

분쇄마찰 효소반응계에서 Fungal α -Amylase를 이용한 생전분의 직접전환에 의한 Maltose 생산

이용현* · 박진서

경북대학교 자연과학대학 유전공학과

Direct Conversion of Raw Starch to Maltose in an Agitated Bead Enzyme Reactor using Fungal α -Amylase

Lee, Yong-Hyun* and Jin-Seo Park

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

Abstract — Direct conversion of raw starch without liquefaction to maltose using maltose-forming fungal α -amylase (Fungamyl) was carried out in an agitated bead enzyme reactor (bioatritor). The reaction rate in bioatritor was comparable with conventional method which utilized liquefied soluble starch. Moreover the extent of maltose formation increased substantially compared with conventional method; from 150 g/l of raw starch, around 95 g/l of maltose was formed and 72% of maltose content in sugar mixture was achieved. Especially, pH influenced greatly not only on total sugar formation from raw starch in bioatritor but also on maltose content in sugar mixture. The optimal pH for maltose formation from raw starch was shifted into the weak alkaline pH, the optimal pH of 8.0~9.0 in bioatritor contrast to pH of 5.0~5.5 for liquefied starch. The maltose formation and content were also affected by the amounts of Fungamyl added and raw starch concentration. Consumption of maltose-forming Fungamyl can be substantially reduced by supplementary addition of starch liquefying α -amylase (Term-amyl).

Maltose는 glucose 2분자가 α -1,4 glycosidic bond로 결합된 이당류로서, 감미도는 설탕의 20~30% 정도이고, 설탕과 구분되는 독특한 감미를 갖고 있다. 또한 물 또는 극성화합물과 착화합물을 형성함으로써 보수성, 보향성이 높으며, 수분활성의 저하효과가 있고, 뿐만 아니라 결정화저해, 갈변반응의 억제, 그리고 열안정성 유지작용 등 많은 특징이 있는 전분 유래의 감미료이다. 따라서 제과, 음료, 주류, 그리고 통조림 제조 등에서 부향제로서, 또한 맛의 개선과 감미를 담백하게 하기 위하여 이용되고 있다. 이외에 효소의 실활을 방지하기 위한 효소안정제, 정맥주사용 보당액, 저칼로리 감미료인 maltitol과 같은 유도체 제조

원료, 의약 및 화장품의 재료로도 활용되고 있다(1-4).

현재 maltose 생산에는 증자법이 주로 쓰이고 있는데 전분(질)에 액화효소인 내열성 α -amylase를 첨가하여 약 80~120°C에서 수시간 동안 증자하여 가용화시킨 액화전분에 maltose 생성효소인 β -amylase 또는 maltose를 주로 생성하는 α -amylase 계통효소와 debranching enzyme인 pullulanase를 첨가하여 50~55°C에서 48시간 정도 반응시켜 maltose를 생성시킨다. 이를 다시 농축 정제하여 maltose 함량이 40~60%인 고 maltose syrup, 80~95%인 분말 maltose, 그리고 95~100%인 정제 maltose 등으로 분류제조된다(1).

이와 같은 전통적인 증자법은 많은 증자열이 소요되는 에너지소모 형공정이다. 또한 생성당조성을 보면 maltose 뿐만 아니라 포도당과 malto-oligosaccharides

Key words: Maltose, raw starch, Fungamyl, β -amylase, bioatritor

*Corresponding author

가 다량 생산되어 순도와 수율이 낮다. 그리고 생성된 maltose는 물론 원료인 전분(질)도 가용상태로 있어 maltose의 분리정제가 어렵다. 또한 증자시 전분(질)이 팽윤됨으로 고농도로 첨가할 수 없어 maltose를 고농도로 생산하기 어려운 등의 단점이 있어 개선이 필요하다.

본 연구실에서는 생전분의 효소당화시 고품의 분쇄마찰매체를 첨가 교반함으로써 생전분에 대한 amylase 계통 효소의 작용을 현저히 촉진시키는 분쇄마찰 효소반응계에 관한 일련의 연구를 수행하고 있으며, 효소작용 촉진 mechanism은 생전분이 많은 작은 입자로 단편화됨에 기인함을 밝힌 바 있다(5-9).

본 연구자들은 증자액화시키지 않은 생전분을 기질로 maltose를 효소생산하는 연구를 수행하던 중, 분쇄마찰 효소반응계를 활용할 경우 높은 수율 및 고순도로 maltose를 생산할 수 있음을 확인하였으며, 특히 약 알칼리 pH 영역에서 좋은 결과를 얻었다. 여기서는 생전분으로부터 maltose를 직접 고농도, 고순도로 생성시킬 수 있는 효소반응 조건들을 확립하였으며, 그 효용성을 기존의 증자법과 비교 검토하였다.

재료 및 방법

사용효소 및 효소활성의 측정

사용효소로는 *Aspergillus oryzae* 유래의 산업용 Fungamyl(Fungal α -amylase, Novo Co.)를 주로 사용하였으며, specific activity는 4.3 units/mg(pH 5.0)였다. 또한 specific activity(pH 7.0)가 0.2 units/mg인 조맥아효소(Bacterial α -amylase, 국내 T사)와 8.4 units/mg(pH 5.0)인 고구마 유래의 정제된 β -amylase(Sigma Co.)도 병용하였다. 이 때 효소활성은 1% soluble starch를 기질로 pH 5.0 또는 7.0, 40°C에서 10분간 반응시켜 생성된 환원당을 측정 후 분당 1 μ mole의 maltose equivalent를 생성하는 효소의 양을 1 unit으로 하였다.

경우에 따라 saccharification specific activity가 46.3 units/mg인 액화형 효소인 Termamyl(Bacterial α -amylase, Novo Co.)과 specific activity 4.4 units/mg인 debranching 효소인 Promozyme(pullulanase, Novo Co.)를 보충 첨가하였다. 이 때 Termamyl 1

unit은 1% soluble starch를 기질로 pH 4.0, 40°C에서 glucose equivalent 1 μ mole을 생성하는, 그리고 Promozyme 1 unit은 pH 5.0, 40°C에서 기질인 pullulan으로부터 분당 maltotriose equivalent 1 μ mole을 생성하는 효소량으로 하였다.

사용전분, 분쇄마찰매체 및 완충용액

전분은 corn starch(Hayashi Co.)를 주로 사용하였고, 분쇄마찰매체는 직경 3 mm의 유리구(glass bead)로 그 물리적 양상은 전보(5)와 같다. 완충용액은 pH 5.0, 6.0 그리고 7.0은 50 mM wide-range buffer를 pH 8.0, 9.0 그리고 10.0은 50 mM boric acid-NaOH buffer를 사용하였다.

분쇄마찰 효소반응계에서 생전분으로부터의 Maltose 생산

생전분의 직접전환에 의한 maltose 생산은 옥수수 전분 150 g/l(50 mM boric acid-NaOH buffer, pH 8.0) 현탁액에 유리구 600 g/l를 첨가한 후 Fungamyl 1,100 units/l를 첨가하여 50°C에서 250 rpm으로 교반하면서 반응시켰다. 경우에 따라 기질첨가량, 효소첨가량, 그리고 효소의 종류를 달리하였으며, Fungamyl외에 Termamyl이나 Promozyme를 보충 첨가하였다.

증자액화전분으로부터의 Maltose 생산

증자액화전분으로부터의 maltose 생산은 옥수수 전분 150 g/l(50 mM sodium citrate buffer, pH 5.0)의 현탁액에 α -amylase 5,600 units/l를 첨가하여 100°C에서 20분간 증자액화시킨 후, 증자액화된 전분액을 50°C에서 Fungamyl 280 units/l를 첨가하여 효소반응시켰다.

분석방법

환원당은 DNS(3,5-dinitrosalicylic acid)법(10)으로, 당조성과 maltose의 정량은 HPLC(Gilson Co.)를 사용하였고, column은 carbohydrate analysis column(Waters Co.)으로 65 대 35의 acetonitrile/water 혼합용매로 1 ml/min로 용출하면서 RI detector로 검출하였다. Soluble protein은 bovine serum albumin을 표준물질로 한 Lowry법(11)으로 측정하였다.

결과 및 고찰

분쇄마찰매체 함유 불균일상 효소반응계를 활용한 생전분의 직접전환에 의한 Maltose 생산

Fig. 1은 분쇄마찰매체 함유 불균일상 효소반응계에서의 maltose 생산의 효율성을 기존의 증자법과 비교 검토하기 위하여, 옥수수 생전분을 기질로 분쇄마찰매체 함유 효소반응계에서 maltose-forming fungal α -amylase(Fungamyl)로 효소반응시킨 경우, 매체를 첨가하지 않고 반응시킨 경우, 그리고 전통적인 증자법에 따라 α -amylase(Termamyl)로 증자액화시킨 가용성 전분을 기질로 Fungamyl로 효소반응시킨 경우의 생성된 maltose, 포도당 그리고 malto-oligosaccharides을 비교한 결과이다.

분쇄마찰매체 함유 불균일상 효소반응계를 활용한 maltose 생성군의 효소반응속도는 증자군과 비교하여 초기 수시간 동안에는 다소 늦었으나 그 이후에는 거의 유사한 수준을 보였다. 이와 같이 초기에 반응속도가 다소 느린 것은 전분입자가 분쇄마찰매체에 의해 fragmentation이 충분히 진행될 정도로 효소의 침식작용을 받지 않고 있기 때문이다.

한편 24시간 반응 후의 당화 및 maltose의 수율을 비교하면, 증자법의 경우는 24시간 효소반응 후 액화전분의 78%(w/v)가 당화되었고, 이 중 60%가 maltose, 8%가 포도당 그리고 32%가 malto-oligosaccha-

rides로서, 69 g/l의 maltose가 생성되었다. 그러나 무증자분쇄마찰 효소반응계를 활용할 경우에는 생전분의 84%가 당화되었고, 이 중 72%가 maltose, 19%가 포도당 그리고 9%가 malto-oligosaccharides로서, 95 g/l의 maltose가 얻어졌으며 증자군에 비하여 현저히 높았다. 또한, 생성된 malto-oligosaccharides는 주로 maltotriose였고 maltotetraose 이상의 oligosaccharides는 거의 생성되지 않았다. 반면 매체를 첨가하지 않은 군은 24시간 후에도 소량의 maltose가 생성됨에 그쳤다.

이와 같은 효용성으로 판탄컨대 분쇄마찰매체 함유 불균일상 효소반응계를 활용하여 생전분으로부터 maltose를 직접 생산하는 방법은 현재 산업적으로 활용되고 있는 전통적인 증자공정을 대체할 수 있는 고효율 maltose 제조법으로 사료된다. 또한 분쇄마찰매체 함유 효소반응계에 잔류하는 미이용 생전분은 액화전분과는 달리 원심분리와 같은 단순한 단위조작으로 쉽게 분리할 수 있어, maltose 함유율이 높은 수용성 당액을 얻을 수 있음으로 maltose의 분리정제가 용이한 장점도 예상된다.

분쇄마찰매체 함유 효소반응액의 pH와 생성당 조성의 상관관계

반응액의 pH가 당생성 및 당조성에 미치는 영향을 검토한 결과는 Fig. 2와 같다. 가용성 액화전분액을

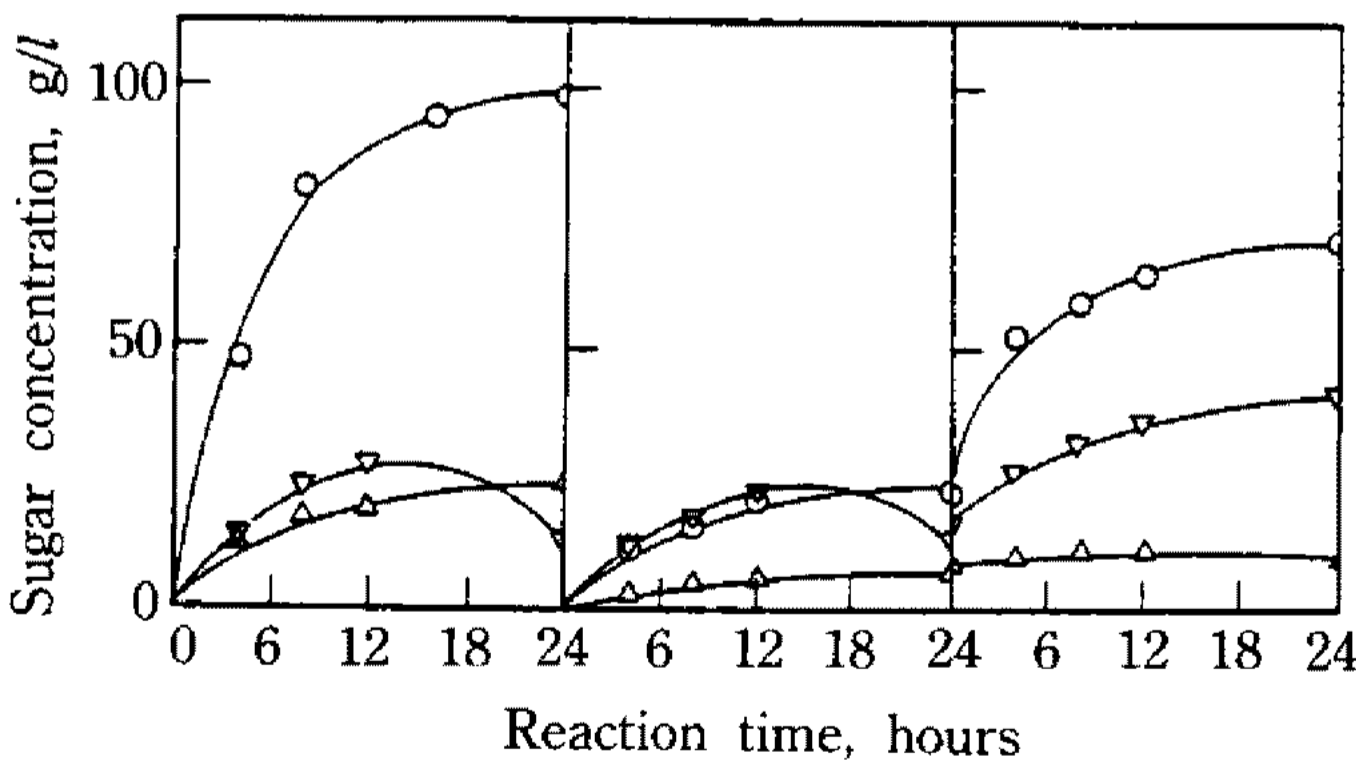


Fig. 1. Comparison of sugar compositions; maltose (○—○), glucose (△—△), and malto-oligosaccharides (▽—▽).

A) 150 g/l raw starch, 1,100 units/l Fungamyl, 600 g/l glass bead, pH 8.0 (50 mM boric acid-NaOH buffer), 50 °C and 250 rpm; B) same with A but without bead; C) 150 g/l liquefied starch (with 5,600 units/l α -amylase), 280 units/l Fungamyl, pH 5.0 (50 mM Na-acetate buffer), without bead, 50 °C and 250 rpm.

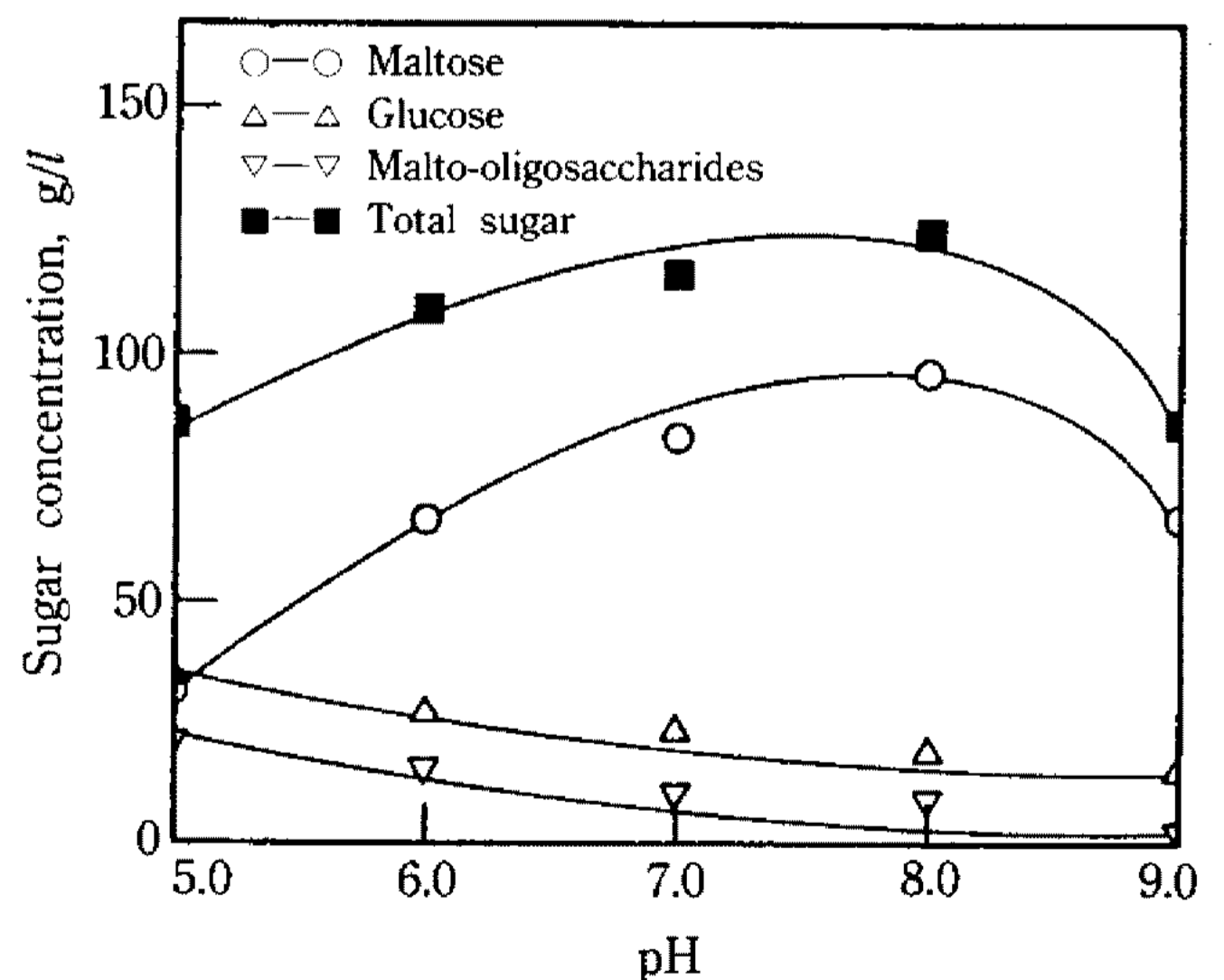


Fig. 2. Effect of pH on maltose formation from raw starch; 150 g/l raw starch, 1,100 units/l Fungamyl, 600 g/l glass bead, 50 °C and 250 rpm.

pH 5.0, 6.0, and 7.0: 50 mM wide-range buffer, pH 8.0 and 9.0: 50 mM boric acid-NaOH buffer

기질로 maltose를 생산할 경우 사용 Fungamyl의 최적 pH는 약산성인 pH 5.0~5.5였다(12). 그러나 분쇄마찰 효소반응계의 경우는 pH 5.0~5.5인 약산성에서는 24시간 후에도 생전분이 60%만 당화되었다. 한편 당조성은 포도당, maltose, 그리고 maltotriose의 농도가 각각 36, 30, 24 g/l로서 포도당과 maltotriose가 상당량 생성된 반면 maltose의 생성량은 비교적 낮았다.

그러나 현탁액의 pH 8.0인 약알칼리에서는 생전분의 84%가 당화되었고, 또한 당조성도 포도당, maltose 그리고 maltotriose의 농도가 각각 20, 95, 13 g/l로서, maltose의 함량이 72%로 크게 증가하였다. 그러나 pH가 9.0으로 증가될 경우에는 생성당 중의 maltose의 함량은 76%로 계속 증가하였으나 생전분의 당화율이 현저히 감소하여 50%만이 당화됨으로서 maltose의 생성량도 매우 감소되었으며, 이는 pH에 따른 효소 실활에 기인하는 것으로 사료된다.

위와 같은 Fungamyl 사용시 분쇄마찰 효소반응계에서 관찰되는 최적 pH가 알칼리 영역으로 변화하는 현상이 Fungamyl 이외의 기원이 다른 효소에서도 관찰되는지를 검토하기 위하여 bacterial α -amylase인 조맥아효소와 식물유래의 정제된 β -amylase의 pH에 따른 당조성을 검토하여 Table 1에 나타내었다. 참

Table 1. Effect of pH on maltose formation from raw starch in bioattitrator using maltose-forming bacterial α -amylase or plant β -amylase

		G ₁ ^a	G ₂ ^b	≥G ₃ ^c	Yield ^d	MC(%) ^e
Plant β -amylase	pH 5	2	19	6	0.12	70
	pH 6	2	58	4	0.37	91
	pH 7	7	70	10	0.45	81
	pH 8	14	80	23	0.51	75
	pH 9	3	23	2	0.15	82
Bacterial α -amylase	pH 5	37	66	13	0.42	57
	pH 6	42	70	12	0.45	57
	pH 7	39	79	11	0.50	61
	pH 8	40	80	14	0.54	60
	pH 9	14	84	12	0.54	76

* 15% (w/v) corn starch, 1,100 units (maltose-forming bacterial α -amylase or β -amylase)/l, 600 g/l glass bead, pH 8.0 boric acid-NaOH buffer, 50°C and 250 rpm.
^aGlucose concentraion, g/l; ^bMaltose concentration, g/l; ^cMalto-oligosaccharides concentration, g/l; ^dMaltose yield (g of maltose/g of starch); ^eMaltose contents (b/(a+b+c)×100), %.

고로 조맥아효소는 액화전분을 기질로 할 때 maltose 생산에 적합한 최적 pH는 7.0였고, β -amylase는 5.0이었다. Table 1에서와 같이 두 균 공히 pH가 알칼리 영역으로 변화함에 따라 Fungamyl에서와 유사한 당화촉진 현상과 생성당 조성의 변화가 관찰되었다. 분쇄마찰 효소반응계에서 생전분으로부터 maltose를 생산할 경우 맥아효소의 경우는 pH 9.0에서 maltose 생성이 가장 촉진되었고 반면 포도당 생성이 억제되었다. 또한 β -amylase의 최적 pH는 8.0임을 알 수 있다.

위에서와 같이 각종 maltose 생산효소를 이용하여 분쇄마찰 효소반응계에서 생전분으로부터 직접 maltose를 생산할 때 관찰되는 현상으로서 가용성 전분을 기질로 할 때의 최적 pH인 약산성에서 보다는 오히려 약알칼리 영역에서 높은 당화율과 속도를 나타내며 또한 maltose의 함유율도 증가하는 것은 매우 특이한 효소적 현상이다. 이는 생전분의 구조가 완충액 중의 알칼리 이온에 의해 영향을 받거나, 효소의 분자구조가 생전분의 분해에 적절한 상태로 변형되든지, 또는 알칼리 영역에서의 효소안정성이 maltose에 의하여 증가되는 등 때문이라 유추된다. 그러나 정확한 mechanism을 규명하기 위해서는 후속연구가 필요하다.

고함유 Maltose 생성에 적합한 효소첨가량

효소첨가량이 당수율 및 당조성에 미치는 영향은 Fig. 3과 같다. 효소사용량을 증자공정 수준인 280

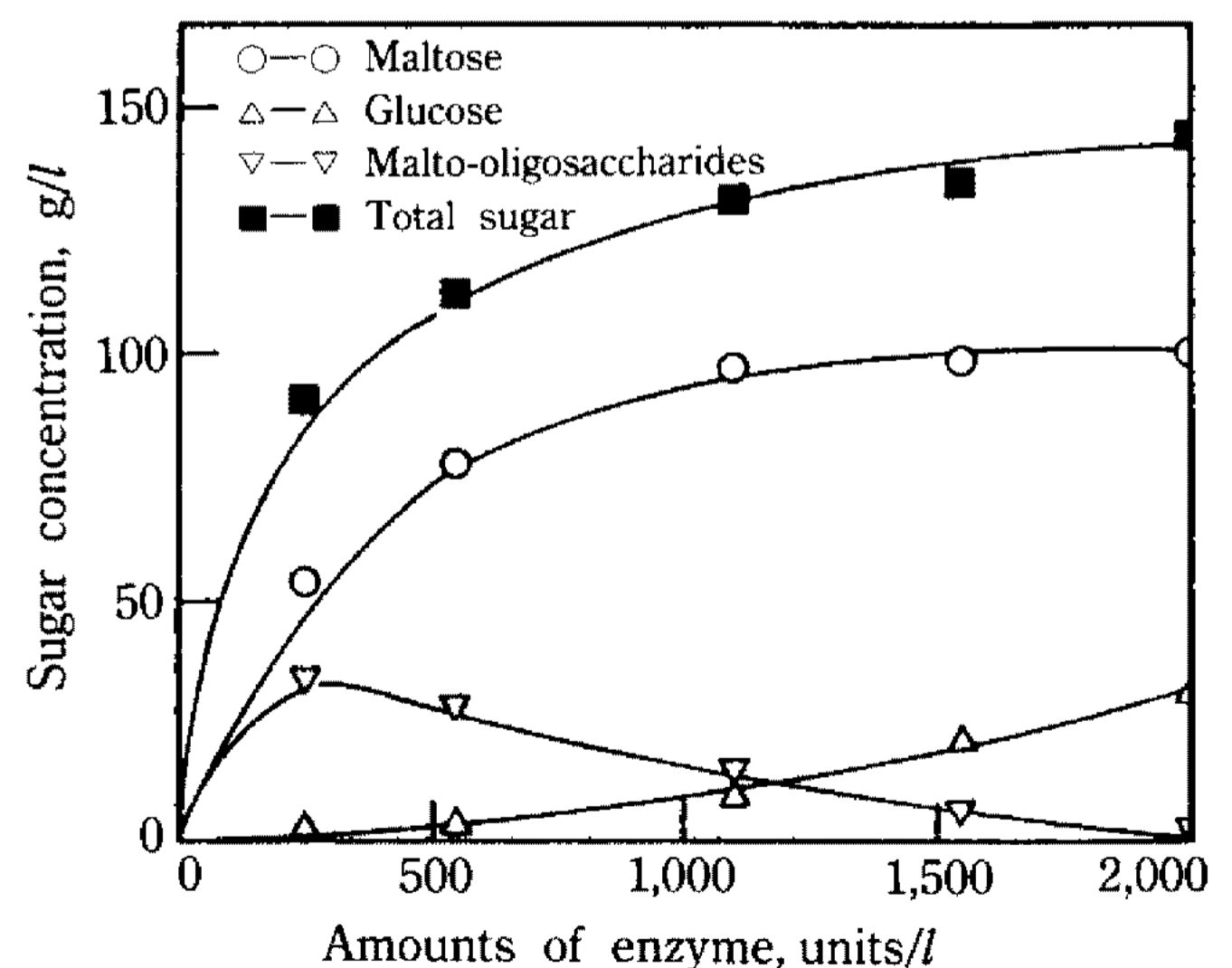


Fig. 3. Effect of the amount of Fungamyl on maltose formation from raw starch; 150 g/l raw starch, 600 g/l glass bead, pH 8.0, 50°C and 250 rpm.

units/l를 첨가할 경우 생전분의 당화율은 58%였고, maltose 생성량은 56 g/l로서 증자법의 69 g/l에 비해 다소 낮았다. 이 때의 당조성은 포도당의 함량은 낮은 반면, maltotriose의 함량이 비교적 높은 경향을 보였다. 반면 효소첨가량이 증가함에 따라 당생성이 촉진되어 최대 maltose 생성량인 95 g/l는 Fungamyl 첨가량이 1,100 units/l일 때 얻어졌다. 그 이상의 효소첨가시에는 maltose의 생성량에는 변동이 없었으나 당조성에서 포도당은 증가하고 maltotriose는 현저히 감소되는 경향을 보여, maltose의 함유율이 감소하였다. 이와 같은 Fungamyl 사용량은 기존 증자법의 사용량인 200~300 units/l에 비해 3~4배 정도 많은 양으로 효소사용량을 감소시키기 위한 보충효소의 영향에 대한 검토가 필요하다.

Fungamyl과 보충효소인 α -Amylase와 Pullulanase의 상호보완작용

액화형효소인 α -amylase(Termamyl)와 α -1,6-glycoside 분해효소인 pullulanase(Promozyme)의 보충 첨가의 영향은 Fig. 4와 같다. 이 때 Fungamyl 첨가량은 증자법수준인 280 units/l로 고정하고, α -amylase를 증자법에서 전분액화시 사용되는 양인 5,600 units/l를, 그리고 α -amylase와 pullulanase 154 units/l를 보충 첨가하였다.

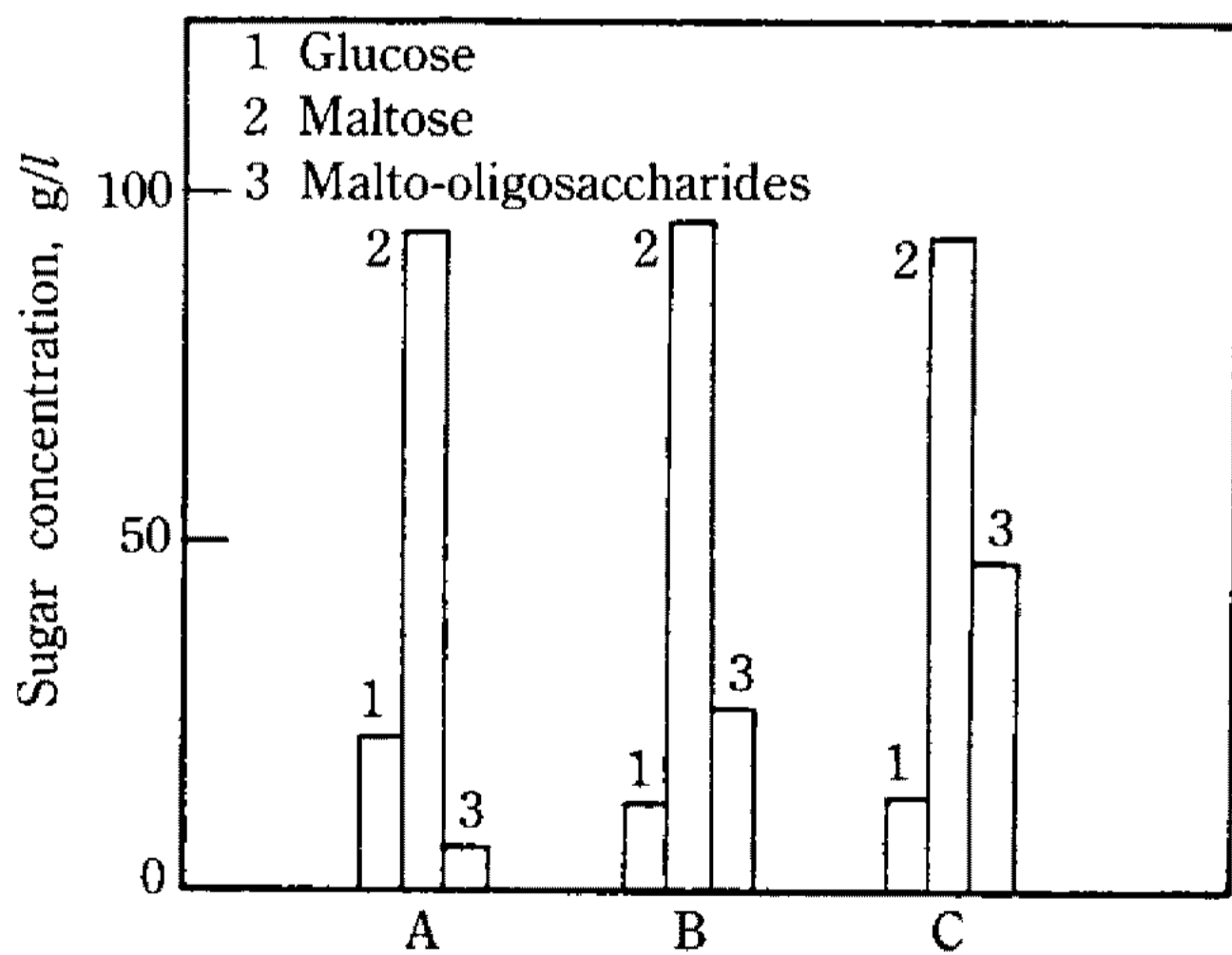


Fig. 4. Effect of supplementary addition of α -amylase and pullulanase on the maltose formation from raw starch; 150 g/l raw starch, 600 g/l glass bead, 50°C and 250 rpm.

A) 1,100 units/l Fungamyl only; B) 280 units/l Fungamyl+5,600 units/l α -amylase; C) 280 units/l Fungamyl+5,600 units/l α -amylase+154 units/l pullulanase

Fungamyl만 사용할 경우는 24시간 효소반응 후 포도당, maltose, malto-oligosaccharides의 농도가 각각 24, 95, 13 g/l인 반면 α -amylase를 보충첨가할 경우에는 각각 12, 97, 27 g/l가 생성되었다. α -amylase를 보충첨가함으로써 Fungamyl만을 다량첨가할 경우와 유사한 높은 수준의 maltose 생성량과 생성속도를 얻을 수 있음을 알 수 있다. 그러나 당조성은 Fungamyl만을 다량첨가할 경우와 달리 포도당은 적고 maltotriose가 증가하는 경향을 보였다. 반면 debranching 효소인 pullulanase의 보충첨가시는 malto-oligosaccharides의 생성을 증가시켜 maltose의 함유율을 오히려 감소시켰다.

위와 같이 α -amylase를 전분액화시 사용되는 양과 동일량을 보충첨가함으로써 Fungamyl의 사용량을 현저히 줄일 수 있었으며, 앞으로 효소사용량을 감소시키면서 더욱 고농도, 고순도의 maltose를 얻기 위한 효소의 상호보완작용에 관한 연구를 행하고자 한다.

생전분농도에 따른 Maltose 생성량과 당조성의 변화

Table 2는 생전분의 농도에 따른 maltose 생성량과 당조성의 변화를 나타낸 것이다. 생전분의 농도가 증가함에 따라 maltose 생성량은 증가하여, 생전분농도가 40%(w/v)일 때 138 g/l의 가장 높은 maltose 생성을 보였다. 이 때 생성된 총당은 310 g/l로서 생전분의 70%가 당화되었다. 그러나 이와 같은 고농도에서는 포도당 생성도 동시에 현저히 증가하여 maltose 농도와 유사한 140 g/l가 생성됨으로서 maltose

Table 2. Effect of raw starch concentration on maltose formation from raw starch in bioattritor

(w/v)	G ₁ ^a	G ₂ ^b	≥G ₃ ^c	Yield ^d	MC(%) ^e
5%	6	15	15	0.29	42
10%	11	55	19	0.52	65
15%	24	95	13	0.60	72
20%	61	104	22	0.50	56
30%	105	123	25	0.39	49
40%	140	138	40	0.33	44

* Fungamyl increased according to substrate concentration, 600 g/l glass bead, pH 8.0 boric acid-NaOH buffer, 50°C and 250 rpm.

^{a, b, c, d, e} same with Table 1

의 함유율은 44%로 감소하여, 15%(w/v) 기질첨가의 경우의 함유율인 72%에 비해 매우 낮았다. 그러나 기질의 유가식 또는 연속 첨가, 생전분에 적합한 효소의 개발, bioattritor의 구조개선에 대한 연구 등을 통하여 고생전분농도에서의 maltose 생산이 가능하리라 본다.

요 약

Maltose 생산효소인 Fungamyl과 생전분의 알칼리성 현탁액에 고품분쇄마찰매체를 첨가교반하면서 증자액화과정을 거치지 않고 생전분으로부터 maltose를 직접 생성시키는 연구를 수행하였다. 불용성 생전분을 기질로 하는 분쇄마찰 효소반응계에서 효소반응은 증자액화된 전분을 기질로 하는 기존의 maltose 제조법과 비슷한 효소반응속도를 보였다. 그러나 24시간 후 maltose 농도는 증자법을 초과하여, 생전분의 농도가 150 g/l일 때 95 g/l의 maltose를 얻을 수 있었고, 첨가생전분에 대한 수율은 0.60이었다. 또한 생성된 포도당, maltose, maltotriose의 농도는 각각 20, 95 그리고 13 g/l였으며, maltose의 함량은 72%로서 증자법의 60%에 비하여 매우 높았다. Maltose의 함유율을 증가시키는데 있어 반응액의 pH는 가장 중요한 변수로서 작용하였으며, Fungamyl의 최적 작용 pH인 5.0~5.5보다 높은 약알칼리(pH 8.0~9.0)에서 고순도의 maltose가 얻어졌다. 효소첨가량과 생전분농도도 maltose의 생성량과 당조성에 영향을 주는 인자로 작용하였다. Fungamyl 외에 전분액화효소인 α -amylase를 보충 첨가함으로써 Fungamyl의 사용량을 현

저히 줄일 수 있다. 그러나 당조성은 포도당함량이 적은 반면 maltotriose 함량이 다소 높은 특징을 보였다.

감사의 말

본 연구는 1989년도 한국과학재단 목적기초연구비로 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. Whistler, R.L., J.N. Bemiller and E.F. Paschall: *Starch-Chemistry and Technology*, 2nd ed., Academic Press, N.Y., 127 (1984)
2. Aunstrup, K.: *Annual Reports on Fermentation Processes*(Perlman, D., ed.), Academic Press, N.Y., Vol. 2, 136 (1978)
3. Sata, H., H. Tanaguchi and Y. Maruyama: *Agric. Biol. Chem.*, 51, 151 (1987)
4. 한국유전공학연구조합: 생물공학제품 100선, 한국유전공학연구조합, 서울, p. 220 (1989)
5. 이용현, 조구형: *산업미생물학회지*, 14, 29 (1986)
6. 조구형, 이용현: *산업미생물학회지*, 14, 407 (1986)
7. 이용현, 박진서: *산업미생물학회지*, 17, 349 (1989)
8. 박동찬, 이용현: *산업미생물학회지*, 18, 260 (1990)
9. 이용현, 박동찬: *산업미생물학회지*, 18, 352 (1990)
10. Miller, G.L.: *Anal. Chem.*, 31, 426 (1959)
11. Lowry, O.H., H.J. Rosenbrough, A.L. Farr and R.J. Randall: *J. Bio. Chem.*, 31, 265 (1981)
12. Novo Co.: *Enzyme Catalogue-Fungamyl*, Denmark (1990)

(Received April 23, 1991)