

고정화 혼합효소를 이용한 새로운 구조의 올리고당 생산 및 특성 연구

이인수^{1,4,5*}·김도만²·허수진³·김문수¹·이기영⁶·Seiya Chiba⁶·Atsuo Kimura⁶
전남대학교 공업화학과, ¹생물화학공학과, ²화학공학과, ³의공학협동과정,
⁴축매연구소, ⁵서울대학교 농업생물신소재 연구센터, ⁶Hokkaido대학교 농업대학원
(접수 : 2000. 1. 28., 게재승인 : 2000. 2. 19.)

Production and Characterization of New Structured-oligosaccharides from Immobilized Mixed-enzyme Reactor

In-Su Lee, Doman Kim^{1,4,5*}, Soo-Jin Heo², Moon-Su Kim³, Ki-Young Lee¹, Seiya Chiba⁶, and Atsuo Kimura⁶
Department of Chemical Technology, ¹Department of Biochemical Engineering,
²Department of Chemical Engineering, ³Department of Biomedical Engineering, ⁴Research Institute for Catalysis,
Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea
⁵Research Center for New Bio-Materials in Agriculture, Seoul National University, Suwon 441-774, Korea
⁶Division of applied Bioscience, Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060-8589, Japan
(Received : 2000. 1. 28., Accepted : 2000. 2. 19.)

We have produced new-structured oligosaccharides using immobilized mixed-enzyme reactor of dextranase from *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMCM and α -amylase from *Aspergillus oryzae*. The reactors of immobilized mixed-enzyme beads were more efficient for the production of oligosaccharides than that of each immobilized enzyme bead in stirred-tank reactor(STR) or in packed-bed reactor(PBR). In continuous flow reactor, the immobilized mixed-enzyme bead in PBR was more stable than in STR, and 52% of initial yield was maintained for 200 hr. New structured-oligosaccharides (NOS) reduced the change of pH in the culture of *Streptococcus mutans*. It also showed an inhibitory effect on the growth of *Staphylococcus aureus*.

Key Words : *Leuconostoc mesenteroides*, dextranase, α -amylase, oligosaccharides, immobilized enzyme, stirred tank reactor, packed bed reactor, mixed enzyme

서론

올리고당류(oligosaccharides)는 기존의 감미료인 설탕(sucrose)이나 과당(fructose)과는 달리 감미도가 낮아 저감미도를 선호하는 식품으로 이용될 수 있으며, 충치발생균이 이용하기 어려운 당으로 충치발생억제 효과가 있으며, 장내세균중 유용균만이 선택적으로 이용할 수 있고, 장내 pH를 저하시켜 유해균의 증식을 억제하며, 저 칼로리성으로 당뇨병 등의 문제점을 극복하는 것으로 보고되고 있다(5,7,10,15,21). 또한 식품소재로서도 응용범위가 다양하다는 것이 알려지면서 소비 또한 증가하고 있는 추세이다(5,8,16).

대부분의 올리고당은 단당류나 이당류, 또는 녹말 같은 다당을 기질로 특정효소에 의한 당전위 반응이나, 분해반응에 의하여 생성된다. 이러한 효소중 하나인 dextranase는 포도당(glu-

cose) 단위가 α -(1 \rightarrow 6)으로 연결된 다당인 dextran을 합성하는 효소로, 효소 반응액에 설탕 이외의 다른 탄수화물이 첨가될 경우, 설탕의 포도당 단위를 첨가한 탄수화물에 전달하여 올리고당을 합성하기도 한다(3,9,14,17-20). 이때 첨가한 탄수화물을 수용체(acceptor)라 하며, 이 반응을 수용체 반응(acceptor reaction)이라 한다.

지금까지 포도당으로 구성된 대부분의 올리고당은 주로 한가지의 연결 구조로 구성된 당들이며 α -(1 \rightarrow 4)와 α -(1 \rightarrow 6)의 복합적인 구조의 올리고당은 거의 없다. 또한 효소반응에 의한 생산으로 효소의 생산비용의 증가 등의 경제성의 문제점을 안고 있다. 따라서 고정화 효소를 이용한다면 효소의 반복사용으로 효소비용의 절감, 효소의 안정성 향상과 연속공정의 도입으로 생산성의 향상효과를 기대할 수 있다(1,22)

본 연구자는 dextranase의 수용체로 α -amylase의 가수분해에 의해 녹말로부터 생산된 산물을 이용하여, 다양한 크기의 α -(1 \rightarrow 4)결합에 α -(1 \rightarrow 6)으로 포도당이 연결된 올리고당을 연속적으로 생산하기 위해 충전형 반응기와 교반형 반응기를 비교하였으며, 이렇게 생성된 새로운 구조의 올리고당의 특성을 확인하였다.

* Corresponding Author : Department of Biochemical Engineering
Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea
Tel . 062-530-1844, Fax : 062-530-1849
E-mail: dmkim@pasteur.chonnam.ac.kr

재료 및 방법

균주 및 배양조건

본 연구에서 dextransucrase(EC.2.4.1.5)를 얻기 위해 사용한 *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMCM은 *L. mesenteroides* B-512FMCM를 포항가속기의 진공자외선(VUV)을 사용하여 얻은 변이주로, 구성적으로 dextransucrase를 생산한다(6). *L. mesenteroides* B-512FMCM의 배양은 발효조(Bio-G8, Hanil R&D, Seoul)를 이용하여 탄소원으로 2%(w/v) 포도당이나 2%(w/v) 설탕을 포함한 LM배지(1 L의 증류수 당 4 g yeast extract, 2 g peptone, 0.2 g MgSO₄·7H₂O, 0.01 g NaCl, 0.01 g FeSO₄·7H₂O, 0.01 g MnSO₄·H₂O, 0.015 g CaCl₂·2H₂O)를 사용하였고 pH는 5.2, 온도는 28℃를 유지하였다(3). *Staphylococcus aureus* ATCC 14776은 미국 루이지애나 주립대학교 Dr. Day로부터 분주받았고, *Streptococcus mutans* 6715는 미국 아이오와 주립대학교 Dr. Roby으로부터 분주받았다. *S. aureus* ATCC 14776은 nutrient배지를 성장배지로 사용하였고(7), *S. mutans* 6715는 brain heart infusion(BHI)배지를 이용하였다(7).

재료

올리고당 생산용 설탕은 상업용 백설탕(Cheil Jedang, Korea)을 사용하였으며, 녹말은 가용성 녹말(Yakuri Pure Chemical Co, Japan)을 100℃에서 15분간 호화시킨 후 정제하지 않고 사용하였다. α -Amylase는 테평양기술연구소에서 제공받았다. Na-alginate (Low viscosity, A-2033)는 Sigma사에서 구입하였다. 효모는 Perfect Rise Yeast(SAF, U S A)를 이용하였다. 그 밖의 시약들은 일반 시약 등급을 사용하였다.

효소활성 측정

고정화 dextransucrase의 활성은 과당을 표준물질로 하여 환원당 분석법(11,18)으로 확인하였으며, 효소의 IU는 1분당 설탕에서 해리되는 과당의 μ mol수로 정하였다(11). 고정화 α -amylase의 활성은 maltose를 표준물질로 하여 환원당 분석법으로 확인하였으며, 효소의 IU는 1분당 녹말에서 해리되는 maltose의 μ mol수로 정하였다(2). 효소반응은 28℃에서 수행하였으며 20 mM Na-acetate 완충용액(pH 5.2, 0.1%-v/v, Tween 80, 10 mM CaCl₂)을 사용하였다(3).

Dextransucrase와 α -amylase의 혼합효소를 함께 고정화한 비드

탄소원으로 2%(w/v)의 설탕을 이용한 LWS배지(4)에서 얻은 dextransucrase(350 U)와 α -amylase(25000 U)의 혼합효소를 3%(w/v) Na-alginate용액과 혼합한 후 기포제거를 위해 4℃에서 2시간 동안 보관하고, 2%(w/v) CaCl₂ 용액에 적하하였다. 이후 비드의 강도 강화를 위해 2시간 더 교반 후 사용하였다.

Dextransucrase와 α -amylase를 따로 고정화한 비드 혼합

탄소원으로 2%(w/v)의 설탕을 이용한 LWS배지에서 얻은 dextransucrase(350 U)와 α -amylase(25000 U)를 3%(w/v) Na-alginate와 2%(w/v) CaCl₂를 이용하여 따로 고정화시킨 후, 고정화 dextransucrase와 고정화 α -amylase의 활성을 250 U대 2500 U이 되도록 혼합하여 사용하였다(3).

고정화 효모준비

40 mL의 25%(w/v) 효모 현탁액을 3%(w/v) Na-alginate용액 100 mL와 섞은 후, 기포 제거를 위해 4℃에서 30분 동안 보관하고, 이 혼합용액을 2%(w/v) CaCl₂ 용액에 적하한 후 비드 강도 강화를 위해 2시간 더 교반 후 사용하였다.

연속반응(Continuous Flow Reaction)공정

고정화 혼합효소를 이용하여 올리고당을 연속적으로 생산하기 위하여 충전식과 교반식을 이용하였다. 350 U의 dextransucrase와 25000 U의 α -amylase를 고정화시킨 후, 충전형 반응기(4.8×40 cm, Bioreactor, Kontes)와, 교반식 반응기(2 L Flask)에서 반응하였다. 교반식 반응은 교반기(Stirring Hot Plate, Corning)를 사용하였으며, 교반속도는 비드와 용액이 잘 섞일 정도로 하였다. 반응기의 온도는 28℃로 유지하였으며, 5%(w/v) 설탕과 2.5%(w/v) 녹말이 혼합된 기질을 연동펌프(Cassette Tube Pump SMP-23, EYELA)를 이용하여 1.5 mL/min으로 공급하였다. 이때 설탕과 녹말은 4.5 g/hr, 2.3 g/hr로 공급된다.

회분식 반응(Batch Reaction)공정

350 U의 dextransucrase와 25000 U의 α -amylase를 혼합하여 고정화시킨 후, 2 L flask에서 5%(w/v) 설탕과 2.5%(w/v) 녹말이 혼합된 기질을 28℃에서 반응하였다. 설탕의 농도를 thin layer chromatography(TLC)를 이용하여 확인하였으며, 97% 이상 반응하면 생성물을 회수한 후 비드를 다시 재 사용하였다

올리고당의 회수 및 성분분석

고정화 효모를 이용하여 단당과 maltose를 18시간 동안 제거한 후, 반응기내에 남아있는 다당은 에탄올이 66%(v/v)가 되도록 천천히 넣어주고, 냉장고에서 2시간 정도 보관한 후, 원심분리하여 회수하였다. 상등액의 에탄올을 증발기(EYELA, Japan)로 증발시키고 남은 올리고당을 회수하였다. 올리고당의 수율은 공급된 기질의 양을 100으로 하고 여기에서 glucose(G), maltose(M), 그리고 66% 에탄올로 침전시킨 다당(P)을 제외한 나머지 양으로 환산하였다. 올리고당의 구성성분의 종류와 양은 시료들 1 μ 씩 취하여 Whatman K5F TLC plate에 점적한 후, nitromethane/water(85/15, v/v) 혹은 nitromethane/1-propanol/water(2/5/2, v/v/v)를 전개 용매로 2번 전개한 후 0.3%(w/v) N-1-naphthylethylenediamine과 5%(v/v) 황산을 함유한 메탄올을 이용하여 발색한 후, 각 당의 표준물질을 기준으로 NIH Image Program을 이용하여 분석하였다(3,9,18).

올리고당 생산수율(%) =

$$\left(\frac{\text{전체 탄수화물양(g)} - (G + M + P)\text{양(g)}}{0.48 \times \text{설탕양(g)} + \text{녹말양(g)}} \times 100 \right)$$

*S. mutans*의 성장에 미치는 올리고당의 영향

새로운 구조의 올리고당 첨가가 *S. mutans*의 성장 중 pH의 변화를 억제하는지 알아보기 위하여 BHI배지에 올리고당 시료를 0.5%(w/v)의 농도로 첨가한 후, 24시간 배양된 *S. mutans* 6715를 1%(v/v) 접종하고, 37℃에서 정지 배양하면서 pH의 변화를 관찰하였다(4,7).

Table 1. Relative activity of immobilized bead of dextranucrase prepared from LWG or LWS culture and immobilized bead of α -amylase.

Activity	Relative dextranucrase activity(%)		Relative α -amylase activity(%)
	LWG culture ^a	LWS culture ^b	
Bead ^c	21	71	10
Leakage ^d	55	20	76
Activity loss ^e	24	9	25

^a LWG culture : LM + 2%(w/v) of glucose

^b LWS culture : LM + 2%(w/v) of sucrose

^c Activity in bead = $\left(\frac{\text{Immobilized enzyme activity}}{\text{Free enzyme activity}} \times 100 \right)$

^d Activity loss during bead formation =

$$\left(\frac{\text{Enzyme activity in CaCl}_2 \text{ solution}}{\text{Free enzyme activity}} \times 100 \right)$$

^e Activity loss during reaction = 100 - (Bead + Leakage)

S. aureus의 성장에 미치는 올리고당의 영향

S. aureus ATCC 14776의 성장에 미치는 올리고당의 영향을 알아보기 위하여 각 올리고당 시료를 0.5%(w/v)의 농도로 첨가한 nutrient 배지에 48시간 배양된 각 균을 1%(v/v) 접종하고, 37°C에서 3일간 정지 배양하였다. 세포성장 정도는 배양이 끝난 후 흡광도(A_{660nm})를 측정하여 비교하였다(4,7).

결과 및 고찰

고정화 효소의 활성 비교

LWG배지와 LWS배지에서 얻은 각각의 dextranucrase를 이용하여 준비한 비드의 활성은 LWS배지에서 얻은 dextranucrase의 경우 비드 제조 전의 dextranucrase 활성의 71%로 LWG에서 얻은 dextranucrase로 만든 비드의 활성보다 3.3배 높았다(Table 1). 비드제조 과정에서 비드 밖으로 유출(leakage)된 dextranucrase의 활성은 CaCl₂용액에 있게 된다. LWG의 경우 CaCl₂용액에 있는 dextranucrase의 활성은 LWS의 경우보다 2.8배 높았다. 비드 제조과정에서 불활성화되었거나 기질 확산저항으로 인하여 감소된 dextranucrase 활성은 LWG의 경우가 LWS의 경우보다 2.7배 높았다. 이는 LWS배지에서 효소생산시 생산된 dextran이 비드 제조중 dextranucrase의 안정성뿐만 아니라, 비드 밖으로 dextranucrase가 유출되는 것을 막아주기 때문이다(12, 13). LWS배지에서 생성된 dextran은 dextranucrase와는 달리 α -amylase의 유출방지에는 영향을 주지 못하여 비드 제조과정에서 α -amylase 안정성은 매우 낮았다.

반응온도 및 pH의 영향

고정화 dextranucrase와 α -amylase의 반응최적 온도와 pH는 Figure 1과 Figure 2에 나타내었다. 반응최적 온도는 각각 28°C와 37°C이었고, 반응최적의 pH는 각각 5.2와 4.5로 고정화 전과 같았다(2,3). 따라서 이후 dextranucrase 수용체반응을 활성화시켜 올리고당의 생산수율을 증가시키기 위하여 고정화 반응조건은 28°C와 pH 5.2에서 하였다.

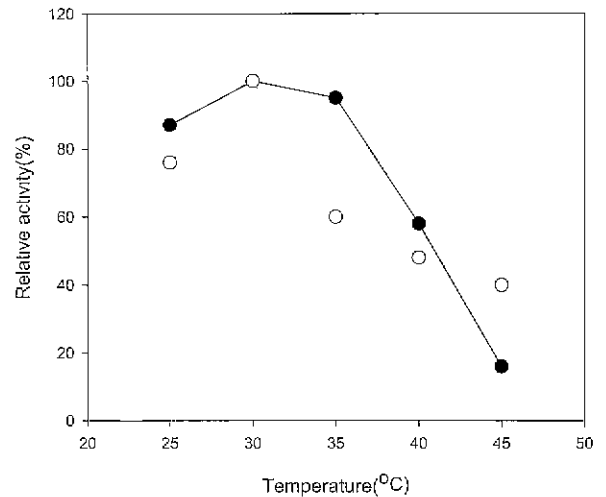


Figure 1. The effect of reaction temperatures on activities of immobilized dextranucrase and α -amylase beads at pH 5.2 (●: immobilized dextranucrase bead activity, ○: immobilized α -amylase bead activity).

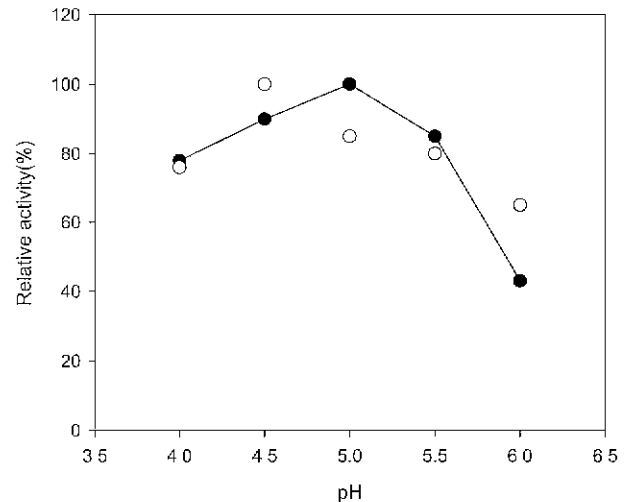


Figure 2. The effect of reaction pHs on activities of immobilized dextranucrase and α -amylase beads at 28°C (●: immobilized dextranucrase bead activity, ○: immobilized α -amylase bead activity)

층전형 반응기(Packed-Bed Reactor)

Dextranucrase와 α -amylase의 혼합효소를 함께 고정화한 비드를 이용한 올리고당 생산

5%(w/v) 설탕과 2.5%(w/v) 녹말이 혼합된 기질의 공급속도에 따른 올리고당의 생산수율과 전환율은 Table 2와 같다. 유속이 1.5 mL/min에서 7.5 mL/min으로 증가하면 설탕의 전환율은 96.0%에서 57.8%로, 녹말의 전환율은 98.0%에서 60.4%로 감소하였다. 혼합기질을 1.5 mL/min으로 공급하였을 경우 올리고당 생산수율은 56.9%로 가장 높았으며, 유속이 증가할수록 올리고당 생산수율은 감소하였다. 고정화 효소의 활성이 일정할 경우 기질의 공급속도가 낮으면 반응기 내에서 기질의 체류시간이 길어져 고정화 효소와 충분히 반응이 일어나는 반면, 공급속도가 높으면 체류시간이 짧아져 반응하지 않은 기질의 농도가 증가하게 된다[1]. 따라서 유속이 커질수록 올리고당 생산수율은 감소한다. 유속이 증가할수록 maltotriose는 증가하였지만 그 수용체

Table 2. The yield and conversion percentile of sucrose(5%-w/v) and starch(2.5%-w/v) at different flow rate by immobilized mixed-enzyme bead in packed-bed reactor with dextransucrase(250U) and α -amylase (2500U)

Flow rate (mL/min)	Oligosaccharides yield(%)	Conversion(%)	
		Sucrose	Starch
1.5	56.9	96.0	98.0
3.0	47.6	82.6	86.4
4.5	32.7	77.2	83.2
6.0	27.5	69.6	80.5
7.5	18.6	57.8	60.4

$$\text{Oligosaccharides yield}(\%) = \left(\frac{\text{Oligosaccharides}(g)}{0.48 \times \text{Sucrose}(g) + \text{Starch}(g)} \times 100 \right)$$

$$\text{Conversion}(\%) = \left(\frac{\text{Substrate In}(g) - \text{Substrate Out}(g)}{\text{Substrate In}(g)} \times 100 \right)$$

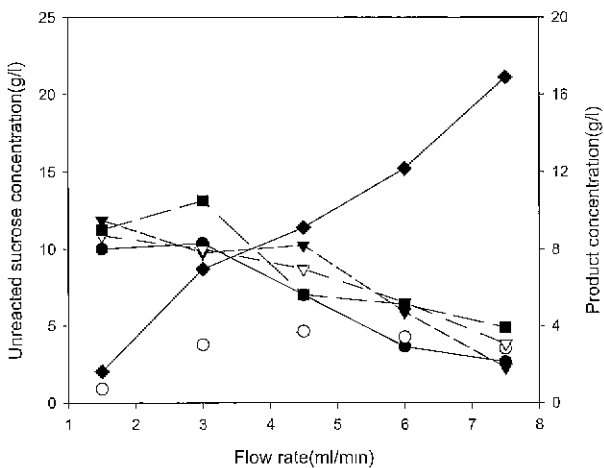


Figure 3. The effect of flow rate on unreacted sucrose and product concentration in packed-bed reactor by immobilized mixed-enzyme bead with dextransucrase(250U) and α -amylase(2500U) using sucrose(5%-w/v) and starch(2.5%-w/v) (◆: sucrose, ●: maltose, ○: maltotriose, ▼: panose, ▽: 6³- α -glucosylmaltotriose, ■: 6²- α -isomaltosylmaltose. The amounts of products were measured after TLC using NIH Image program).

산물인 6³- α -glucosylmaltotriose는 감소하였다. 그리고 maltose와 panose는 감소하였지만 6²- α -isomaltosylmaltose는 증가하다가 3.0 mL/min 이상부터 감소하였다(Figure 3). 유속이 1.5 mL/min 일 경우 6²- α -isomaltosylmaltose의 양이 낮은 것은 이 당이 다시 dextransucrase의 수용체로 작용했기 때문이다(3,18).

Dextransucrase와 α -amylase를 따로 고정화한 비드를 혼합한 방법을 이용한 올리고당 생산

5%(w/v) 설탕과 2.5%(w/v) 녹말이 혼합된 기질의 공급속도에 따른 올리고당 생산수율과 전환율은 Table 3과 같다. 유속이 1.5 mL/min에서 7.5 mL/min으로 증가하면 설탕의 전환율은 98.0%에서 52.6%로, 녹말의 전환율은 93.2%에서 58.4%로 감소하였다. 혼합기질을 1.5 mL/min로 공급하였을경우 48.1%로 올리고당 생산수율이 가장 높았다. 혼합효소를 고정화한 비드 방법이 dextransucrase와 α -amylase를 따로 고정화한 비드를 혼합한 방법보다 올리고당 생산수율이 1.2배 높았다. 유속이 증가할수록

Table 3. The yield and conversion percentile of sucrose(5%-w/v) and starch(2.5%-w/v) at different flow rate by each immobilized bead mixture of dextransucrase(250U) and α -amylase(2500U) in packed-bed reactor.

Flow rate (mL/min)	Oligosaccharides yield(%)	Conversion(%)	
		Sucrose	Sarch
1.5	48.1	98.0	93.2
3.0	42.3	86.0	85.6
4.5	29.8	78.6	83.6
6.0	26.6	60.4	79.2
7.5	20.4	52.6	58.4

$$\text{Oligosaccharides yield}(\%) = \left(\frac{\text{Oligosaccharides}(g)}{0.48 \times \text{Sucrose}(g) + \text{Starch}(g)} \times 100 \right)$$

$$\text{Conversion}(\%) = \left(\frac{\text{Substrate In}(g) - \text{Substrate Out}(g)}{\text{Substrate In}(g)} \times 100 \right)$$

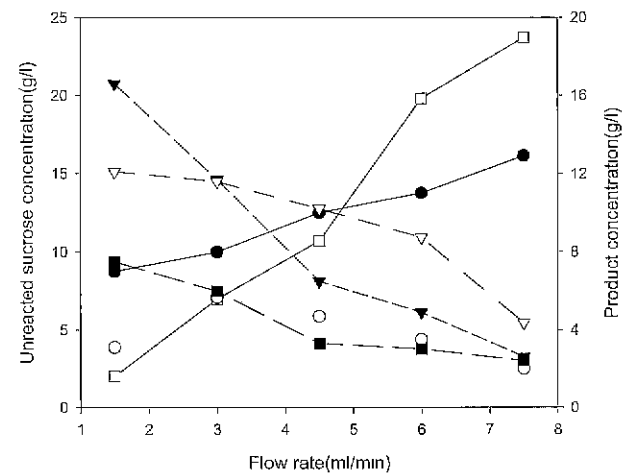


Figure 4. The effect of flow rate on unreacted sucrose and product concentration in packed-bed reactor by each immobilized bead mixture of dextransucrase(250U) and α -amylase(2500U) using sucrose(5%-w/v) and starch(2.5%-w/v) (□: sucrose, ●: maltose, ○: maltotriose, ▼: panose, ▽: 6³- α -glucosylmaltotriose, ■: 6²- α -isomaltosylmaltose. The amounts of products were measured after TLC using NIH Image program).

설탕과 녹말의 전환율은 감소하였는데도 maltose는 증가하였고, maltotriose는 증가하다가 3 mL/min 이상부터 감소하였다(Figure 4). 혼합효소를 함께 고정화한 비드방법과 비교하여 설탕과 녹말의 전환율에는 큰 차이가 없었으나, panose나 6³- α -glucosylmaltotriose와 같은 1차 수용체 산물은 증가하였으며, 2차 수용체 산물인 6²- α -isomaltosylmaltose는 감소하였다. 이는 혼합효소를 함께 고정화한 비드방법이 dextransucrase와 α -amylase 두 효소를 따로 고정화한 비드를 혼합한 방법보다 수용체 반응이 원활하기 때문으로 생각된다. 즉 따로 고정화시킨 비드를 혼합한 반응은 녹말의 분해산물이 dextransucrase의 비드내로 확산되어 수용체로 작용하여야 하는데 이 과정이 원활하지 않은 것으로 생각된다

연속식 충전형 반응(Continuous Flow Packed-Bed Reaction)을 이용한 올리고당 생산

올리고당 생산수율이 더 높은 혼합효소를 함께 고정화한 비드를 이용하여 올리고당을 연속적으로 생산하였다. 설탕과 녹말의

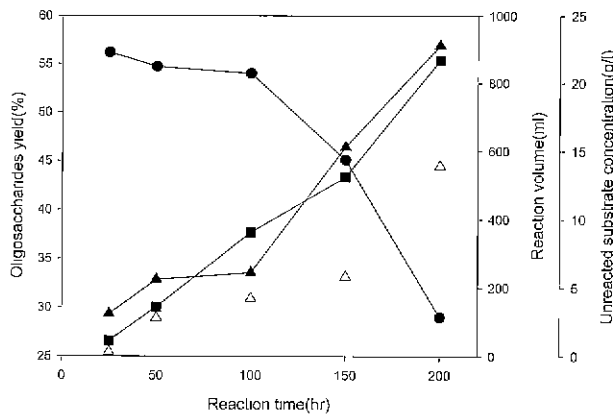


Figure 5. Stability of immobilized mixed-enzyme bead activities of dextranucrase(250U) and α -amylase(2500U) in packed-bed reactor using sucrose(5%-w/v) and starch(2.5%-w/v) (● oligosaccharides yield, ■: reaction volume, ▲, sucrose concentration, △ starch concentration. The amounts of products were measured after TLC using NIH Image program)

농도는 5%(w/v), 2.5%(w/v)를 사용하였으며, 1.5 mL/min로 기질 공급속도를 유지하였다. 올리고당 생산수율은 150시간 경과한 후에는 45.1%로 초기 생산수율의 80.3%를 유지하였으며, 200시간 경과 후에는 초기 생산수율의 51.9%를 유지하였다(Figure 5) 따라서 충전형 반응기에서 고정화 혼합효소의 반감기는 약 200시간이었다. 반응 중 비드내에는 dextran합성으로 인하여 비드가 팽창하여 100시간 경과 이후에는 초기반응부피보다 1.9배 증가하였으며, 200시간 경과 이후에는 3.2배까지 증가하였다. 반응시간이 증가하면서 비드의 팽창으로 기질 확산저해, 반응도중 효소의 불활성화, 효소의 유출 등으로 올리고당 생산수율은 떨어졌다. 그러나 충전형 반응기에서 혼합효소 고정화비드의 활성 반감기는 약 200시간으로 올리고당을 연속적으로 생산하기 위한 충전형 반응기의 활용 가능성을 생각할 수 있었다.

교반식 반응기(Stirred-Tank Reactor)

Dextranucrase와 α -amylase의 혼합효소를 함께 고정화한 비드를 이용한 올리고당 생산

5%(w/v) 설탕과 2.5%(w/v) 녹말이 혼합된 기질의 공급속도에 따른 올리고당의 생산수율과 전환율은 Table 4와 같다. 유속이 1.5 mL/min에서 7.5 mL/min으로 증가하면 설탕의 전환율은 97.4%에서 45.0%로, 녹말의 전환율은 91.0%에서 62.0%로 감소하였다. 혼합기질을 1.5 mL/min 속도로 공급하였을 경우 올리고당 생산수율은 62.1%로 충전형 반응기의 56.9%보다 다소 높았다. 충전형 반응기의 혼합효소를 함께 고정화한 비드를 이용한 반응처럼 기질공급 속도가 증가할수록 maltose는 감소하였으며, maltotriose는 증가하였다(Figure 6). 그리고 panose나 6³- α -glucosylmaltotriose는 감소하였으며, 6²- α -isomaltosylmaltose는 증가하다가 3.0 mL/min부터 감소하였다. 교반식 반응기는 충전형 반응기와 비교하여 기질공급속도에 따라 생성물의 종류분포는 비슷하였으나, 기질공급속도가 1.5 mL/min일 경우 올리고당 생산수율은 1.1배 높았다. 이는 충전형 반응기는 비드층으로 인하여 기질과 생성물의 농도구배가 생기기 때문에 반응이 진행되면서 수용체 산물을 분해하고, 비드 충전에 의한 압력 등으로 교

Table 4. The yield and conversion percentile of sucrose(5%-w/v) and starch(2.5%-w/v) at different flow rate with immobilized mixed-enzyme bead with dextranucrase(250U) and α -amylase(2500U) in stirred-tank reactor

Flow rate (mL/min)	Oligosaccharides yield(%)	Conversion(%)	
		Sucrose	Starch
1.5	62.1	97.4	91.0
3.0	55.1	92.1	85.2
4.5	45.0	67.8	83.6
6.0	38.9	64.6	75.6
7.5	26.6	45.0	62.0

$$\text{Oligosaccharides yield}(\%) = \left(\frac{\text{Oligosaccharides}(\text{g})}{0.48 \times \text{Sucrose}(\text{g}) - \text{Starch}(\text{g})} \times 100 \right)$$

$$\text{Conversion ratio}(\%) = \left(\frac{\text{Substrate In}(\text{g}) - \text{Substrate Out}(\text{g})}{\text{Substrate In}(\text{g})} \times 100 \right)$$

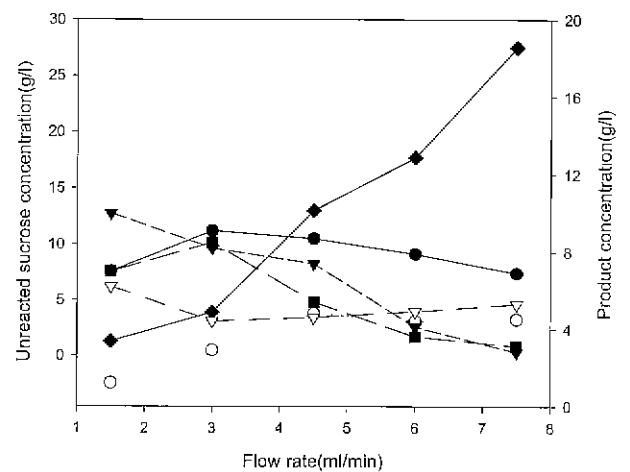


Figure 6. The effect of flow rate on unreacted sucrose and product concentration in stirred-tank reactor by immobilized mixed-enzyme bead of dextranucrase(250U) and α -amylase(2500) using sucrose(5%-w/v) and starch(5%-w/v) (◆: sucrose, ●: maltose, ○: maltotriose, ▼: panose, ▽: 6³- α -glucosylmaltotriose, ■: 6²- α -isomaltosylmaltose. The amounts of products were measured after TLC using NIH Image program).

반식 반응기와 비교하여 반응이 원활하지 않은 것으로 생각된다.

Dextranucrase와 α -amylase를 따로 고정화한 비드를 혼합한 방법을 이용한 올리고당 생산

5%(w/v) 설탕과 2.5%(w/v) 녹말이 혼합된 기질의 공급속도에 의한 올리고당 생산수율과 전환율은 Table 5와 같다. 유속이 1.5 mL/min에서 7.5 mL/min으로 증가할수록 설탕의 전환율은 95.0%에서 58.2%로, 녹말의 전환율은 91.0%에서 59.6%로 감소하였다. 혼합기질용액을 1.5 mL/min로 공급하였을 경우 올리고당 생산수율은 59.1%로 혼합효소를 함께 고정화한 비드방법의 62.1%보다 다소 낮았다. 생산물은 충전형 반응기에서 두 효소를 따로 고정화한 비드를 혼합한 방법처럼 maltose는 증가하였으며, panose와 6³- α -glucosylmaltotriose는 감소하였다(Figure 7). 교반식 반응기도 충전형 반응기처럼 혼합효소를 함께 고정화한 비드를 이용한 방법이 두 효소를 따로 고정화한 비드를 혼합한 방법보다 올리고당을 생산하는데 더 적합하였다.

Table 5. The yield and conversion percentile of sucrose(5%-w/v) and starch(2.5%-w/v) at different flow rate by each immobilized bead mixture of dextranucrase(250U) and α -amylase(2500U) in stirred-tank reactor

Flow rate (mL/min)	Oligosaccharides yield(%)	Conversion(%)	
		Sucrose	Starch
1.5	59.1	95.0	91.0
3.0	51.4	90.0	84.0
4.5	43.4	81.4	78.4
6.0	32.2	68.8	75.6
7.5	24.7	58.2	59.6

$$\text{Oligosaccharides yield (\%)} = \left(\frac{\text{Oligosaccharides (g)}}{0.48 \times \text{Sucrose (g)} + \text{Starch (g)}} \times 100 \right)$$

$$\text{Conversion (\%)} = \left(\frac{\text{Substrate In (g)} - \text{Substrate Out (g)}}{\text{Substrate In (g)}} \times 100 \right)$$

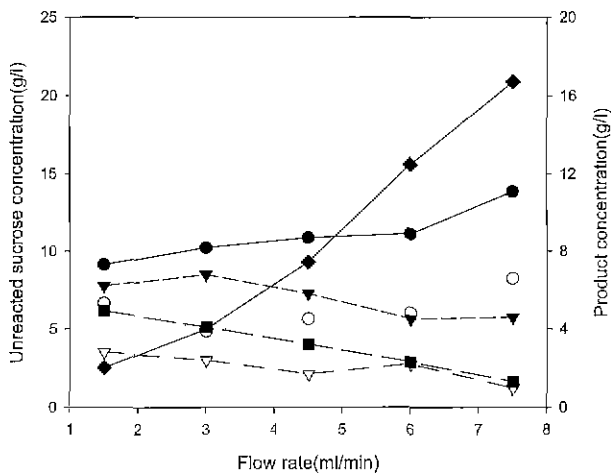


Figure 7. The effect of flow rate of unreacted sucrose and product concentration in stirred-tank reactor by each immobilized bead mixture of dextranucrase(250U) and α -amylase(2500U) using sucrose(5%-w/v) and starch(2.5%-w/v) (◆: sucrose, ●: maltose, ○: maltotriose, ▼: panose, ▽: 6³- α -glucosylmaltotriose, ■: 6²- α -isomaltosylmaltose). The amounts of products were measured after TLC using NIH Image program).

연속식 교반형 반응(Continuous Flow Stirred-Tank Reaction)을 이용한 올리고당 생산

교반식 반응기에서의 혼합효소를 함께 고정화한 비드를 연속 사용에 대한 효소의 안정성을 충전형 반응기와 비교하였다. 설탕과 녹말의 농도는 각각 5%(w/v), 2.5%(w/v)로 하였으며, 1.5 mL/min로 혼합기질을 공급하였다. 혼합효소를 함께 고정화한 비드는 150시간 경과한 후에 올리고당 생산수율이 36.1%로 반응 초기 생산수율의 57.4%를 유지하였으나, 200시간 경과 후에는 6.1%로 급격히 떨어져 초기 생산수율의 9.8%를 유지하였다 (Figure 8). 또한 200시간 이상 사용하였을 경우 비드는 파괴되었다. 이는 충전형 반응기가 200시간 경과 후에도 반응초기 생산수율의 51.9%를 유지한 것과 비교하면 교반식 반응기가 매우 불안정함을 보여준다. 즉 교반식 반응기는 충전형 반응기와 비교하여 반응 초기에는 올리고당 생산수율은 높으나, 연속사용에 대한 안정성은 매우 떨어졌다. 이것은 비드내에 생성된 dextran으로 인하여 비드가 팽창하고 이후 교반에 의한 외부적인 힘이 비드의 안정성에 큰 영향을 주는 것으로 판단된다. 따라서

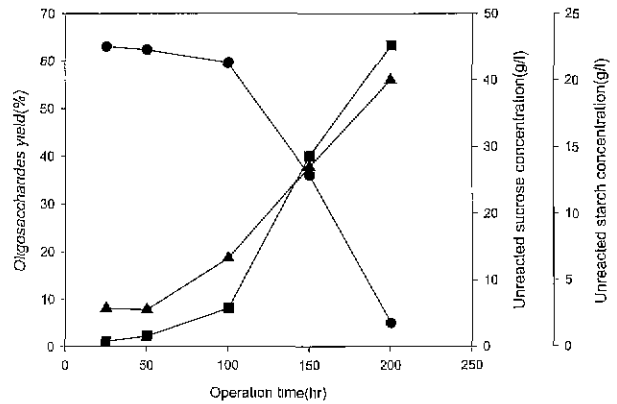


Figure 8. Stability of immobilized mixed-enzyme bead activities of dextranucrase (250U) and α -amylase(2500U) in stirred-tank reactor using sucrose(5%-w/v) and starch(2.5%-w/v) (●: oligosaccharides yield, ▲: sucrose concentration, ■: starch concentration). The amounts of products were measured after TLC using NIH Image program).

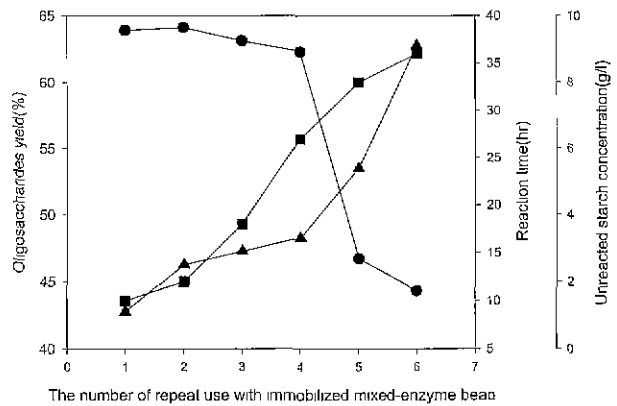


Figure 9. Stability of immobilized mixed-enzyme bead of dextranucrase (250U) and α -amylase(2500U) activities at sucrose(5%-w/v) and starch (2.5%-w/v) for repeated uses (●: oligosaccharides yield, ■: reaction time, ▲: starch concentration). The amounts of products were measured after TLC using NIH Image program)

올리고당을 연속적으로 생산하는데 있어서는 교반식 반응기보다 충전형 반응기가 더 적합하였다.

Dextranucrase와 α -amylase의 혼합효소를 함께 고정화한 비드의 재사용에 대한 안정성

교반식 반응기에서 혼합효소를 함께 고정화한 비드의 반복사용에 대한 안정성을 알아보기 위해 5%(w/v) 설탕과 2.5%(w/v) 녹말의 혼합기질을 사용하였다. 설탕이 97%(w/v) 이상 분해되었으면 반응을 멈추고 새로운 혼합기질을 넣어 반응시켰다. 고정화 효소를 4번 재 사용하였을 경우 올리고당 생산수율은 62.3%로 초기 생산수율의 97.5%의 안정성을 보였다(Figure 9). 그 이상 사용하였을 때는 급격히 수율이 떨어졌다. 첫번째 반응에서는 설탕을 다 분해하는데 10시간이 걸렸으나, 6번째 재사용에서는 36시간으로 반응시간이 3.6배 증가하였다. 반응기안의 잔류 녹말 농도는 4번째 재사용 이후부터 급격히 증가하였다. 따라서 충전형 반응기에서 혼합효소를 고정화한 방법이 올리고당을 연속적으로 생산하는데 가장 적합하였다.

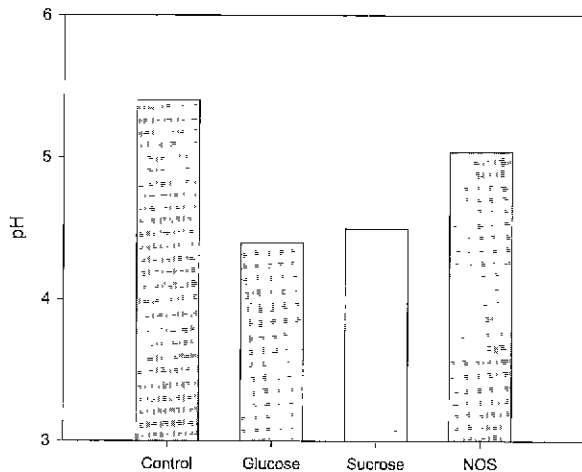


Figure 10. The pH changes in the cultures of *Streptococcus mutans* on various carbon sources (Control: no sugar, NOS: new structured-oligosaccharides).

새로운 구조의 올리고당이 *S. mutans* 성장에 미치는 영향

충치균으로 알려진 *S. mutans*은 구강 내에서 설당을 이용하여 insoluble glucan을 형성하는 mutansucrase를 생산하며, 치아 표면에 부착하여 젖산발효를 한다. 구강 내의 pH가 5 이하로 떨어지면 에나멜질의 용해도가 급격히 증가하게 되는데, 생성된 젖산이 치아의 에나멜질을 용해하여 치아를 부식하므로써 충치를 발생시킨다(4,7). *S. mutans*를 각종 당이 함유된 배지에서 배양하여 pH의 변화를 확인하고 그 결과를 Figure 10에 나타내었다. 48시간 배양 후 어떤 당도 첨가하지 않는 대조구는 pH 5.4로 유지되었고, glucose와 설당에서 배양한 *S. mutans*는 pH가 4.4까지 급격히 떨어짐을 확인하였으나, 새로운 구조의 올리고당을 이용한 *S. mutans*은 pH 5.0에 도달하였고 그 이하로는 떨어지지 않았다. 이는 새로운 구조의 올리고당이 *S. mutans*의 성장을 억제하여 균 성장시 생성하는 산의 생성량이 줄어 배양액의 pH가 5로 유지되어 새로운 구조의 혼합올리고당의 충치 발생억제 효과가 기대된다.

올리고당이 *S. aureus*의 성장에 미치는 영향

*S. aureus*는 그람양성의 무포자 세균으로 공기, 물, 우유와 동물의 장관 및 호흡기 등에 광범위하게 존재하면서 엔테로톡신이라는 독소를 생성하는 식중독의 원인균이다. 또한 내염성이 강하여 염장식품에서도 잘 생육하며, 반건조 식품 등과 같이 수분활성도가 낮은 식품뿐만 아니라 육·유가공품 등 거의 모든 식품에서 식중독을 일으키는 것으로 보고되어지고 있다(5). *S. aureus*를 여러 가지 탄소원에서 각각 3일간 정치 배양하여 흡광도(A_{660nm})를 측정된 후 비교한 결과를 Figure 11에 나타내었다. 설당을 이용한 *S. aureus*의 성장정도는 glucose의 184%로 가장 왕성하였고, 새로운 구조의 올리고당을 이용한 성장정도는 glucose의 60%로 낮았다. 이는 새로운 올리고당을 이용하여 장내 유해한 세균인 *S. aureus*의 성장률을 줄임으로써 상대적으로 장내 유용세균의 증식을 촉진시켜 정장 효과를 볼 수 있으리라 기대된다.

요 약

5%(w/v)의 설당과 2.5%(w/v)의 녹말로 구성된 혼합기질용액을

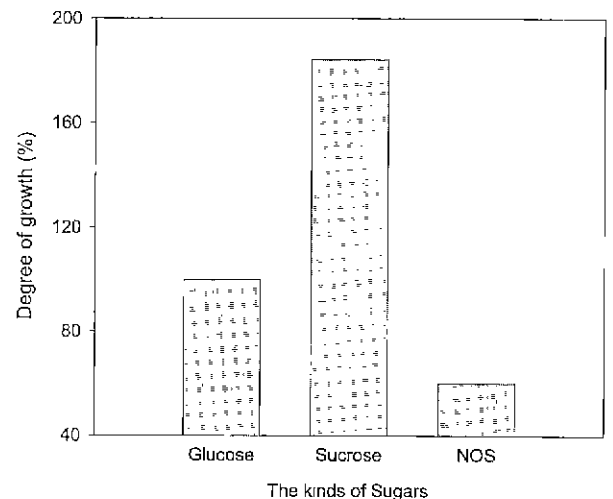


Figure 11. The growth of *Staphylococcus aureus* on various carbon sources (Control: no sugar, NOS: new structured-oligosaccharides).

Degree of growth(%) =

$$\left(\frac{\text{OD at the test sugar} - \text{OD at no sugar}}{\text{OD at glucose} - \text{OD at no sugar}} \times 100 \right)$$

OD: optical density at 660 nm.

1.5 mL/min으로 공급하였을 때 dextransucrase와 α -amylase의 혼합효소를 함께 고정화한 비드를 이용한 방법이 두 효소를 따로 고정화한 비드를 혼합한 방법보다 올리고당 수율이 충전형 반응기에서는 12%, 교반형 반응기에서는 11% 높았다. 혼합효소를 함께 고정화한 비드를 200시간 이상 사용하였을 경우 교반식 반응기에서는 파괴되었으나, 충전형 반응기에서는 안전하였다. 따라서 올리고당을 연속적으로 생산하는데는 충전형 반응기가 더 적합하였다. 충치균인 *S. mutans*를 새로운 구조의 올리고당이 함유된 배지에서 배양하였을 때 pH가 5이하로 떨어지지 않았다. 식중독균인 *S. aureus*를 새로운 구조의 올리고당이 첨가된 배지에서 배양한 결과, glucose와 설당이 첨가된 배지보다 균 성장정도가 현저히 떨어졌다.

감사의 말

이 논문은 1998년 한국 학술진흥재단의 학술연구비에 의하여 지원되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Ahn, J. W., K. W. Park, and J. H. Seo (1997), Continuous production of isomaltooligosaccharides by immobilized transglucosidase in a packed-bed reactor. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **29**, 320-327.
- Allen, B. R. and R. W. Coughlin (1979), Fluidized-bed immobilized-enzyme reactor for the hydrolysis of corn starch to glucose. *Biotechnol. Bioeng.* **21**, 689-696.
- Baek, J. S., D. Kim, J. H. Lee, P. S. Chang, N. S. Han, and J. F. Robyt (1998), Enzymatic synthesis of new oligosaccharides using glucansucrase. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 9-186.
- Hco, S. J., D. Kim, I. S. Lee, and P. S. Chang (1999), Development of a mixed-culture fermentation process and

- characterization for new oligosaccharides and dextran using *Lipomyces starkeyi* and *Leuconostoc mesenteroides*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 304-310.
5. Kang, S. C., J. W. Yun, and T. W. Ro (1996), Effect of oligosaccharides on mannitol accumulation during fermentation of Kimchi. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **11**, 181-185.
 6. Kim, D., W. Kim, J. H. Lee, K. H. Park, L. M. Day, and D. F. Day (1997), Development of constitutive dextranase hyper-producing mutants of *Leuconostoc mesenteroides* using the synchrotron radiation in the 70-1000 eV region. *Biotechnol. Tech.* **11**, 319-321.
 7. Kim, J. R., C. Yook, H. K. Kwon, S. Y. Hong, C. K. Park, and K. H. Park (1995), Physical and physiological properties of isomaltooligosaccharides and fructooligosaccharides. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **27**, 170-175.
 8. Kim, K. S. and Y. K. Chae (1997), The effects of addition of oligosaccharide on the quality characteristics of tomato jam. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **13**, 348-354.
 9. Fu, D. and J. F. Robyt (1990), Acceptor reactions of maltodextrins with *Leuconostoc mesenteroides* B-512FM dextranase. *Arc. Biochem. Biophys.* **283**, 379-387.
 10. Djouzi, Z. and C. Andrieux (1997), Compared effects of three oligosaccharides on metabolism of intestinal in rats inoculated with a human faecal flora. *Brit. J. Nut.* **78**, 313-324.
 11. Lee, J. H., D. M. Kim, J. S. Baek, K. H. Park, N. S. Han, and J. F. Robyt (1998), Modification of starch using dextranase and characterization of the modified starch. *Kor. J. Appl. microbiol. Biotechnol.* **26**, 143-150.
 12. Lopez, A and P. Monsan (1980), Dextran synthesis by immobilized dextranase. *Biochimie.* **62**, 323-329.
 13. Martina, N. B and K. Buchholz (1996), Productivity of immobilized dextranase for leucrose formation. *Enzyme Microbial Technol.* **19**, 518-524.
 14. Oriol, E., D. Auriol, and P. Mosan (1986), Acceptor reaction of a highly purified dextranase with maltose and oligosaccharides application to the synthesis of controlled-molecular-weight. *Carbohydr. Res.* **149**, 433-441.
 15. Paek, J. H., J. Y. Yoo, O. H. Shin, H. K. Shin, S. J. Lee, and K. H. Park (1992), Growth effect of branched oligosaccharides on principal intestinal bacteria. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 237-242.
 16. Pascale, F., P. Perrin, M. Champ, F. Bornet, K. Meflahi, and J. Menanteau (1997), Short-chain fructooligosaccharides reduce the occurrence of colon tumor and develop gut-associated lymphoid in mice. *Can. Res.* **57**, 225-228.
 17. Robyt, J. F. (1995), Mechanisms in the glucanase synthesis of polysaccharides and oligosaccharides from sucrose. *Adv. Carbohydr. Chem Biochem.* **51**, 133-168.
 18. Robyt, J. F. and S. H. Eklund (1983), Relative, quantitative of effects acceptors in the reaction of *Leuconostoc mesenteroides* B-512F dextranase. *Carbohydr. Res.* **121**, 279-286.
 19. Robyt, J. F. and T. F. Walseth (1978), The mechanism of acceptor reactions of *Leuconostoc mesenteroides* B-512F dextranase. *Carbohydr. Res.* **61**, 433-445.
 20. Su, D. and J. F. Robyt (1993), Control of the synthesis of dextran and acceptor-products by *Leuconostoc mesenteroides* B-512F dextranase. *Carbohydr. Res.* **248**, 339-348.
 21. Yun, J. W., J. S. Noh, J. Y. Song, and S. K. Song (1994), Isomaltooligosaccharide production from maltose by intact cell of *Aureobasidium pullulans*. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **9**, 122-126.
 22. Yun, J. W., K. H. Suh, and S. K. Song (1995), Continuous production of fructooligosaccharides from sucrose by a dual immobilized enzyme system of fructosyltransferase and glucoseisomerase. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **10**, 9-14.