

이온교환수지에 고정화된 Fructosyltransferase를 이용한 Fructo-oligosaccharides의 생산

윤 종 원 · 이 민 규* · 송 승 구
부산대학교 화학공학과
*제주대학교 화학공학과

Production of Fructo-oligosaccharides by the Fructosyltransferase Immobilized onto an Ion-exchange Resin

Jong Won Yun, 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 690-756, Korea

ABSTRACT

A fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans* was immobilized onto a polystyrene-type anionic ion-exchange resin and the production of fructo-oligosaccharides was investigated by the immobilized enzyme. The optimum pH and the temperature of immobilized enzyme were found to be pH 5.0, 55 °C respectively. The thermal stability of the enzyme was greatly enhanced after immobilization. The reaction profiles of the immobilized enzyme was almost identical to those of the free cells and the soluble enzyme. The immobilized enzymes were stable up to 20 cycles without loss of initial activity in a repeated-batch operation at 50 °C.

서 론

최근 건강 지향의 식생활 경향에 따라 설탕, 전분 당 등의 기존 감미료의 단점을 극복하는 동시에 칼로리가 낮거나 인체 내에서 Bifidus factor로 작용되는 등의 새로운 기능성을 갖는 대체감미료의 개발이 80년대 후반부터 일본을 중심으로 활발하게 진행되고 있다(1, 2). 특히 fructo-, galactooligosaccharides 등의 새로운 올리고당류와 전분을 이용한 malto-, isomalto-oligosaccharides 등의 올리고당류의 개발에 초점이 모아지고 있는데(3-7), 이미 일

본에서는 이들 제품이 산업적 규모로 생산되고 있다. 현재 국내에서는 fructo-oligosaccharides가 유일하게 생산되고 있으며, *Aureobasidium pullulans* 기원의 fructosyltransferase를 whole cell 상태로 Ca-alginate gel에 고정화한 후 충전탑형 반응기를 이용하여 연속생산하는 공정이 대표적이다(8).

Ca-alginate 등의 gel matrix를 이용한 고정화 방법은 무독성, 강도 안정성 등의 우수한 gel 특성으로 인해 오랫동안 많은 연구가 이루어져 왔으나(9,10), 공업적 규모의 대용량 반응기 운전에서 나타나는 여러 가지 문제점 때문에 실제 산업화된 예는 많지 않

다. 특히 고정화 cell의 대량 제조방법, 반응기 충전시의 취급 문제, 그리고 실행된 고정화 cell의 폐기 문제 등은 매우 번거로운 작업을 요구하는 중요한 단점으로 지적되어 왔다. 이러한 문제를 극복하기 위한 방법으로 여러 가지 흡착성 담체(support)를 중심으로 한 효소 고정화 방법에 관한 연구가 병행되어왔는데, 이 방법에 의해 pilot 및 산업적 규모의 반응기 운전이 성공적으로 수행된 예가 보고되고 있다(11, 12).

지금까지 고정화 효소를 이용한 fructooligosaccharides 생산공정은 Ca-alginate gel에 whole cell을 고정화한 방법(3, 8)과 porous glass에 부분정제한 효소를 고정화한 예(13, 14)가 보고되어 있는데, 전자의 경우는 이미 산업화되어 있으나 후자는 전자에 비해 경제적인 고정화 효소의 제조방법이 걸림돌이 되어 왔다.

최근 Hayashi 등(14)은 화산재의 일종인 Shirasu porous glass에 *Aureobasidium pullulans* 기원의 fructosyltransferase를 부분정제하여 고정화한 충전탑형 반응기를 이용하여 1개월 정도 안정하게 fructo-oligosaccharides를 연속생산하였다고 보고하였지만, 담체의 전처리(silanization)나 효소 정제공정의 복잡성, 완충 기질의 사용 등 실제 산업화 적용을 위해서는 많은 기술적, 경제적 문제점을 가지고 있다.

따라서 본 연구에서는 *A. pullulans* 기원의 crude fructosyltransferase를 전처리하지 않은 음이온 교환수지에 쉽게 고정화시킨 후, 고정화 효소의 반응 특성과 안정성을 고찰함으로써 fructooligosaccharides 생산공정에의 적용 가능성을 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

고정화 재료로 사용된 각종 이온교환수지는 공업적으로 대량생산되고 있는 제품을 사용하였고(Table 1), 효소활성 측정 및 반응기질로 사용된 sucrose는 food grade(제일제당)를 사용하였으며 그 이외의 시약들은 일반 시약등급을 사용하였다.

효소 생산

Aureobasidium pullulans KFCC 10245를 raw sugar 10g/ℓ, yeast extract 2g/ℓ (pH 5.2)의 배지에서 30℃에서 2일간 배양한 다음, 50ml의 배지

Table 1. Enzyme adsorption on the polystyrene-type ion-exchange resins^{a)}.

resins	functional structure ^{b)}	matrix type	adsorbed enzyme (unit/g · resin)
non-ionic			
XAD-2	-(CH)X	porous	23.59
XAD-4	-(CH)X	porous	16.03
anionic			
SA-11A	-N-(CH)X	gel	16.28
SA-20AP	-N-(CH)X	gel	17.57
PA-408	-N-(CH)X	porous	24.36
PA-412	-N-(CH)X	porous	27.53
WA-30	-NR	porous	15.64

^{a)} 15ml of 0.025 M of sodium citrate buffer(pH 5.5), 5ml of enzyme solution, at 25℃, 1.5hr, 180rpm.

^{b)} X and R indicate the functional groups of polystyrene support: X = CH₂(CH₂)₂C₆H₄OH, R = CH₂(CH₂)₂.

(sucrose 200g/ℓ, yeast extract 10g/ℓ, K₂HPO₄ 5g/ℓ, MgSO₄ · 7H₂O 0.5g/ℓ, NaNO₃ 10g/ℓ; pH 6.0)가 함유된 250ml flask를 이용하여 30℃에서 5일간 배양하였다. 최종 효소의 활성은 cell 내 효소의 경우 50unit/ml, cell외 효소의 경우 30unit/ml 정도였다.

효소 활성의 측정

Fructosyltransferase 활성은 전보(15)에서와 동일한 방법으로 측정하였고, 55℃에서 1분간 1μ mole의 glucose를 생성하는데 필요한 효소의 양을 1unit로 정의하였다.

반응물의 분석

모든 반응물(당류)의 분석은 Aminex HPX-42C (300mm×7.8 mm, BIO-RAD, USA) column이 부착된 HPLC(Varian, USA)를 사용하였으며, detector로는 RI-4 refractive index detector, 이동상으로 물을 사용(1ml/min)하였으며 column은 85℃로 일정하게 유지해 주었다.

효소 용액의 제조

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, Japan)를 2%(w/v) 농도가 되게 첨가한 다음 45°C에서 2시간 동안 반응시키고 규조토로 여과하여 효소용액을 제조하였다.

효소 고정화

이온교환수지를 0.01 M citrate buffer(pH 5.5)에서 48시간 동안 equilibration시킨 다음 동일 buffer에 용해된 crude enzyme 용액을 넣고 180rpm으로 교반하면서 25°C에서 2시간 동안 고정화시켰다. 미흡착된 효소는 여과액에서 효소활성이 관찰되지 않을 때까지 buffer 용액으로 세척하여 제거하였다.

효소의 반응 특성 실험

최적 반응 pH 결정 실험에서는 15ml glass tube에 800g/l sucrose 용액 7.5ml, 0.1M citrate buffer(pH 3~6) 또는 phosphate buffer(pH 7~8) 2.3ml, 효소 용액 0.2ml 또는 고정화 효소 1g을 각각 넣고 55°C에서 1시간 동안 반응시킨 다음 HPLC를 이용하여 1-kestose 농도를 정량 분석하여 상대활성을 비교하였다. 한편 최적 반응온도 결정 실험에서는 15ml glass tube에 800g/l sucrose 용액 7.5ml, 0.1M citrate buffer(pH 5.5) 2.3ml, 효소 용액 0.2ml 또는 고정화 효소 1g을 각각 넣고 각 온도에서 1시간 동안 반응시킨 다음 효소 활성을 측정하였다. 열안정성 실험에서는 최적 반응온도 결정 실험에서와 동일한 방법으로 시료를 준비한 다음 각 온도에서 1시간 동안 가열한 다음 잔류 효소 활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

고정화 담체의 선택

상업적으로 시판되고 있는 여러 가지 음이온 교환수지 및 비이온성 교환수지에 대해 fructosyltransferase의 흡착능 실험을 수행한 결과, Table 1에서와 같이 styrene계 음이온 교환수지(-NH₂)인 Diaion® PA-412(삼양사, 한국)가 가장 우수한 효소 흡착능을 나타내었다. 따라서 이후의 실험에서는 PA-412에 대해서 fructo-oligosaccharides 생산을 위한 여러 가지 효소 반응성 실험을 수행하였다.

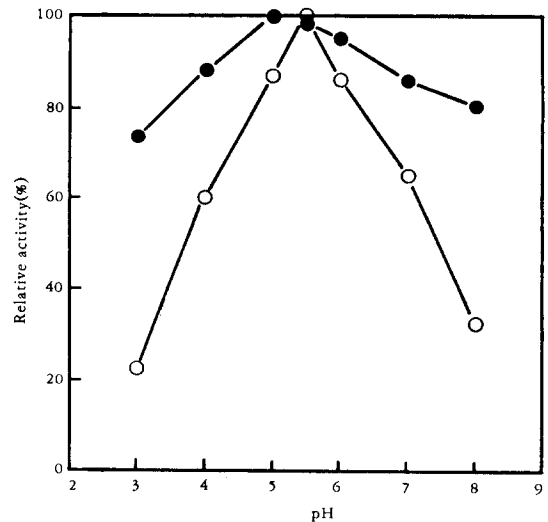


Fig. 1. Effect of pH on the fructosyltransferase activity of soluble enzyme(○) and immobilized enzyme(●).

반응 최적 pH

효소 또는 whole cell을 고정화하면 고정화 재료의 물리·화학적 특성에 의해 고정화 전 효소에 비해 고정화 효소의 최적 반응 pH가 변화하는 경우가 많다(16). 전보(8)의 연구결과, 즉 Ca-alginate gel에 whole cell 상태로 고정화된 fructosyltransferase의 경우 고정화 전후 모두 반응 최적 pH가 5.5로 불변하였으나, Fig. 1에서 보여 주는 바와 같이 soluble enzyme의 경우는 pH 5.5에서, PA-412에 고정화된 효소는 pH 5.0에서 최고 활성을 나타내었는데 이러한 pH shift 현상은 PA-412의 functional group이 양이온성을 나타내기 때문인 것으로 생각된다. 한편 고정화 후 효소 활성은 고정화 전에 비해 보다 넓은 pH 범위에서 유지되었다.

반응 최적온도

Ca-alginate gel에 고정화된 fructosyltransferase의 경우는 고정화 전의 free cell에 비해 고정화 후 반응 최적온도가 60°C에서 65°C로 5°C 증가하였지만(8), Fig. 2에서와 같이 soluble enzyme의 경우와 PA-412에 고정화된 효소 모두 반응 최적온도는 55°C로 나타났다. 이러한 차이는 Ca-alginate gel에 고정화된 cell의 경우와 PA-412 이온

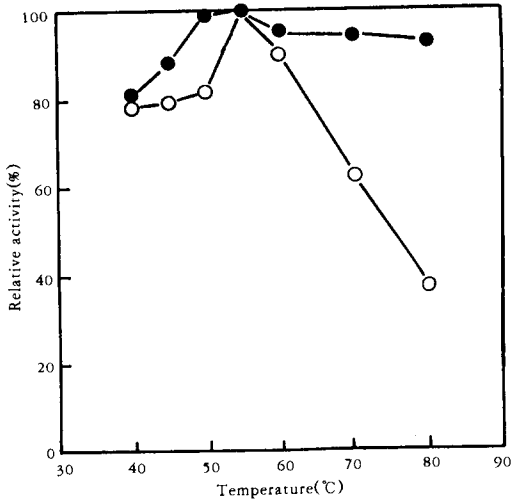


Fig. 2. Effect of temperature on the fructosyltransferase activity of soluble enzyme(○) and immobilized enzyme(●).

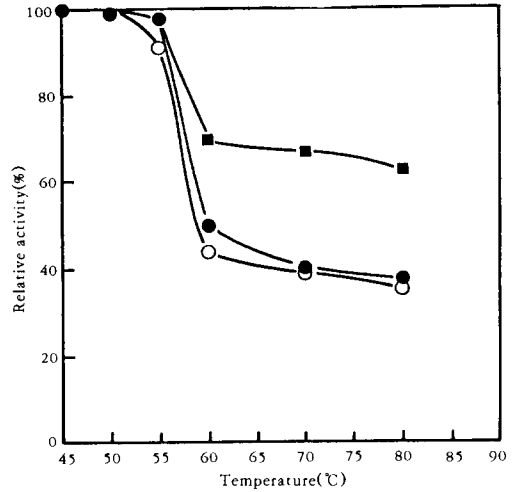


Fig. 3. Thermal stability of free cells(●), soluble enzyme(○) and immobilized enzyme(■).

교환수지에 고정화된 효소의 microenvironment의 상이함에서 오는 열전달현상의 차이에 기인된다고 사료된다.

고정화 효소의 열안정성

일반적으로 효소 등의 biocatalyst를 고정화하는 중요한 목적 중의 하나는 고정화 후 열안정성의 증가로 인한 효소의 연속적 재사용을 들 수 있는데, Fig. 3의 결과에서 보여 주는 바와 같이 free cell 및 soluble enzyme에 비해 고정화에 의해 열안정성이 크게 증가하였다.

고정화 효소의 반응 특성

Ca-alginate gel에 고정화된 fructosyltransferase를 이용한 fructo-oligosaccharides 생산시 반응기질 및 생성물들의 gel 내부에서의 물질전달저항으로 인해 최종 반응물들의 조성이 달라지는 현상이 나타나는데(3), 이것은 반응기질인 sucrose, 반응생성물인 glucose, 1-kestose (GF₂; G; glucose, F; fructose), nystose (GF₃), fructofuranosynystose (GF₄) 등이 분자량 1000 이하의 저분자 물질인데도 불구하고 고농도 당(sugar)용액에서의 확산계수가 매우 낮기 때문에 gel 내부에서 이들 당 성분과 효

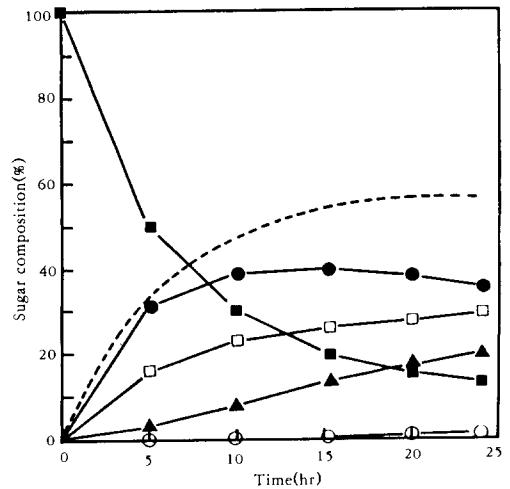


Fig. 4. Typical reaction profiles of fructooligosaccharides by free cells:(■) sucrose, (□) glucose, (●) 1-kestose, (▲) nystose, (○) fructofuranosynystose, (---) total fructooligosaccharides.

소의 접촉시간의 차이에서 나타나는 현상으로 밝혀졌다(17). 그러나 이온교환수지에 고정화된 효소는 이와 달리 물질전달현상이 무시될 정도로 작아 free cell이나 soluble enzyme의 경우와 거의 동일한 반응특성을 나타내었고(Fig. 4-6), 따라서 최종반응물의 조성도 거의 동일한 것으로 나타났다(Table 2).

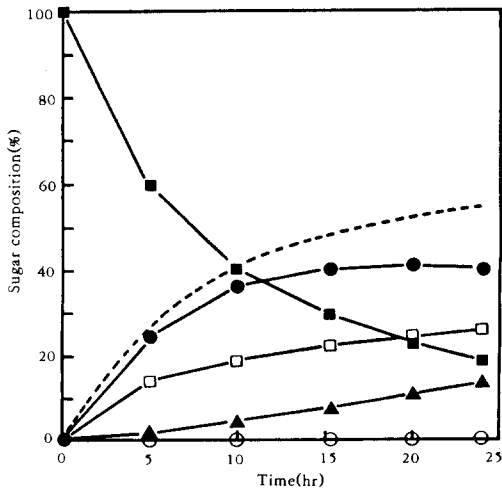


Fig. 5. Typical reaction profiles of fructo-oligosaccharides by soluble enzyme: (■) sucrose, (□) glucose, (●) 1-kestose, (▲) nystose, (○) fructofuranosyl nystose, (---) total fructo-oligosaccharides.

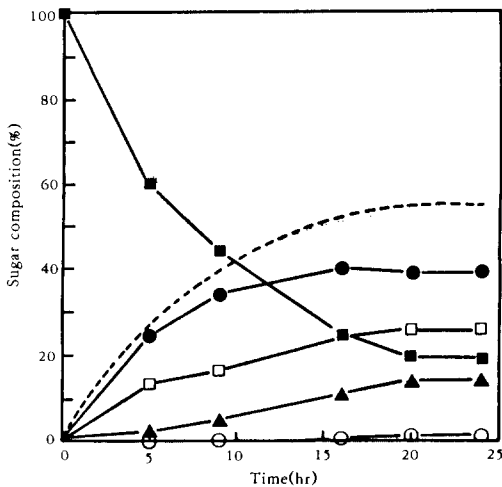


Fig. 6. Typical reaction profiles of fructo-oligosaccharides by immobilized enzyme: (■) sucrose, (□) glucose, (●) 1-kestose, (▲) nystose, (○) fructofuranosyl nystose, (---) total fructo-oligosaccharides.

Hayashi 등(13)은 porous glass에 고정화된 fructosyltransferase를 이용한 충전탑형 반응기를

Table 2. Comparison of typical sugar composition of reaction products with free cells, soluble enzyme and immobilized enzyme.

sugars	composition (% w/w) ^{a)}			
	free cells	soluble enzyme	immobilized enzyme	immobilized cell ^{b)}
glucose	27.73	26.10	25.66	30.0
sucrose	15.54	19.02	19.49	15.0
GF ₂	39.88	40.49	39.00	26.0
GF ₃	15.28	13.79	14.21	19.5
GF ₄	1.25	0.60	1.29	7.8
GF ₅	0	0	0	1.7
ΣGF _n	56.71	54.88	54.50	55.0

^{a)} reaction time : 20hrs, enzyme dosage : 5units/g · sucrose, substrate : 50ml of 770g/l sucrose, 50°C

^{b)} from ref. 3

매우 빠른 유속으로 운전했을 때 1-kestose만 선택적으로 생산할 수 있었다고 보고한 바 있는데, 이것은 본 연구 결과에서처럼 흡착성 담체에 고정화된 fructosyltransferase가 반응기질 및 반응 생성물에 대해 물질전달저항을 크게 받지 않기 때문에 반응조건에서의 체류시간이 짧기 때문인 것으로 생각된다

고정화 효소의 장기운전 안정성

전술한 조건에서 제조된 고정화 효소를 실제 반응기 system에 적용하기 위한 예비단계로써 770g/l sucrose(초기 pH 6-7, not buffered)를 반응기질로 이용하여 고정화 효소의 안정성 평가를 수행하였다. 250ml flask에 770g/l sucrose 용액 40ml, 고정화 효소 10g (16unit/g)을 넣고, 50°C에서 24시간 동안 batch 반응을 행한 후 고정화 효소를 여과하여 회수한 뒤 계속해서 repeated batch 형태로 반응을 연속적으로 수행한 결과, 20 batches까지 고정화 효소의 실활없이 재사용이 가능하였으나 그 후 급격한 효소의 실활이 나타났다(Fig. 7).

본 연구에서 고정화 담체로 사용된 PA-412는 통상 생물공정에서 주로 목적물의 탈색 용도로 이용되는 음이온 교환수지로서, 효소가 물리적으로 고정화되었다는 일반적인 고정화 효소의 불안정성뿐 아니라 반응기질인 sucrose중의 색소가 서서히 흡착되어 결국 고정화 효소의 탈착과 활성의 저하를 유발할 수도 있어 고정화 효소의 안정성에 영향을 미친 것으로 판단된다.

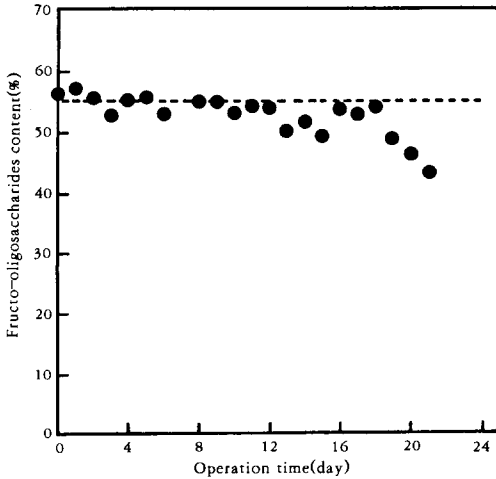


Fig. 7. Long-term stability of immobilized enzyme in a repeated-batch operation at 50°C. Dashed line indicates 55% conversion of fructo-oligosaccharides.

Mansfeld 등(18)은 본 연구에서 사용된 고정화 담체와 유사한 종류의 styrene계 음이온 교환수지에 invertase를 고정화하여 invert sugar syrup을 생산하는 공정에서 sucrose를 미리 탈색처리하여 반응기 질로 이용함으로써 고정화 효소의 안정성을 매우 높일 수 있었다고 보고한 바 있다.

요 약

Polystyrene계 음이온 교환수지인 Diaion PA-412에 *Aureobasidium pullulans* 기원의 fructo-syltransferase를 crude enzyme 상태로 고정화하여 fructo-oligosaccharides의 생산을 검토하였다. 고정화 효소의 최적 반응 pH 및 온도는 각각 pH 5.0, 55°C 이었고 고정화에 의해 열안정성이 크게 증가하였다. 고정화 효소에 의한 fructo-oligosaccharids 생성의 효소 반응 경향은 free cell 및 soluble enzyme과 거의 유사하여 최종 반응산물 중의 당 조성이 동일하였다. 고정화 효소를 repeated-batch 방법으로 운전하여 fructo-oligosaccharides 생산공정에 적용해 본 결과 50°C에서 20일까지 안정성을 유지하였다.

참고문헌

1. 편집부 (1989), *Food chemicals*(Japan), Oct., 10.
2. 편집부 (1990), *식품과 개발*(일본), 26(10), 23.
3. J. W. Yun, K. H. Jung, J. W. Oh and J. H. Lee(1990), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 24/25, 299.
4. H. Hidaka, M. Hirayama and M. Sumi(1988), *Agric. Biol. Chem.*, 52, 1181.
5. S. Hayashi, M. Nonokuchi, K. Imada and H. Ueno(1990), *J. Industrial Microbiol.*, 5, 395.
6. T. Kohmoto, K. Tsuji, T. Kaneko, M. Shiota, F. Fukui, H. Takaku, Y. Nakagawa, T. Ichikawa and S. Kobayashi(1992), *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56, 937.
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. C. D. Scott(1987), *Enzyme Microb. Technol.*, 9, 66.
10. P. S. J. Cheetham, C. Garret and J. Clark (1985), *Biotechnol. Bioeng.*, 27, 471.
11. G. H. Gil, W. J. Jones and T. G. Tornabene (1991), *Enzyme Microb. Technol.*, 13, 390.
12. I. Chibata, T. Tosa, T. Sato, T. Mori and Y. Matsuo(1972), *Fermentation Technology Today*, Society of Fermentation Technology, P. 383, Japan.
13. S. Hayashi, J. Kinoshita, M. Nonoguchi, Y. Takasaki and K. Imada(1991), *Biotechnol. Lett.*, 13, 395.
14. S. Hayashi, K. Ito, M. Nonoguchi, Y. Takasaki and K. Imada(1991), *J. Ferment. Bioeng.*, 72, 68.
15. K. H. Jung, J. W. Yun, K. R. Kang, J. Y. Lim and J. H. Lee(1989), *Enzyme Microb. Technol.*, 11, 491.
16. J. Woodward(1985), *Immobilized cells*, P.14, IRL Press, Oxford.
17. J. W. Yun, Y. J. Jeon, M. G. Lee and S. K. Song(1993), *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, 8, 266.
18. J. Mansfeld, A. Schellenberger and J. Rombach(1992), *Biotechnol. Bioeng.*, 40, 997.