한국생물공학회지 제 10권 제 1호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 10. No. 1. 9-14(1995)

과당전이효소와 포도당 이성화 효소의 고정화 혼합효소계에 의한 설탕으로부터 프락토올리고당의 연속생산

윤 종 원 · *서 근 학 · 송 승 구
부산대학교 화학공학과
*부산수산대학교 화학공학과

Continuous Production of Fructooligosaccharides from Sucrose by a Dual Immobilized Enzyme System of Fructosyltransferase and Glucose Isomerase

Jong-Won Yun, *Kuen-Hack Suh and Seung-Koo Song
Department of Chemical Engineering, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea
*Department of Chemical Engineering, National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea

ABSTRACT

Continuous production of fructooligosaccharides from sucrose by a dual immobilized enzyme system of fructosyltransferase and glucose isomerase was studied in a column reactor. The optimal temperature and pH of the immobilized fructosyltransferase were 65℃ and 5.5, respectively. The activity of glucose isomerase was favorable as temperature and pH were increased within the ranges examined. However, both the immobilized enzymes were thermally unstable over 50℃, suggesting that long-term operation of the dual immobilized enzyme column should be carried out below 50℃. The optimum packing ratio of fructosyltransferase to glucose isomerase was found to be around 5/3. Under the optimized reaction conditions, the dual enzyme column was successfully operated for 40 days without any loss of initial enzyme activities, yielding 66% of fructooligosaccharides. Furthermore, the relative sweetness of fructooligosaccharides produced by a dual emzyme system was enhanced by 6% compared with that of fructosyltransferase alone.

서 론

프락토올리고당, 이소말토올리고당 등을 포함한 올리고당류는 여러 가지 우수한 기능성을 나타내는 것이 밝혀지면서 부터, 감미료뿐만 아니라 여러 종류의 식품소재로 광범위하게 이용되고 있다(1-6). 특히 프락토올리고당은 설탕으로부터 생산되므로 감미질(sweet taste) 면에서 거부감이 없고, 제조공정이 대체로 단순한 편이어서 다른 올리고당류에 비해 이용성이 큰 편이다. 프락토올리고당의 제조공정은 *Aureobasidium* 또는 *Aspergillus* 등의 곰팡이류가 생산하는 과당전이효소(fructosyltransferase, EC 3.2.1.26)를 효소 또는 고정화균체 상태로 고농도 설탕용액과 반응시킨 후 반응물 자체를 시럽형태의 제품으로 이용하고 있다(7-9). 상업적으로 생산되고 있는 프락토올리고당 시럽 중의 올리고당 함량은 효

소반응 부산물로 유리되는 포도당과 미반응 설탕이 혼용되어 있어 전체반응물 중에서 55~60% 정도에 불과하여 이 제품의 기능성을 순수하게 이용하는데 제한을 받아왔다. 따라서 고순도 제품생산을 위한 몇 가지 방법들이 연구되어 왔는데, 그 중 하나는 이온교환 수지탑을 이용하여 프락토올리고당 성분만을 분리하는 방법이고(10), 두번째 방법은 포도당산화효소를 프락토올리고당 생산효소와 함께 이용하는 혼합효소계이다(11, 12). 전자의 방법은 분리수율이 매우 낮아서 공정의 경제성이 문제점으로 지적될 수 있는데 비해, 후자의 혼합효소계는 98% 이상의 고순도 제품생산을 가능하게 하고 scale-up에 큰 어려움이 없을 것으로 예상되어 고순도 프락토올리고당 생산의 상업적 제조공정으로 응용될 수 있을 것으로 기대되고 있다. 그러나 이 혼합효소계는 포도당산화반응에 과량의 산소공급이 필요하고, 부산물로 생성되는 글루콘산(gluconic acid)과 과산화수소의 제거공정이 필요한 점 등이 단점으로 지적될 수 있고, 특히 30% 정도에 해당하는 포도당이 제거됨으로써 총당(total sugar)의 손실을 피할 수 없는 점이 중요한 문제점으로 부각될 수 있다.

저자들은 이러한 문제점들을 극복하고자 포도당산화효소 대신에 포도당 이성화 효소(glucose isomerase)를 이용한 혼합효소계를 사용하여 프락토올리고당의 함량 증가를 시도한 바 있다(13). 포도당산화효소에 의해 포도당이 완전히 제거되고, 이 결과 포도당에 의한 효소반응 저해현상이 극복되는 동시에 기질인 설탕을 완전히 프락토올리고당으로 전환시켜 줌으로써 고순도 프락토올리고당의 생산이 가능하였는데 비해, 포도당 이성화 효소를 사용한 경우는 효소 동력학적 특성 때문에 만족할 만한 함량 증가를 나타내지 못하였다. 그러나 포도당 이성화 효소를 사용한 결과, 새롭게 유리된 과당이 전체 반응물의 감미도를 증가시켜 기존의 프락토올리고당 시럽이 설탕에 비해 감미도가 크게 낮은(설탕의 1/2 수준) 결점을 극복하게 해주는 등 새로운 조성의 프락토올리고당 제품생산이 가능하였다. 포도당 이성화 효소를 사용한 혼합효소계에서 프락토올리고당의 함량 증가가 크게 일어나지 않은 중요한 이유는 서로 유사한 기질들에 대한 반응성을 나타내는 이들 두 효소간의 상호작용(enzyme-enzyme interaction)이 중요한 원인이었음을 밝힌 바 있다(13).

따라서 본 연구에서는 효소간 상호작용을 줄여줄 목적으로 두 효소를 각각 고정화한 후 혼합효소계를 구성함으로써 프락토올리고당의 함량 증가를 시도하는 동시에 고정화 혼합효소계를 이용한 연속생산공정을 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

시약

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

효소

과당전이효소는 *Aureobasidium pullulans* KFCC 10245를 raw sugar 10g/ℓ, yeast extract 2g/ℓ (pH 5.2)의 배지에서 30℃에서 2일간 배양한 다음, 50ml의 배지(sucrose 200g/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)를 함유한 250ml 플라스크를 이용하여 30℃에서 5일간 배양하였다. 균체를 원심분리한 후 탈이온수로 2회 세척하여 3%(w/v) sodium alginate(Hayashi Pure Chemical Co., Ltd., 일본)에 고정화시킨 후 사용하였다. 포도당 이성화 효소는 Novo사에서 생산된 고정화 포도당 이성화 효소 Sweetzyme T(Novo Nordisk, 덴마크)를 사용하였다.

효소 활성의 측정

고정화 과당전이효소 활성은 고정화균체 10g(wet weight), 80%(w/v) 설탕 50ml(pH 5.5)를 함유한 250ml 삼각플라스크를 이용하여, 55℃에서 30분간 반응시키고 반응물을 HPLC로 분석하여 1분간 1μmole의 1-kestose(GF_2 : G, glucose ; F, fructose)를 생성하는데 필요한 효소의 양을 1unit로 정의하였다. 포도당 이성화 효소의 활성은 고정화효소 1g, 20%(w/v) 포도당 10ml를 함유한 50ml 플라스크를 이용하여 55℃, pH 6.5에서 30분간 반응시키고 반응물을 HPLC로 분석하여 1분간 1μmole의 과당을 생성하는데 필요한 효소량을 1unit로 정의하였다.

분석

모든 반응물의 분석은 Aminex HPX-42C(300㎜ ×7.8㎜, Bio-rad, 미국) 컬럼이 장착된 HPLC (Varian, 미국)를 사용하였고, 검출기는 RI-4 refractive index detector, 이동상으로 초순수(18 megaohm.cm)를 사용하였으며(1ml/min) 컬럼온도는 85℃로 일정하게 유지해 주었다.

반응기 운전

두 고정화효소를 각각 50%(w/v) 설탕용액 중에서 각각 충분히 침적시킨 다음, 일정비율로 반응기(2.5×20㎝ Pyrex glass)에 충진하고 온도를 50℃로 유지한 후, 실험농도의 기질용액을 반응기 하부로부터 일정유속으로 공급하였다. 혼합효소 반응이 정상상태에 도달한시점(기질 공급 24시간 경과 후)에서 반응기 출구로부터 반응액을 채취하여 분석하였다.

결과 및 고찰

반응온도 및 pH의 영향

고정화 과당전이효소의 반응 최적 온도 및 pH는 700g/ℓ 설탕용액을 기질로 사용하여 30분간 반응시킨 후, 반응물을 HPLC로 분석하여 1-kestose의 생성속도를 상대활성으로 나타내었다. 포도당 이성화 효소의 경우, 450g/ℓ 포도당 용액을 기질로 30분간 반응시킨 후 생성된 과당의 농도를 정량하여 상대활성으로 나타내었다. Fig. 1은 두 효소의 반응 최적 온도를 각각 나타낸 것인데, 고정화 과당전이효소의 경우 65℃에서 최고 활성을 나타낸데 비해, 포도당 이성화 효소의 경우는 80℃까지 온도가 높을수록 활성이 계속 증가하였다. 고정화균체를 이용한 반응기 운전에서는 효소활성이 높게 유지되는 동시에 장기 운전안정성에 유리한 운전온도를 결정하여야 한다. Fig. 2는 고정화 과당전이효소와 고정화 포도당 이성화 효소의 열 안정성을 각각 보여주는 것인데, 각 온도에서 1시간 처리한 결과 50℃ 이후의 온도영역에서 두 효소 모두 온도상승에 따라 급격한 효소의 실활이 관찰되었다. 따라서 고정화 혼합효소 반응기의 장기운전에서는 50℃ 전후의 온도가 효과적일 것임을 알고, 이후의 장기운전 안정성 평가에서 50℃에서 고정화 혼합효소 반응기를 운전하였다.

한편 pH의 경우, 두 고정화효소의 반응 최적 pH 영역은 상당히 다르게 나타났는데, 과당전이효소의 경우는 pH 5.5에서 최대 활성을 보인데 비해, 포도당 이성화 효소의 경우는 pH 8 범위까지 높을수록 유리하였다. 그러나 포도당 이성화 효소의 pH 안정성은 높은 pH 영역에서 불리할 뿐 아니라, 포도당, 과당 등의 분해산물로 인한 부산물의 생성이 문제가 될 수 있다. 또한 설탕용액을 기질로 사용하는 혼합효소반응에서 별도의 pH 조정은 가능한 피하는 것이 유리하므로, 혼합효소반응에서 기질의 pH는 조정해 주지 않았는데, 설탕용액 제조 직후의 pH는 대

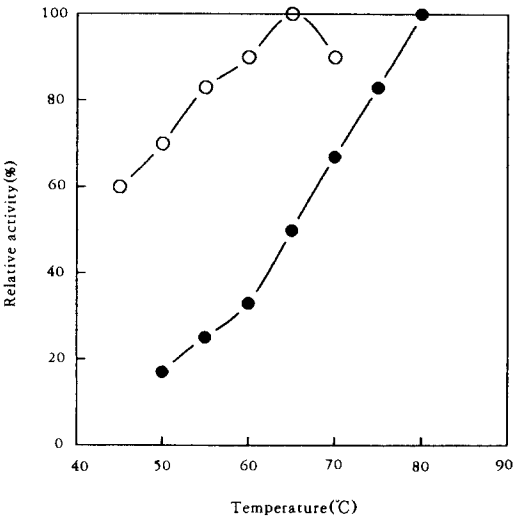

Fig. 1. Effect of reaction temperature on the activity of immobilized fructosyltransferase (○) and immobilized glucose isomerase(●).

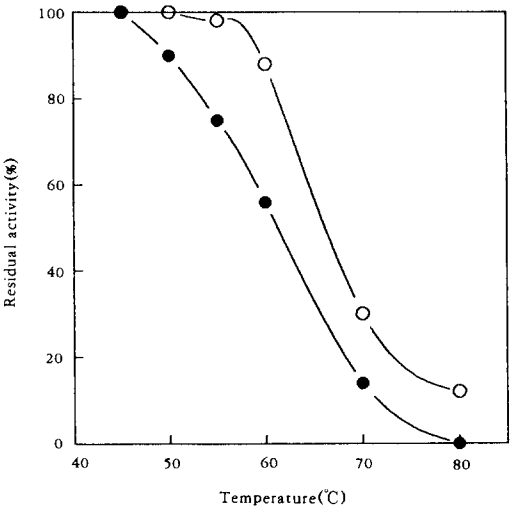

Fig. 2. Thermal stability of immobilized fructosyltransferase(○) and immobilized glucose isomerase(●).

개 5.5~6.5 정도로 일정하였기 때문이다.

기질농도 및 운전유속의 영향

Ca-alginate gel에 고정화된 *A. pullulans* 균체를 이용한 프락토올리고당의 생산에서 설탕용액의 농도

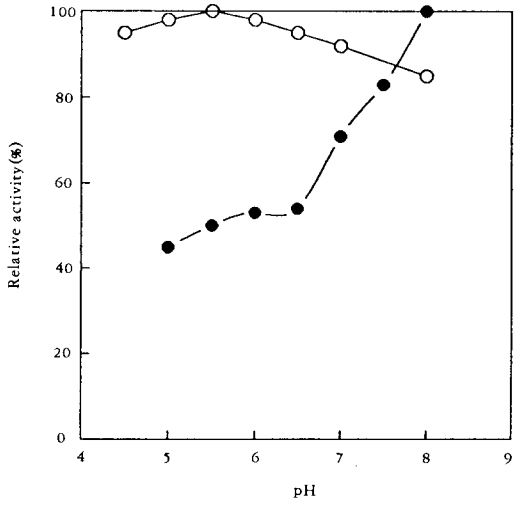

Fig. 3. Effect of reaction pH on the activity of immobilized fructosyltransferase(○) and immobilized glucose isomerase(●).

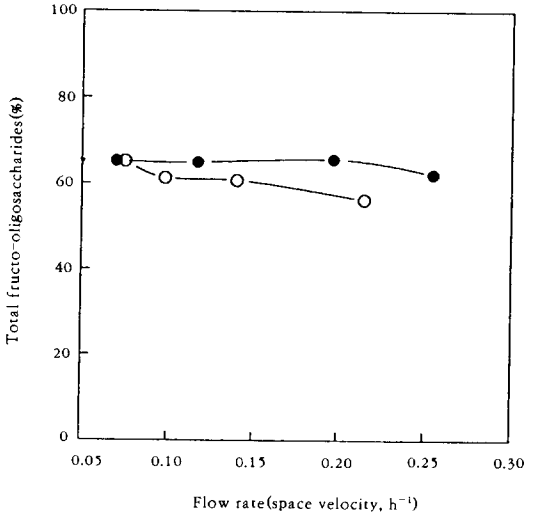

Fig. 4. Effect of substrate concentration and flow rate in the continuous production of fructooligosaccharides by a dual immobilized enzyme system of fructosyltransferase and glucose isomerase:(○) 700g/ℓ sucrose, (●)500g/ℓ sucrose.

는 800g/ℓ 이하에서 효과적이라는 사실이 이미 전보(8, 14)를 통해 밝혀진 바 있는데, 그 이상의 농도에서는 기질인 설탕뿐만 아니라 반응물인 올리고당류들이 gel matrix 내부에서 물질전달 저항을 크게 받기 때문에 올리고당의 전환율이 낮았다(15). 한편 고정화 포도당 이성화 효소의 경우도 기질인 포도당 용액의 반응 적정농도가 350~450g/ℓ 범위인 것으로 알려져 있어(16), 고정화 혼합효소계의 반응에서는 고정화 *A. pullulans* 균체를 이용한 반응의 경우보다 낮은 농도의 설탕용액을 사용하는 것이 바람직할 것으로 판단되었다. 따라서 500g/ℓ와 700g/ℓ 두 농도를 기질로 선정하여 운전유속을 변화시키면서 혼합효소반응을 수행하였다. Fig. 4에서 보여주는 바와 같이, 500g/ℓ의 기질 농도에서는 실험 유속범위(겉보기 공간속도(space velocity, SV) 0.1~0.26h^{-1}) 내에서 거의 동일한 프락토올리고당의 전환율을 얻을 수 있었으나, 700g/ℓ에서는 운전유속의 증가에 따라 전환율이 감소하여 SV 0.2h^{-1} 이상에서는 55% 이하의 낮은 전환율을 나타내었다. 한편 고정화 포도당 이성화 효소의 반응에서 반응촉진제로 작용하는 것으로 알려져 있는 Mg 이온은 기질 제조과정에서 별도로 첨가해 주지 않았어도 이성화율 45% 전후로 나타나, 고정화 포도당 이성화 효소의 반응성은 혼합효소계에서도 충분히 나타난 것으로 보인다.

혼합효소 비율의 영향

두 고정화 효소의 충진비율은 반응기의 전체활성(column activity)을 결정하는 중요한 변수가 된다. 본 연구에서 사용한 혼합효소계의 경우 포도당 저해현상을 극복하는데 필요한 고정화 포도당 이성화 효소의 양을 결정하기 위하여, 고정화 과당전이효소의 양을 50ml로 일정하게 유지하고, 고정화 포도당 이성화 효소의 양을 각각 20, 30, 50ml 첨가하여 반응기를 SV 0.2h^{-1}의 유속으로 운전하였다. Table 1에 나타낸 바와 같이, 포도당 이성화 효소의 비율이 낮은 경우, 과당전이효소에 의해 생성되는 포도당을 포도당 이성화 효소가 과당으로 이성화시키는 속도가 상대적으로 낮아서 프락토올리고당의 전환율이 낮게 나타났다. 이에 비해 50ml를 첨가한 경우, 즉 두 효소를 동일 부피로 첨가한 경우에서 30ml를 첨가한 경우와 거의 같은 전환율을 보인 것으로 보아 포도당 이성화 효소가 과량 첨가된 것으로 판단되었다. 따라서 과당전이효소와 포도당 이성화 효소의 충진 비율은 각각의 효소활성 비율에 영향을 받을 수 있겠지만 본 연구에서는 효소의 충진부피비로 5 : 3 전후가 적당한 것으로 사료되었다.

Table 1. Effect of enzyme ratio on the conversion of fructooligosaccharides by a dual enzyme system of immobilized fructosyltransferase and glucose isomerase.[a]

Amount of enzyme used(ml)[b]		Total
FT	GI	fructooligosaccharides(%, w/w)
50	20	59.41
50	30	65.70
50	50	64.33

a) Operation conditions : temperature, 50℃ ; substrate, 500g/ℓ sucrose solution ; flow rate, SV 0.2h^{-1}.

b) FT and GI indicate immobilized fructosyltransferase and immobilized glucose isomerase, respectively.

Table 2. Comparison of typical carbohydrate composition and relative sweetness of the reaction products with a fructosyltransferase system and a dual enzyme system of fructosyltransferase and glucose isomerase at 50℃.[a]

Carbohydrates	Composition(%, w/w)[b]			Relative sweetness(%)[c]	
	Single	Dual		Single	Dual
Glucose	30.36	14.70		21.25	10.29
Fructose	0	12.22		0	20.77
Sucrose	14.11	7.38		14.11	7.38
GF_2	37.20	38.75		11.53	12.01
GF_3	16.00	22.26		3.52	4.98
GF_4	2.33	4.29		0.37	0.69
$\sum_{n=2}^{4} GF_n$[d]	55.53	65.70	Total sweetness	50.78	56.12

a) Reaction was carried out using 500g/ℓ of sucrose as a substrate at 50℃ for 25 hrs.

b) Single and Dual indicate the enzyme system of fructosyltransferase alone and the dual enzyme system of fructosyltransferase and glucose isomerase, respectively.

c) Relative sweetness was estimated on the basis of : 10%(w/v) sucrose solution, 100% ; glucose, 70% ; fructose, 170%, GF_2, 31% ; GF_3, 22% ; GF_4, 16%.

d) GF_n indicates total amounts of fructooligosaccharides , where GF_2, GF_3 and GF_4 refer to 1-kestose, nystose and 1^F-fructofuranosyl nystose, respectively.

고정화 혼합효소계를 이용한 프락토올리고당의 연속생산

전술한 혼합효소계의 최적 조건에서 프락토올리고당을 연속생산하기 위하여 고정화 과당전이효소 50ml와 고정화 포도당 이성화 효소 30ml를 충진하여 50℃에서 반응기를 연속운전하였다. 장기운전 중의 고정화 과당전이효소활성 안정성은 생성되는 전체 프락토올리고당의 총량으로, 그리고 고정화 과당전이효소활성 안정성은 이성화되어 생성되는 과당의 양으로 평가하였다. Fig. 5에서 보여주는 바와 같이 두 고정화 효소의 안정성은 40일 동안의 연속운전 중에 각각 초기활성을 그대로 유지하였다. 한편 최적 운전조건에서 생성된 반응물의 조성을 Table 2에 나타내었는데, 전보(13)에서의 결과, 즉 두 효소를 고정화 하지 않은 혼합효소계와 비교해 볼 때 다소의 프락토올리고당의 함량 증가가 나타났음을 볼 수 있다. 특히 반응물의 감미도는 과당전이효소만을 사용한 경우에 비해 6% 정도 증가하였다. 그러나 함량 증가의 정도는 포도당산화효소를 이용한 혼합효소계의 경우(12)에 비해 크게 낮았으나, 고정화 혼합효소계를 이용하여 효소-효소 간의 상호작용을 다소 극복하게 함으로써 프락토올리고당의 수율을 증가시킬 수가 있었다. 결론적으로 본 연구에서 제안된 방법은 기존의 제품에 비해 프락토올리고당의 함량이 10% 정도 증가되고 감미도가 6% 증가된 새로운 조성의 프락토올리고당의 연속생산공정으로

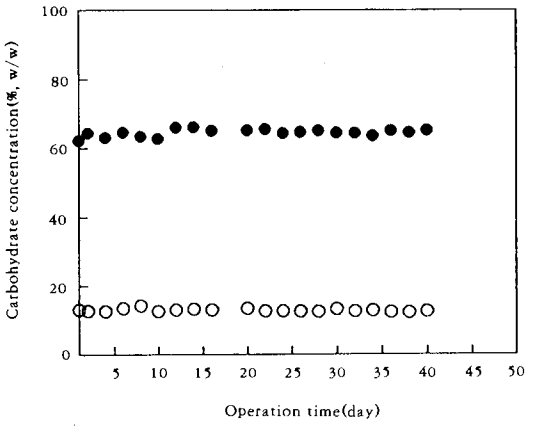

Fig. 5. Operational stability of the continuous production of fructooligosaccharides by a dual immobilized enzyme system of fructosyltransferase and glucose isomerase: (○) fructose isomerized from glucose by the action of glucose isomerase, (●) total amounts of fructooligosaccharides from sucrose by the action of fructosyltransferase.

응용할 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

고정화 과당전이효소와 고정화 포도당 이성화 효소를 동시에 이용한 혼합효소계를 사용하여 새로운 조성의 프락토올리고당을 연속생산하였다. 혼합효소 반응에서 각 효소의 반응최적 온도 및 pH 영역은 서로 상이하여, 고정화 과당전이효소의 경우 65℃, pH 5.5에서 최고활성을 나타낸데 비해, 고정화 포도당 이성화 효소의 경우 실험범위내(온도 80℃, pH 8)에서 온도와 pH가 높을수록 유리하였다. 고정화 효소의 열안정성은 과당전이효소 및 포도당 이성화 효소 모두 50℃ 이후의 온도에서 불안정하였다. 고정화 혼합효소의 비율이 프락토올리고당의 전환율에 미치는 영향을 검토한 결과, 과당전이효소와 포도당 이성화 효소의 비가 5 : 3 정도가 적당하였다. 최적 반응조건에서 생산된 프락토올리고당의 전환율은 66 %였고, 포도당으로부터 이성화되어 생성된 과당이 전체 반응물의 감미도를 6% 증가시켰다. 최적 반응조건에서 고정화 혼합효소 반응기를 연속운전한 결과, 40일 동안 초기 효소활성을 그대로 유지하였다.

참 고 문 헌

1. 편집부(1989), *Food chemicals*(Japanese), Oct., 10.
2. 편집부(1990), 식품과 개발(일본), **26**(10), 23.
3. H. Hidaka, M. Hirayama and M. Sumi(1988), *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1181.
4. S. Hayashi, M. Nonokuchi, K. Imada and H. Ueno(1990), *J. Industrial Microbiol.*, **5**, 395.
5. T. Kuriki, M. Tsuda and T. Imanaka(1992), *J. Ferment. Bioeng*, **73**(3), 198.
6. T. Kuruki, M. Yanase, H. Takata, Y. Takesada, T. Imanaka and S. Okada(1993), *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**(4), 953.
7. K. H. Jung, J. Y. Lim, S. J. Yoo, J. H. Lee and M. Y. Yoo(1987), *Biotechnol. Lett.* **9**, 703.
8. J. W. Yun, K. H. Jung, Y. J. Jeon and J. H. Lee(1992), *J. Microbiol. Biotechnol.*, **2**, 98.
9. K. H. Jung, J. W. Yun, K. R. Kang, J. Y. Lim and J. H. Lee(1989), *Enzyme Microb. Technol.*, **11**, 491.
10. 윤종원, 송승구, 한정희, 조영제, 이재흥(1994), 한국생물공학회지, **9**, 35.
11. J. W. Yun and S. K. Song(1993), *Biotechnol. Lett.*, **15**(6), 573.
12. J. W. Yun, M. G. Lee and S. K. Song(1994), *J. Ferment. Bioeng.*, **77**, 159.
13. 윤종원, 노지선, 이민규, 송승구(1993), 화학공학, **31**, 846.
14. J. W. Yun, K. H. Jung, J. W. Oh and J. H. Lee(1990), *Appl. Biochem, Biotechnol.*, **24/25**, 299.
15. 윤종원, 전영중, 이민규, 송승구(1993), 한국생물공학회지, **8**, 266.
16. S. H. Hemmingsen(1979), *Applied Biotechnology and Bioengineering* Vol. 2, p. 157, Academic Press Inc., New York.