

## *Aureobasidium pullulans*를 이용한 Maltose로부터 Isomalto-oligosaccharides의 생산

윤 종 원 · 노 지 선 · \*송 주 영 · 송 승 구  
부산대학교 화학공학과  
\* 창원대학교 공업화학과

### Isomalto-oligosaccharide Production from Maltose by Intact Cells of *Aureobasidium pullulans*

Jong Won Yun, Ji Seon Noh, \*Ju Yeong Song and Seung Koo Song

Department of Chemical Engineering, Pusan National University,  
Pusan 609-735, Korea

\*Department of Chemical Technology, Changwon National University  
Kyungnam 641-773, Korea

#### ABSTRACT

A new method for the production of isomalto-oligosaccharides from maltose was investigated using intact cells of *Aureobasidium pullulans* which had been known to produce fructo-oligosaccharides. The cells showed transglucosylation activity producing isomalto-oligosaccharides at high concentrations of maltose, while they showed a hydrolytic activity at low concentrations of substrate when cultivated at 25°C. The optimum reaction conditions for the isomalto-oligosaccharide production were as follows: substrate concentration, 500 g/l maltose; pH, 4.5; temperature, 65°C; cell dosage, 10 unit per gram substrate. Under optimized conditions, the maximum yield of isomalto-oligosaccharides achieved was around 48 % (w/w). At the early period of reaction, panose was selectively produced from maltose, and thereafter isomaltotriose was synthesized by utilizing panose as a substrate when maltose consumption was discontinued.

#### 서 론

설탕 및 고과당 시럽(high fructose corn syrup) 등을 중심으로 하는 종래의 감미료 산업은 최근 여러가지 기능성을 나타내는 올리고당류가 개발되면서부터 새로운 국면을 맞게 되었다. Fructo-oligosaccharides(1-5), (iso)malto-oligosaccharides(6-7), soybean-oligosaccharides(8) 등의 올리고당류는 기존의 감미료가 갖고 있던 단점을 극복하는 동

시에 충치 예방(9), 장내 유용 세균의 증식(10), 저칼로리성(11) 등의 여러 가지 유용한 기능성을 지니고 있기 때문에 관심이 증가하고 있고 실제로 상업적으로 대량생산되어 광범위하게 이용되고 있다. 특히 isomalto-oligosaccharides(IMO)는 전분으로부터 생산되므로 올리고당류 중에서 가장 제조가격이 저렴하여 malto-oligosaccharides와 함께 일본의 경우 가장 큰 시장을 형성하고 있다(12).

IMO는 그 명칭상으로는 glucose 분자들이  $\alpha$ -1, 6

결합을 이루고 있는 isomaltotriose, isomaltotetraose 등의 올리고당류를 총칭하지만 실제로는 이당류인 isomaltose뿐만 아니라  $\alpha$ -1, 6 결합과  $\alpha$ -1,4 결합으로 이루어져 있는 panose, isopanose 또는 그 계열의 올리고당류를 모두 포함시키는 것이 일반적이다(6-7).

IMO의 제조공정은 다음과 같이 크게 3가지로 나눌 수 있다. 첫째, 전분에  $\alpha$ -amylase, (neo) pullulanase,  $\alpha$ -glucosidase 등의 전분 분해효소를 작용시켜 제조하는 방법(13), 둘째, maltose에  $\alpha$ -glucosyltransferase를 작용시켜 생산하는 방법(14), 셋째, pullulan을 원료로 pullulan 분해효소를 이용하여 생산하는 공정이 보고되어 있다(15).

최근 Kuriki 등(15)은 전분의  $\alpha$ -1,6 및  $\alpha$ -1,4 결합을 동시에 분해할 뿐 아니라, 분해된 당류로부터  $\alpha$ -1,6 및  $\alpha$ -1,4 결합의 올리고당을 합성할 수 있는 새로운 neopullulanase를 이용하여 기존의 공정에 비해 수율이 향상된 공정을 개발하였다. 또한 이들은 이 효소를 고정화하여 pullulan로부터 IMO의 주 성분 중의 하나인 panose를 고수율로 생산하였다(16).

저자들은 *A. pullulans*가 생산하는 효소(fructosyltransferase)의 과당 전이활성(transfructosylation)을 이용하여 오랫동안 fructo-oligosaccharides의 생산에 관해 연구를 수행한 바 있는데, 이 미생물을 maltose를 주 탄소원으로 하여 보다 낮은 온도에서 배양할 경우, glucose 전이활성(transglucosylation)을 갖는 효소를 생산한다는 사실을 발견하였다(17).

본 연구에서는 *A. pullulans* 균체의 glucose 전이활성을 이용하여 maltose으로부터 IMO 생산조건을 최적화한 후, 기존의 생산방법들과 비교함으로써 본 공정에 의한 IMO 생산의 타당성을 검토하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 시약

효소반응의 기질로 사용한 maltose는 Sigma Chemical Co.(U.S.A.)에서 생산된 grade II를 사용하였고, HPLC분석의 표준물질로 사용한 maltose, isomaltose, maltotriose, isomaltotriose, panose 등은 Sigma Chemical Co.의 특급 시약을 사용하였다. 그 이외의 시약들은 일반 시약급을 사용하였다.

### 미생물 배양

*Aureobasidium pullulans* KFCC 10245를 0.7% (w/v) sucrose, 8% maltose, 0.3% yeast extract, 0.3%  $K_2HPO_4$ , 0.2% KCl, 0.2%  $MgSO_4$ 의 배지 50ml가 함유된 250ml flask를 이용하여 25°C에서 96시간 동안 배양한 다음, 원심분리(3000g)하여 균체를 회수하였다. 균체를 증류수를 이용하여 2회 세척한 후 적당한 농도로 증류수에 현탁시켜 사용하였다.

### 효소 활성의 측정

500g/l maltose 6.5ml, 0.1M citrate buffer (pH 5.5) 2.3ml, 균체 현탁액 1ml의 혼합용액을 55°C에서 60분간 반응시키고 100°C에서 10분간 실활시킨 후 HPLC를 이용하여 생성된 panose의 양을 정량하였다. 1분간 1 $\mu$ mole의 panose를 생성하는데 필요한 효소의 양을 1unit로 정의하였다.

### 반응 생성물의 분석

모든 당류의 분석은 Aminex HPX-42C(300mm  $\times$  7.8mm, Bio-Rad, U.S.A.)칼럼이 장착된 HPLC (Varian, U.S.A.)를 사용하였으며, 검출기는 RI-4 refractive index detector, 이동상으로 초순수(18 megaohm  $\cdot$  cm)을 사용(1ml/min)하였으며 컬럼 온도는 85°C로 일정하게 유지해 주었다. Aminex HPX-42C 컬럼은 이성질체인 maltose와 isomaltose를 서로 효과적으로 분리하기 어려운 점 때문에 총 IMO의 농도산출시에 isomaltose는 IMO 구성당에서 제외시켰다.

### 효소반응실험

특별한 설명이 없는 한, 효소반응은 maltose 50 ml와 적정량의 균체 현탁액을 함유한 250ml 플라스크를 이용하여 진탕수조(shaking water bath)에서 pH 5.5, 온도 55°C의 조건으로 25시간 동안 수행하였다. 반응최적온도 및 pH 결정 실험은 전술한 조건에서, maltose 1그램당 10unit에 해당하는 균체를 첨가하여 2시간 동안 반응시킨 후 반응생성물을 HPLC로 분석하여 panose 생성량을 상대활성으로 나타내었다.

## 결과 및 고찰

### 최적반응온도 및 pH

*A. pullulans*가 생산하는 프락토올리고당 생산효

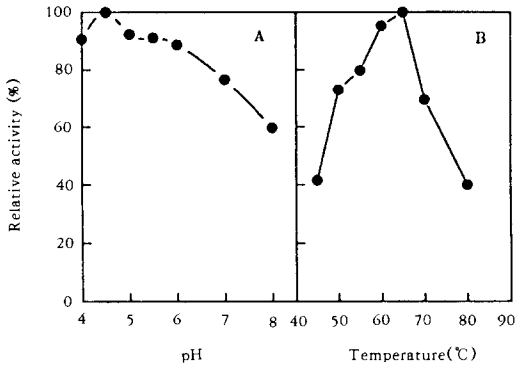


Fig 1. Effect of pH(A) and temperature(B) on the transglucosylation activity of the intact cells of *Aureobasidium pullulans*.

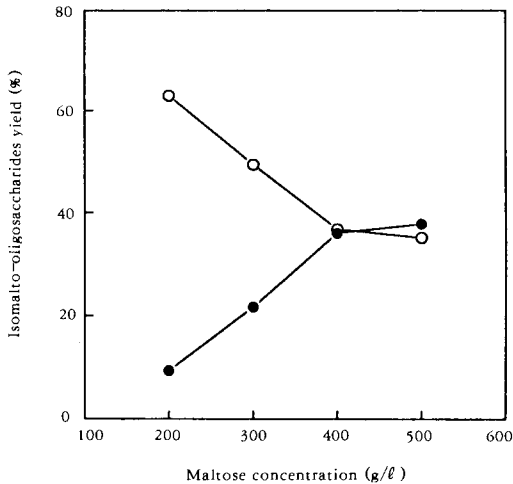


Fig 2. Effect of maltose concentration on the isomalto-oligosaccharide production by *Aureobasidium pullulans*: (○)glucose, (●) total isomalto-oligosaccharides.

소(fructosyltransferase)의 경우는 최적효소 활성 조건이 pH 5.5, 온도 55~60°C인 것으로 알려져 있다(5, 18). 이에 비해, Fig. 1에서 보여주는 바와 같이, IMO 합성을 위해서는 pH 4.5, 온도 65°C에서 효소활성이 최고를 나타내었다.

초기 활성은 65°C에서 가장 높게 나타났지만 반응 중의 효소의 안정성을 고려하여 장시간 반응에서는 pH 4.5, 55°C에서 반응을 수행하였다.

#### Maltose농도가 IMO 생성량에 미치는 영향

*Aureobasidium*속으로부터 생산된 fructosyltransferase를 이용하여 fructo-oligosaccharides를 생산할 때, 기질인 설탕의 농도가 극히 낮은 경우(10% 미만)에서는 정도는 낮지만 가수분해활성을 나타내는 경향이 있는 것으로 보고되어 있다(19). 특히 *Aspergillus niger*가 생산하는 fructosyltransferase는 *A. pullulans*의 경우보다 저농도 기질에서의 가수분해 활성이 상당히 큰 것으로 알려져 있다(3). 이와는 달리 저자들이 사용한 *A. pullulans*의 경우는 저농도의 sucrose농도에서도 가수분해 활성이 거의 나타나지 않았다. Fig. 2는 IMO생산에 가장 최적인 maltose 농도를 보여주고 있는데, 300g/l 이하의 농도에서는 가수분해 활성이 대단히 강하여 전체 반응생성물 중의 glucose 농도가 50%(w/w) 이상이었다. 따라서 기질농도가 높을수록 IMO생산에 유리하겠지만, 실제로 400g/l 이상의 농도에서 최종 IMO 수율은 거의 유사하였다. 이것은 최종 반응생성물 중에 glucose 비율이 거의 동일한 수준(26%, w/w)인 점으로 보아서 fructo-oligosaccharides 생성반응의 경우처럼(18) glucose가 IMO 생산반응에서도 저해제로 작용하는 것으로 판단된다.

#### 균체농도가 IMO 생성량에 미치는 영향

500g/l maltose을 기질로 이용하여 기질 1그램당 각각 5, 10, 15, 20unit에 해당하는 균체를 첨가하여 IMO 생산의 최적 균체농도 결정실험을 수행한 결과, Fig. 3에서와 같이 IMO 생산속도는 일반적인 효소반응에서와 같이 균체농도에 비례하였으나 10unit 이상에서는 거의 일정하였다. 따라서 이후의 실험에서는 기질 1그램당 10unit의 균체를 사용하였다.

#### 최적반응조건에서의 IMO 생산

IMO의 최대 생산량을 검토하기 위해서 최적반응 조건하에서 25시간 동안 반응을 수행한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 반응 초기에는 panose가 선택적으로 매우 높은 반응속도로 생성되었으며, 반응 9시간 후 IMO 생산량이 최고에 도달하였고 이때의 총 IMO 수율은 48.4%(w/w)이었다. 그 이후의 반응이 진행되는 동안에 maltose는 더 이상 기질로 이용되지 못하고 반응 종료시까지 23%(w/w) 전후의 비율로 반응물 중에 계속 잔류하였다. 한편 반응이 진행되는 동안 panose의 양이 감소하면서 isomatotriose가 panose 감소량에 비례하여

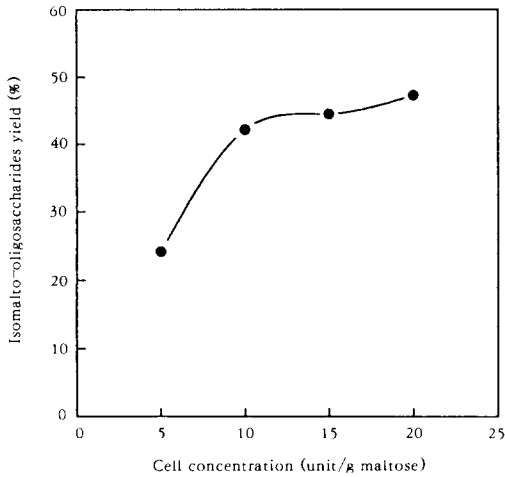


Fig 3. Effect of cell concentration on the isomalto-oligosaccharide production by *Aureobasidium pullulans*.

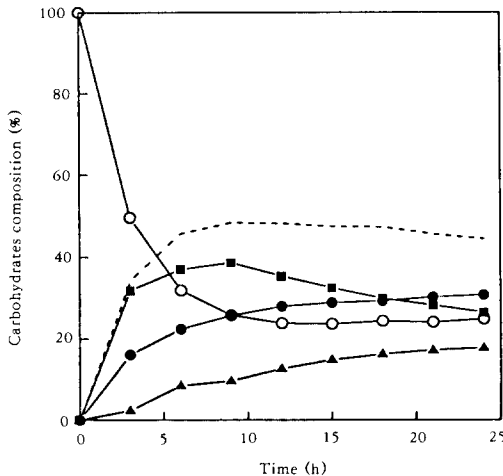


Fig 4. Carbohydrate composition of isomalto-oligosaccharides produced by using transglucosylation activity of *Aureobasidium pullulans*: (○)maltose+isomaltose, (■)panose, (●)glucose, (▲)isomaltotriose, (----)total isomalto-oligosaccharides.

증가하였는데, 이 결과로부터 isomaltotriose는 반응초기에 maltose로부터 미량 생성되기도 하지만 주로 panose를 기질로 이용하여 생성된다는 것을

Table 1. Comparison of the yields and carbohydrate composition of isomalto-oligosaccharides, and enzyme system with this system and the other systems.

Products	This system <sup>a)</sup>	System A <sup>b)</sup>	System B <sup>c)</sup>
Glucose	25.7	29.4	40.5
Maltose	<25.9	27.2	6.7
Isomaltose		10.1	16.9
Maltotriose	—	1.6	0.8
Isomaltotriose	9.8	—	3.4
Panose(isopanose)	38.6	25.9	12.5
6 <sup>c</sup> -O- $\alpha$ -Maltosyl-maltose	—	5.8	0
Other oligosaccharides	—	—	19.2
Yield of IMO(%)	>48.4	43.4	32.8
Enzyme system	intact cells of <i>A. pullulans</i>	neopullulanase	$\alpha/\beta$ -amylases, pullulanase, and $\alpha$ -glucosidase

a) Data in this work

b) Data from reference 15

c) Data from reference 13

알 수 있다.

### IMO 생산공정의 비교

지금까지 문헌에 보고되어 있는 IMO 생산공정과 본 연구에서의 공정을 Table 1에 비교하여 나타내었다. 네 종류의 효소를 사용한 System B의 경우와 neopullulans 단일 효소계를 이용한 System A에 비해, 본 연구에서의 생산공정이 IMO 수율면이나 제조공정 측면에서 불리하지 않기 때문에 IMO 생산공정의 하나로 개발될 수 있으리라고 판단된다. 또한 *A. pullulans* 균체에 의해 생산된 IMO는 다른 system에 비해 panose의 비율이 높고 glucose의 비율이 낮은 것이 특징이다.

### 요 약

*Aureobasidium pullulans* 균체를 이용하여 maltose로부터 isomalto-oligosaccharides를 생산하였다. 저농도의 maltose를 기질로 이용할 경우에는 가수분해활성이 transglucosylation활성보다 매우 강하여 isomalto-oligosaccharides 합성수율이 매우 낮았으나 400g/ℓ 이상의 고농도기질에서는 isomalto-oligosaccharides 합성이 유리하였다. isomalto-oligosaccharides 생산의 반응 최적조건은

pH 4.5, 온도 65°C, 균체농도는 기질 그램당 10unit이었다. 이때 생산된 isomaltooligosaccharides의 수율은 최고 48.35%였다. 반응초기에 maltose로부터 panose가 선택적으로 생산되었고, maltose가 더 이상 기질로 이용되지 못하는 반응시점에서 panose를 기질로 이용하여 isomaltotriose가 생산되었다.

### 참고 문헌

1. S. Hayashi, K. Itho, M. Nonoguchi, Y. Takasaki and K. Imada(1991), *J. Ferment. Bioeng.*, **72**, 68.
2. S. Adachi, Y. Udea and K. Hashimoto(1984), *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 121.
3. H. Hidaka, M. Hirayama and N. Sumi(1988), *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1181.
4. J. W. Yun, K. H. Jung, J. W. Oh and J. H. Lee(1990), *Appl. Biochem. Biotechnol.* **24/25**, 299.
5. J. W. Yun, K. H. Jung, Y. J. Jeon and J. H. Lee(1992), *J. Microbiol. Biotechnol.*, **2**, 98.
6. T. Kohmoto, F. Fukui, H. Takaku and T. Mitsuoka(1991), *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 2157.
7. T. Komoto, F. Fukui, H. Takaku, Y. Machida, M. Arai and T. Mitsuoka(1988), *Bifidobacteria Microflora*, **7**, 61.
8. K. Wada, J. Watanabe, J. Mizutani, M. Tomoda, H. Suzuki and Y. Saitoh(1992), *Nippon Noeikagaku Kaishi*, **66**, 127.
9. 네오슈카가연구회(1984), 第2回ネオシュカ研究會報告書(일본).
10. H. Hidaka, T. Eida, T. Takizawa, T. Tokunaga and Y. Tashiro(1986), *Bifidobacteria Microflora*, **5**, 37.
11. T. Oku, T. Tokunaga and N. Hosoya(1984), *J. Nutr.*, **114**, 1574.
12. 월간 Food Chemical(일본)(1989), 10월호, 21.
13. H. Takaku(1988), *Handbook of amylase and related enzymes*, 215-217, The Amylase Research Society of Japan ed. Pergamon Press, Oxford.
14. T. Ooshima, T. Fujiwara, T. Takei and A. Izumitani(1988), *Microbiol. Immunol.*, **32**, 1093.
15. T. Kuruki, M. Yanase, H. Takata, Y. Takesada, T. Imanaka and S. Okada(1993), *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 953.
16. T. Kuriki, M. Tsuda and T. Imanaka(1992), *J. Ferment. Bioeng.*, **73**, 198.
17. J. W. Yun, M. G. Lee and S. K. Song(1994), *Biotechnol. Lett.*, **16**(4), 359.
18. K. H. Jung, J. W. Yun, K. R. Kang, J. Y. Lim and J. H. Lee(1987), *Enzyme Microb. Technol.*, **11**, 491.
19. S. Hayashi, M. Nonokuchi, K. Imada and H. Ueno(1990), *J. Ind. Microbiol.*, **5**, 395.