 kinetic constants를 평가하였고, 유도된 반응식을 계산하여 실험치와 비교함으로써 그 효용성을 검토하였다. 이는 새로운 고효율 당전이 효소반응기 및 공정 개발은 물론 CGTase의 작용 기작 규명을 위한 기초 연구가 된다.

반응식의 유도

생전분을 당공여체로 한 분쇄마찰매체 효소반응계에서 stevioside의 당전이 반응kinetics는 전보(15, 16)의 결과를 토대로 다음과 같은 가정하에 유도되었다. 즉 1) 당전이 반응은 먼저 생전분으로부터 CD가 합성되고, 생성된 CD가 다시 개환되어 stevioside로 전이되는 2단계로 진행된다. 2) 생성된 CD는 당공여체로 이용 가능한 active form(α -, β -CD)과 inactive form(γ -CD)으로 구분된다. 3) CD 생성반응은 생성물인 CD에 의하여 competitive inhibition을 받는다. 4) CD와 stevioside 간의 당전이 반응은 random sequential bireactant mechanism으로 진행된다. 5) 생전분 구조는 반응이 진행됨에 따라 분해되기 어려운 상태로 변형된다. 그리고 6) CD와 stevioside간의 당전이 반응은 궁극적으로 평형상태에 도달된다.

이를 기초로 다음과 같은 반응 mechanism을 설정하였다. 여기서 E는 효소(CGTase), S는 기질인 생전분, ES는 효소와 생전분의 복합체, CDA와 CDI는 각각 active CD와 inactive CD, Stv는 당수용체인 stevioside, G_n -Stv는 당전이 stevioside, 그리고 S'는 반응 후 구조변형된 생전분을 나타낸다.



먼저 식(1)에 표시된 생전분으로부터 CD를 생성하는 반응의 속도반응식을 유도한 결과는 다음과 같다.

$$R_{CDi} = \frac{V_{max1} \times [S]}{K_m \times (1 + [CD]/K_i) + [S]} \quad (6)$$

또한 생전분의 구조적 변환에 의한 CD 생성속도의 감소는 초기 기질의 분해속도(R_1)와 일정시간 반응 후 얻어진 잔유 기질의 분해속도(R_2)의 비로 정의하여 ϕ 로 표시하였다. 여기에서 X는 CD 전환율, n은 구조적 변환상수(structural transformation constant)를 나타낸다.

$$\begin{aligned}
 \phi &= \frac{R_2}{R_1} = 1 - X^n = 1 - ([CD]/[S_0])^n \\
 &= 1 - (1 - [S]/[S_0])^n \quad (7)
 \end{aligned}$$

따라서 분쇄마찰매체 효소반응계에서 생전분으로부터 total CD의 생성에 관한 반응속도식은 식(6)과(7)을 조합하여 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$\begin{aligned}
 R_{CDt} &= -\frac{d[S]}{dt} = \frac{d[CD]}{dt} \\
 &= \phi \times \frac{V_{max2} \times [S]}{K_m \times (1 + [CD]/K_i) + [S]} \quad (8)
 \end{aligned}$$

또한 CD 생성 반응 중 당공여체로 이용되지 않는

inactive CD인 γ -CD의 생성 반응속도식은 식 (8)과 유사하게 다음과 같이 정리된다.

$$R_{CDI} = \frac{d[CD_I]}{dt} = \phi \times \frac{V_{max2} \times [S]}{K_m \times (1 + [CD]/K_i) + [S]} \quad (9)$$

식(4)에서 당전이 반응에 참여하는 active CD의 생성 속도는 총 CD 생성 속도에서 inactive CD 생성 속도를 뺀 것으로 다음과 같다.

$$R_{CDA} = \frac{d[CD]}{dt} - \frac{d[CD_I]}{dt} \quad (10)$$

CD_A 와 stevioside가 반응하여 당전이 stevioside를 생성하는 반응은 random sequential bireactant mechanism으로 진행되며(16) 그 반응속도식은 다음과 같다(17). 이때 전보(16)의 결과에서 일상적으로 1 g의 stevioside와 0.19 g의 active CD가 반응하여 1.19 g의 당전이 stevioside가 생성되었으므로, 당전이 stevioside 생성속도는 stevioside 감소속도식에 1.19를 곱한 값과 같다. 여기서 α 는 한 종류의 기질과 효소의 결합으로 인한 다른 기질의 결합 상수의 변화 요인, K_{CD} 와 K_{Stv} 는 각각 CD와 stevioside의 dissociation constant를 나타낸다.

$$R_T = -1.19 \times \frac{d[Stv]}{dt} = \frac{d[G_n-Stv]}{dt} = \frac{V_{max}[CD_A][Stv]}{\alpha K_{CD}K_{Stv} + \alpha K_{CD}[Stv] + \alpha K_{Stv}[CD_A] + [CD_A][Stv]} \quad (11)$$

한편 stevioside의 당전이 반응은 궁극적으로는 평형상태에 도달되어 당전이 반응이 감소하므로 이를 초기 stevioside의 농도에 따른 상수 ψ 로 나타내었으며, 이를 수식화하면 다음 식(12)와 같다. 여기에서 K_{eq} 는 평형상태에서 stevioside와 당전이 stevioside 간의 equilibrium constant(= $[G_n-Stv]/[Stv]$)를 의미한다.

$$\psi = 1 - \frac{[G_n-Stv]/[Stv]_0}{K_{eq}} = 1 - \frac{([Stv]_0 - [Stv]/[Stv]_0)}{K_{eq}} \quad (12)$$

따라서 본 효소반응계에서 당전이 stevioside 생성 속도는 식(11)에 상수 ψ 를 곱한 식(13)과 같이 정리될 수 있다.

$$\frac{d[G_n-Stv]}{dt} = \frac{1.19 \times \psi \times V_{max3} [CD_A][Stv]}{\alpha K_{CD}K_{Stv} + \alpha K_{CD}[Stv] + \alpha K_{Stv}[CD_A] + [CD_A][Stv]} \quad (13)$$

또한 active CD의 농도변화는 위의 결과를 종합하여 다음과 같은 식(14)로부터 구할 수 있다.

$$\frac{d[CD_A]}{dt} = \frac{d[CD]}{dt} - \frac{d[CD_I]}{dt} = \frac{1.19 \times \psi \times V_{max3} [CD_A][Stv]}{\alpha K_{CD}K_{Stv} + \alpha K_{CD}[Stv] + \alpha K_{Stv}[CD_A][Stv]} \quad (14)$$

재료 및 방법

당전이 효소

당전이 효소는 *Bacillus macerans* 유래의 산업용 CGTase(Amano Co., Japan, specific activity; 60 units/mg protein)를 사용하였으며, 효소활성은 전보(15)에서와 같은 방법으로 측정하여, 분당 1mg의 CD를 생성시키는 효소의 양을 1unit로 정의하였다.

당공여체 및 당수용체

당공여체로는 옥수수 생전분(corn starch; Kanto Chemical Co., Japan)을 사용하였으며, 당수용체로는 배당체인 stevioside(M.W. 804.9, Sigma Co., U.S.A.)를 사용하였다.

생전분을 당공여체로 하는 분쇄마찰매체 효소반응계에서의 당전이 반응

분쇄마찰매체 효소반응계에서 생전분을 이용한 당전이 반응조건은 당공여체인 옥수수 생전분 100g을 20mM Tris-maleic acid-NaOH buffer(pH 6.0) 1ℓ에 현탁하고, 여기에 당수용체 stevioside 0.1M, CGTase 8.0 ml(1,200 units), 그리고 유리구(glass bead, 직경 3mm, 비중 2.54) 400g을 첨가하여 50℃에서 200rpm으로 교반하면서 반응시켰으며, 경우에 따라 상기 반응조건을 변화시켰다.

Cyclodextrin 생성반응 중 생전분의 구조적 변환 상수 결정

생전분의 구조적 변환상수(n)는 분쇄마찰매체를 첨가하지 않은 효소반응계에서 상기와 동일한 CD 생성조건에서 0, 4, 8, 12, 18, 그리고 24시간 효소

반응하여 잔류전분을 얻고, 이를 원심분리, 세척하여 얻어진 잔류전분 20 g/l을 위에서와 동일한 반응조건에서 1시간 반응시킨 후 생성된 CD 농도를 측정하여 결정하였다.

분석방법

각종 당수용체와 CD의 농도는 high performance liquid chromatography (HPLC, Model-305, Gilson Co.)를 사용하여 측정하였고, column은 Cosmosil 5NH₂ packed column(Nacalai Co.), 용출용매는 acetonitril과 H₂O(65:35)의 혼합용액, 용출속도는 1.0 ml/min이었고, RI detector로 검정하였다.

반응식의 계산 및 평가

유도된 반응식은 조건을 달리하면서 IMSL Library subroutine 중 fourth order Runge-Kutta integration method(18)를 활용하여 계산하였으며, 계산치를 실험치와 비교하여 반응식의 효용성을 평가하였다.

결과 및 고찰

생전분을 당공여체로 하는 Stevioside의 당전이 반응식의 각종 상수의 결정

생전분으로부터 CD생성 반응상수

본 반응계에서 CD 생성의 최대 반응속도(V_{max1}), Michaelis-Menten constant(K_m), 그리고 생성된 CD에 의한 product inhibition constant(K_i)는 각각 0.027 g/l·min, 5.83g/l, 5.10 g/l로서 전보(19)의 결과를 이용하였다.

Inactive CD(γ -CD) 생성반응의 최대반응속도(V_{max2})를 결정하기 위하여 분쇄마찰매체를 첨가한 후 반응시간에 따른 γ -CD 농도를 측정후 Lineweaver-Burk plotting V_{max2} 를 계산하였으며 그 결과는 0.0043g/l·min이었다.

CD 생성반응 중 생전분의 구조적 변환 상수

기질인 생전분의 구조적 변환상수는 CD 생성반응 조건에서 일정 시간 경과 후 얻어진 잔류 전분을 기질로 반응시켜 얻어진 CD 농도를 측정하여 구하였으며, 식 (7)에서 제시한 ϕ 는 각 잔류 전분의 CD 생성 속도를 초기 전분의 CD 생성속도로 나누어 구하였다. Fig. 1은 생전분의 구조적 변환상수(n)를 구하기 위하여 식 (7)을 다음 식 (15)와 같이 변형시키고 일정 시간 반응 후의 전환율과 $(1-\phi)$ 값을

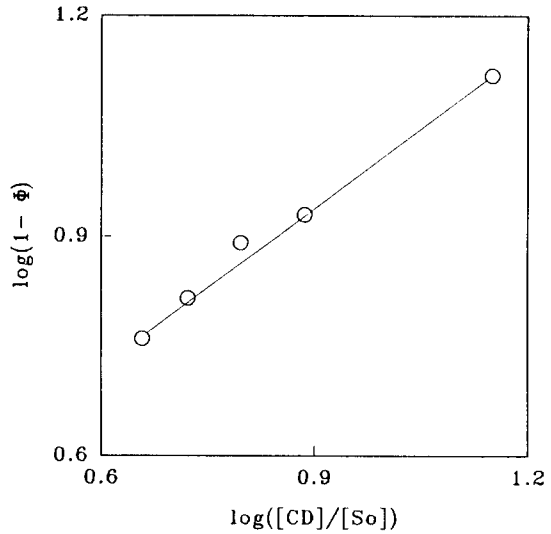


Fig 1. The plot for determination of structural transformation constant(n) of raw starch during cyclodextrin production reaction. 20g residual starch/ℓ, 240 units CGTase/ℓ, pH 6.0, and 50°C.

Table 1. Kinetic constants for reactions of cyclodextrin production and tran glycosylation between stevioside and cyclodextrin

Cyclodextrin production		Tran glycosylation of stevioside ²	
K_m	5.380g/ℓ ¹⁾	K_{CD}	1.277g/ℓ
V_{max1}	0.027g/ℓ·min ¹⁾	K_{sv}	31.765g/ℓ
V_{max2}	4.310mg/ℓ	α	1.063
K_i	5.100g/ℓ ¹⁾	V_{max3}	0.579g/ℓ·min
n	0.720	K_{eq}	3.220

Ref; 1) *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 19, 163-170 (1991)

2) *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 22, 252-258 (1994)

상용대수로 취하여 도기한 결과이며, 얻어진 n값은 0.72였다.

$$\log(1-\phi) = n \times \log([CD]/[S_0]) \quad (15)$$

CD와 Stevioside간의 당전이 반응상수

또한 cyclodextrin과 stevioside간의 당전이 반응에 관한 각종 상수는 전보(16)와 같으며, 이를 Table 1에 정리하였다(Table 1).

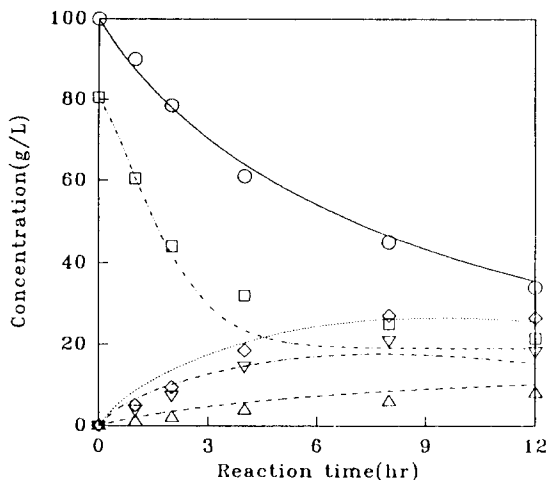


Fig. 2. Comparison of theoretical and experimental values of transglycosylation of stevioside in the attrition coupled reaction system using raw starch as a glycosyl donor.

100g raw corn starch/ ℓ , 0.1M stevioside/ ℓ , 1,200 units CGTase/ ℓ , pH 6.0, 50 $^{\circ}$ C, 400 g glass bead/ ℓ , and 200 rpm.

Lines, theoretical curves; symbols, experimental values

Raw starch(\circ , —), total CD(\diamond , \cdots), inactive CD(\triangle , ---), active CD (∇ , - · - · -), and stevioside(\square , - - - - -).

당공여체, CD, Stevioside, 그리고 당전이 Stevioside의 농도 변화

생전분 100g/ ℓ 와 0.1M의 stevioside를 혼합하여 12시간 당전이 반응시키면서 당공여체인 생전분과 중간산물인 CD, 그리고 당수용체인 stevioside 농도 변화를 관찰한 결과는 Fig. 2와 같다. 여기에서 선은 반응식을 계산하여 얻은 이론치이며 기호들은 실험치를 나타내고 있다.

생전분, active CD, inactive CD, 그리고 stevioside의 농도변화에 대한 이론치와 실험치는 전 반응을 통해서 비교적 잘 일치하였다. 단 잔류 stevioside 농도는 4시간 이후에 실험치가 다소 높은 값을 보였는데, 이는 생성된 당전이 stevioside가 다시 당수용체로 이용되어 효소와 결합하는 부가적인 당전이 반응(20, 21)이 진행되어 원래 stevioside의 당전이 반응이 저해되기 때문으로 판단된다. 따라서 이러한 문제점을 보완하기 위해서는 반응식에서 생

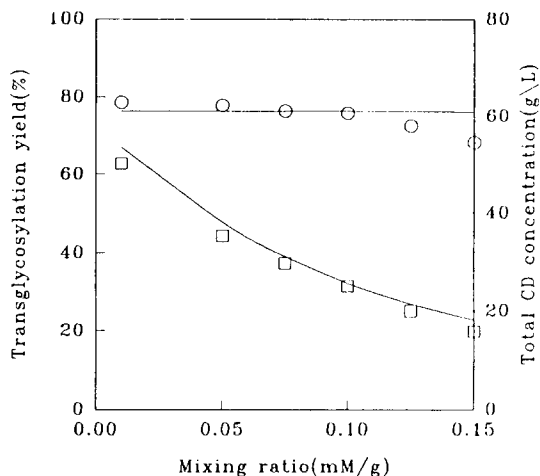


Fig. 3. Comparison of theoretical and experimental values of transglycosylation of stevioside under the various mixing ratios of raw starch and stevioside.

100 g raw corn starch/ ℓ , 0.01~0.15M stevioside/ ℓ , 1,200 units CGTase/ ℓ , pH 6.0, 50 $^{\circ}$ C, 400 g glass bead/ ℓ , and 200 rpm.

Lines, theoretical curves; symbols, experimental values

Transglycosylation yield(\circ), total cyclodextrin concentration(\square)

성된 당전이 stevioside의 부가적인 당전이 반응과 당전이 반응의 저해 작용을 추가적으로 고려하여야 할 것으로 사료된다.

생전분과 Stevioside의 혼합비에 따른 당전이 수율의 변화

Fig. 3은 당공여체인 생전분의 농도를 100g/ ℓ 로 고정하고, 당수용체인 stevioside의 혼합비를 0.1~2.0 mM/g starch가 되도록 변화시켜 12시간 당전이 반응 후 얻어진 당전이 stevioside의 수율과 총 CD 농도를 이론치와 비교한 결과이다. CD 농도는 전반적으로 이론치와 실험치가 잘 일치하였으며, 당전이 수율도 혼합비가 1.0 mM/g starch일 때까지는 실험치와 잘 부합되었다. 그러나 높은 혼합비에서는 실험치가 다소 낮은 값을 나타내었는데 이는 당수용체인 stevioside의 첨가 농도가 증가할수록 위에서 언급한 당전이 stevioside에 의한 부가적 당전이 반응이 진행되어 당전이 수율이 더욱 현저하게 감소하기 때문인 것으로 판단된다.

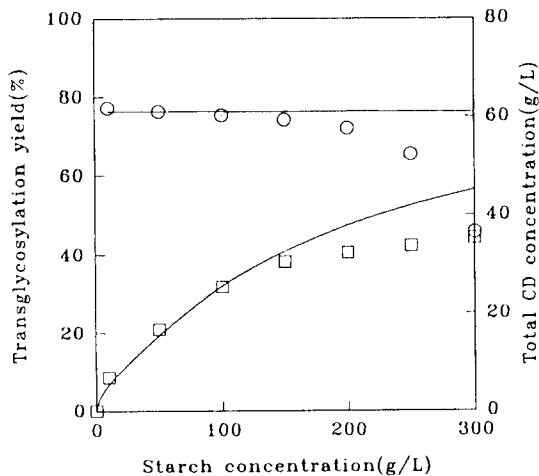


Fig 4. Comparison of theoretical and experimental values of transglycosylation of stevioside under different concentration of raw starch.

Mixing ratio of stevioside and raw starch 0.1mM stevioside/g raw corn starch, 1,200 units CGTase/ ℓ , pH 6.0, 50°C, 400g glass bead/ ℓ , and 200 rpm.

Lines, theoretical curves; symbols, experimental values

Transglycosylation yield(○), total cyclodextrin concentration(□)

생전분과 Stevioside 혼합물의 첨가량에 따른 당전이 수율 변화 Fig. 4는 생전분과 stevioside의 혼합비를 1.0mM/g starch로 고정하고, 혼합물의 첨가 농도를 생전분 기준으로 50~300 g/ ℓ 까지 증가시켜 12시간 당전이반응 후 얻어진 당전이 stevioside 수율과 총 CD의 이론치와 실험치를 비교한 결과이다.

유도된 반응식은 생전분과 stevioside 혼합물의 첨가량에 따른 당전이 수율 변화를 전반적으로 잘 나타내고 있다. 생전분의 첨가농도가 150 g/ ℓ 이상일 때는 실험치와 차이가 발생하였는데, 이는 생전분의 고농도 첨가의 경우에는 생전분의 현탁액 중의 수분을 다량 흡수함으로써 반응액의 점도가 상승하게 되고, 물성이 변화되어 분쇄마찰효과가 감소하게 됨으로써(22) 당전이 수율이 감소하는 것으로 판단된다.

요 약

분쇄마찰매체 함유 불균일상 효소반응계에서 생전

분을 당공여체로 한 stevioside의 당전이 반응의 kinetics에 관한 연구를 수행하였다. 생전분으로부터 CD를 생성하는 과정과 생성된 CD와 stevioside가 random sequential bireactant mechanism으로 반응하여 당전이 stevioside를 합성하는 과정으로 나누어 kinetic equation을 유도하였다. 또한 유도된 반응식의 각종 kinetic constants을 평가하였다. 유도된 반응식을 Runge-Kutta integration법으로 계산하였으며, 계산 결과를 실험치와 비교하여 유도식의 효용성을 검토하였다. 유도된 kinetic equations는 당공여체인 생전분의 농도, stevioside의 농도, 그리고 중간산물인 CD의 농도 변화를 비교적 정확히 표시할 수 있었으며, 고효율 당전이 효소반응기 개발에 활용될 것이다.

감 사

본 연구는 한국과학재단 지원 농업생물신소재연구센터 1994년 연구비로 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Y. Fukunaga, T. Miyata, N. Nakayasu, K. Mizutani, R. Kasai and O. Tanaka(1989), *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 1603-1607.
2. A. I. Bakal and L. O. Nabors(1985), *Alternative Sweeteners*, (L. O. Nabors and R. C. Gelardi, eds), 295-308. Marcel Dekker, New York.
3. T. Miyake(1980), US Patent, 4,219,571.
4. O. Darise, K. Mizutani, R. Kasai, O. Tanaka, S. Kitahata, S. Ogawa, F. Murakami and F. H. Chen(1984), *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2483-2488.
5. B. E. Norman and S. T. Jørgensen(1982), *Denpun Kagaku*, **39**, 101-108.
6. H. Bender(1983), *Carbohydr. Res.*, **117**, 1-11.
7. S. Kitahata, K. Hara, K. Fujita, H. Nakano, N. Kuwahara and K. Koizumi (1992), *Agric. Biol. Chem.*, **56**, 1386-13914.
8. 김민홍, 안만진, 유영재(1993), 1993년도 생물공정연구센터 연례심포지움 초록집, 19-26, 생물공정연구센터, 대전.
9. E. J. Hehere, K. Mizokami and S. Kitahata

- (1983), *J. Jap. Soc. Starch Sci.*, **30**, 76-82.
10. S. Kobayashi, H. R. Lee Ashraf, P. Braun and D. French(1988), *Starch*, **40**, 112-116.
 11. S. Kitahata, Y. Yoshimura, S. Okada and E. J. Hehre(1989), *Denpun Kagaku*, **36**, 15-20.
 12. S. Kobayashi(1993), *Denpun Kagaku*, **40**, 103-116.
 13. D. Vetter, W. Thorn, H. Brunner and W. A. Konig(1992), *Carbohydr. Res.*, **223**, 61-69.
 14. S. Okada, S. Kitahata, M. Shiosaka, H. Bunya, M. Kubota, S. Sakai and Y. Tsujisaka (1991), *Denpun Kagaku*, **38**, 211-215.
 15. 이용현, 백승걸, 신현동, 박동찬(1993), 산업미생물학회지, **21**, 461-467.
 16. 백승걸, 박동찬, 허태린, 이용현(1994), 산업미생물학회지, **22**, 252-258.
 17. I. H. Segel(1975), *Enzyme Kinetics*, 273-345. John Wiley & Sons, New York.
 18. IMSL(1989), *The IMSL Library*, Int Math. Stat. Library, Huston.
 19. 한일근, 이용현(1991), 산업미생물학회지, **19**, 163-170.
 20. D. Vetter and W. Thorn(1992), *Carbohydr. Res.*, **223**, 61-69.
 21. T. Shibuya, T. Yamauchi, H. Chaen, M. Nakano, S. Saka and M. Kurimoto(1993), *Denpun Kagaku*, **40**, 375-381.
 22. 박동찬, 이용현(1992), 산업미생물학회지, **14**, 407-413.