

## *Aspergillus niger* 유래의 Transglucosidase의 이소말토올리고당 생성반응 특성

안장우 · 홍승서\* · 박관화\*\* · 서진호\*\*

동서식품기술연구소, \*선일연구소,  
\*\*서울대학교 식품공학과 및 농업생물 신소재 연구센터

### Reaction Mode of Transglucosidase from *Aspergillus niger* for Production of Isomaltooligosaccharides

Jang-woo Ahn, Seung-suh Hong\*, Kwan-wha Park\*\* and Jin-ho Seo\*\*

Technical Research Institute, Dongsuh Foods Corporaton, \*Sunil Research Institute

\*\*Department of Food Science and Technology, Seoul National University,

Research Center for New Bio-Materials in Agriculture

#### Abstract

The research was undertaken to characterize the reaction mode of transglucosidase (TG) from *Aspergillus niger* for the production of isomaltooligosaccharides such as isomaltose, panose and isomaltotriose. TG hydrolyzed maltose to glucose units and produced panose and glucose by transglucosylation. TG hydrolyzed panose to maltose and glucose when panose was used as an initial substrate. The reaction patterns of products when isomaltose, isomaltotriose or isomaltotetraose were used as substrates were different from the case when maltose was used as a substrate. Maltotriose and maltose showed the same formation pattern of products. TG also produced isomaltooligosaccharides from maltooligosaccharides. The production of panose by TG from maltose was mathematically described by Michaelis-Menten kinetics. The kinetic constants,  $V_{max}$  (the maximum velocity) and  $k_m$  (Michaelis constant), were estimated by Lineweaver-Burk plot to be 400 M/min and 21.4 mM, respectively.

Key word: *Aspergillus niger*, transglucosidase, isomaltooligosaccharides, reaction mode

## 서 론

대부분의 올리고당은 단당류나 이당류, 혹은 전분과 xylan같은 다당류를 기질로 해서 특정 효소에 의한 당 전이반응을 통하여 생성된다. Transglucosidase (TG)는 maltose를 기질로 하여 이소말토올리고당을 생산하는 효소의 한 종류이다. 이소말토올리고당은  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)-glucosidic linkage를 가지고 있는 glucosylsaccharide를 말하며 isomaltose, panose, isomaltotriose 등을 주성분으로 한다. 이러한 이소말토올리고당은 효모에 의해 발효되지 않는 비발효성 당으로서 청주<sup>(1)</sup>, 꿀<sup>(2)</sup>, 간장<sup>(3)</sup> 등에 존재한다.

이소말토올리고당은 생리적으로 여러가지 유효한 특성을 지닌다. 이소말토올리고당은 장내의 Bifidobacteria를 증식시켜 정장작용을 촉진하며<sup>(4,7)</sup> 장내 pH를 저하시켜 유해균의 증식을 억제하고<sup>(8)</sup> 충치예방과<sup>(6,9-12)</sup> 혈청지질의 감소효과가 있다고 보고되었다<sup>(13)</sup>. 이소말토올리고당의 감미도는 설탕의 약 50% 정도이며 순한맛과 감칠맛을 특징으로 하는 양질의 감미료이다. 또한 이소말토올리고당의 주성분들이  $\alpha$ -1,6 결합을 가지고 있어 노화방지 효과가 있으며 특히 panose가 우수하다고 확인되고 있다. 열안정성 및 산에 대한 안정성도 커서 식품에 광범위한 응용이 가능하다<sup>(4,15)</sup>. 이에 따라 식품신소재로서 올리고당의 소비가 계속 늘어나고 있는 추세이다<sup>(16)</sup>.

최근 국내에서는 전분 용액에 *Bacillus licheniformis* 유래의 maltogenic amylase (BLMA)를 처리하여 분지 올리고당을 생산할 수 있는 기술도 개발하였으며<sup>(17,18)</sup>,

Corresponding author: Jin-ho Seo, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture and Life Science, Seoul National University, Seodoo-dong, Kwunsun-ku, Suwon, Kyunggi-do 441-744, Korea

*Aureobasidium pullulans*를 이용하여 maltose로부터 이소말토올리고당의 성분중 panose를 생산하였다는 보고도 있다<sup>(19)</sup>.

초기에는 산업적으로 이용할 만한 올리고당이 많지 않았으나, 올리고당의 제조에 관여하는 여러 효소가 발견되고, 이러한 효소를 이용하여 올리고당의 상업적인 생산공정이 개발되면서 다양한 올리고당을 생산할 수 있게 되었다<sup>(4)</sup>. 본 연구에서는 *A. niger* 유래의 TG의 이소말토올리고당 생성과 관련된 효소반응 특성을 살펴보고자 하였다. 특히 기질의 종류에 따른 반응특성과 maltose로부터 panose의 생성과 관련된 속도 상수를 구하였고 향후 고정화효소의 활용을 위한 기초자료를 제공하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 효소용액

본 실험에서 사용한 TG는 *A. niger*에서 유래한 효소이다. 이소말토올리고당을 생산하기 위해 (주)선일 제넥스에서 사용하고 있는 "Transglucosidase Amano L"을 액상으로 공급받아 사용하였다.

### 사용 시약

Isomaltose, isomaltotriose, isomaltotetraose, panose 등은 Sigma Chemical Co. 에서 구입하여 사용하였으며, maltose는 Fluka사, 포도당은 Merck사 제품을 사용하였다. Buffer용으로 사용한 acetic acid는 Junsei Chemical Co., NaOH는 Tedia Co. 제품을 사용하였다.

### 실험 기구

Ion chromatography는 Dionex사의 Series 4000i 기기를 이용하였고, peak의 면적계산과 결과의 출력을 위한 integrator는 Spectra Physics사의 SP4100을 사용하였다. Ion chromatography에 주입하기 전의 시료의 여과를 위해 Gelman사의 acrodisc (0.2  $\mu$ m) syringe filter를 이용하였다. 효소반응을 위한 진탕항온수조는 Vision사 제품을 이용하였다.

### Transglucosidase의 활성 측정 방법

1%(w/v) maltose 1.5 ml에 0.1 M sodium acetate buffer (pH 5.0) 1.2 ml를 시험관에 넣어 미리 40°C에서 5분간 예열시킨 후 효소용액 0.3 ml를 넣고 160 strokes/min의 진탕항온수조에서 2분간 반응시켰다. 효소반응은 끓는 물에서 5분간 가열하여 중지시켰고 상운의 물을 이용하여 5분간 냉각시킨 후 적당한 배수

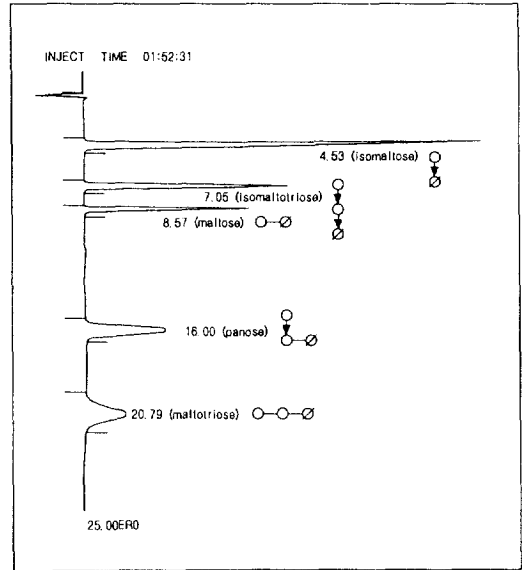


Fig. 1. Chromatogram of components in isomaltooligosaccharides analyzed by ion chromatography (concentration of each component, 25 mg/l:  $\circ$ , reducing sugar;  $\text{---}$ ,  $\alpha$ -1, 4-linkage;  $\downarrow$ ,  $\alpha$ -1,6-linkage)

로 회석하여 ion chromatography를 이용하여 분석하였다. 효소의 활성은 chromatogram상의 panose peak의 면적을 기준으로 계산하였다. 효소의 1 unit는 40°C, pH 5.0에서 1분에 1  $\mu$ mole의 panose를 생성시키는 효소의 양으로 결정하였다.

효소반응에 의해 생성된 panose와 그 밖의 반응산물의 농도는 ion chromatography로부터 얻은 chromatogram을 이용하여 분석하였다. Ion chromatography의 분석조건은 참고문헌<sup>(20)</sup>에 자세히 나와 있다.

### 이소말토올리고당의 각 성분의 정량

Ion chromatography에서 각 성분의 retention time은 Fig. 1에서 보는 바와 같이 isomaltose가 4.5분, isomaltotriose 7.0분, maltose 8.6분, panose 16.0분, maltotriose 20.8분에서 peak를 보였다. 포도당의 retention time은 3.3분으로 나타났다. 각 peak의 면적으로부터 각 성분의 최종농도를 계산하였다.

### 반응시간에 따른 효소반응산물의 생성양상

효소가 첨가된 이후에 일어나는 반응물과 생성물들의 변화양상을 알아보기 위해 0.1 M sodium acetate buffer (pH 5.0)를 이용하여 30%(w/v)의 maltose 용액, 200 ml를 500 ml flask에 넣고 마개로 막은 후 55°C에

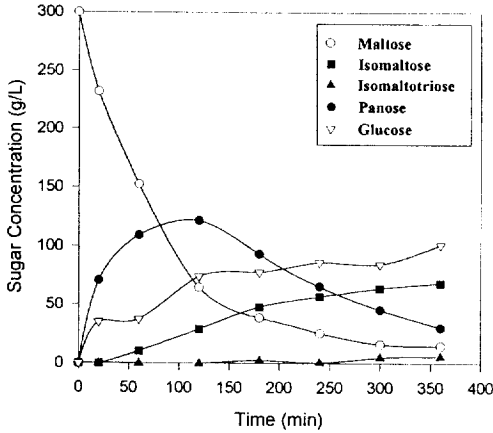


Fig. 2. Time courses of the formation of isomaltooligosaccharides from maltose by soluble transglucosidase at pH 5.0 and 55°C (5  $\mu$ l enzyme solution per 1 g substrate was added.)

서 예열시킨 후 300  $\mu$ l의 효소용액을 첨가하였다. 적당한 시간마다 시료를 채취하여 끓는 물에서 5분간 가열시켜 효소를 실효시킨 뒤 알맞는 배수로 희석한 후 ion chromatography로 분석하였다.

속도상수 측정

기질농도에 대한 TG의 반응속도를 측정하여 Lineweaver-Burk plotting을 통해  $k_m$ 과  $V_{max}$ 를 구하였다. 기질용액은 15.4 mM부터 200 mM의 범위 내에서 maltose 용액으로 준비하였다.

결과 및 고찰

기질이 maltose일 때의 반응산물 생성패턴

기질을 30%(w/v) maltose 용액으로 했을 때 반응시간에 따라 TG에 의해 생성되는 반응산물의 패턴은 다음의 Fig. 2와 같다. 효소는 기질 1g에 대해 100배 희석시킨 TG용액 5  $\mu$ l를 첨가하였다. 반응이 진행될수록 maltose의 농도는 지속적으로 감소되며 중간산물인 panose는 초기에 급격히 생성되어 120분에서 최고 농도에 도달한 후에 다시 서서히 감소하는 양상을 보였다. 그러나, 포도당과 isomaltose, isomaltotriose는 반응 시간이 경과함에 따라 비례적으로 증가하였다. 반응 시작 후 60분까지는 초기반응에서 포도당과 panose의 생성속도는 유사하였다.

Panose를 기질로 한 경우의 반응산물 생성패턴

132 mM의 농도를 가진 panose 용액을 기질로 하여

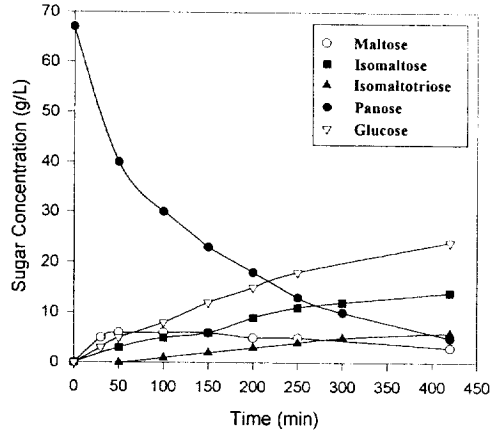


Fig. 3. Time courses of the formation of isomaltoligosaccharides from panose by soluble transglucosidase at pH 5.0 and 40°C

TG를 반응시켰을 때의 반응산물의 생성패턴을 조사한 결과는 다음의 Fig. 3과 같다. 반응초기에 기질인 panose는 포도당과 maltose로 급격히 분해되면서 여기서 생성된 maltose는 다시 새로운 기질로 작용하여 isomaltose와 isomaltotriose로 전환이 일어났음을 알 수 있었다.

isomaltose, isomaltotriose, isomaltotetraose를 기질로 한 경우의 반응산물 생성패턴

TG는  $\alpha$ -1,4-결합 뿐만 아니라  $\alpha$ -1,6-결합도 가수분해할 수 있다는 것은 panose를 기질로 하였을 때 반응 초기에 maltose와 포도당이 생성되는 사실로 확인할 수 있었다. Panose 이외에  $\alpha$ -1,6-결합을 가진 isomaltose나 isomaltotriose, isomaltotetraose ( $[\alpha$ -D-glc-(1 $\rightarrow$ 6)] $_n$ - $\alpha$ -D-glucose) 등을 1g/l의 농도로 만들어 TG의 기질로 하였을 때 반응의 진행에 따른 반응산물의 생성패턴을 다음의 Fig. 4에 나타내었다.

1 mole의 isomaltose는 TG에 의해 2 mole의 포도당으로 가수분해되었다. 1 mole의 isomaltotriose는 반응 초기에 우선 각각 1 mole씩의 isomaltose와 포도당으로 가수분해된 후 이 때 생성된 isomaltose도 다시 포도당으로 가수분해되었다. Isomaltotetraose는  $\alpha$ -1,6-결합이 3개 존재하는 분자인데 TG에 의해 반응초기에 1 mole의 isomaltotetraose는 역시 1 mole씩의 isomaltotriose와 포도당으로 분해되고 여기서 생성된 isomaltotriose는 다시 isomaltose와 포도당으로 분해되었다. 기질의  $\alpha$ -1,6-결합의 수가 많아질수록 같은 시간에 기질이 반응산물로 전환되는 정도가 낮았다. 위의  $\alpha$ -1,6-결합만을 가진 기질과는 달리  $\alpha$ -1,4-결합만을

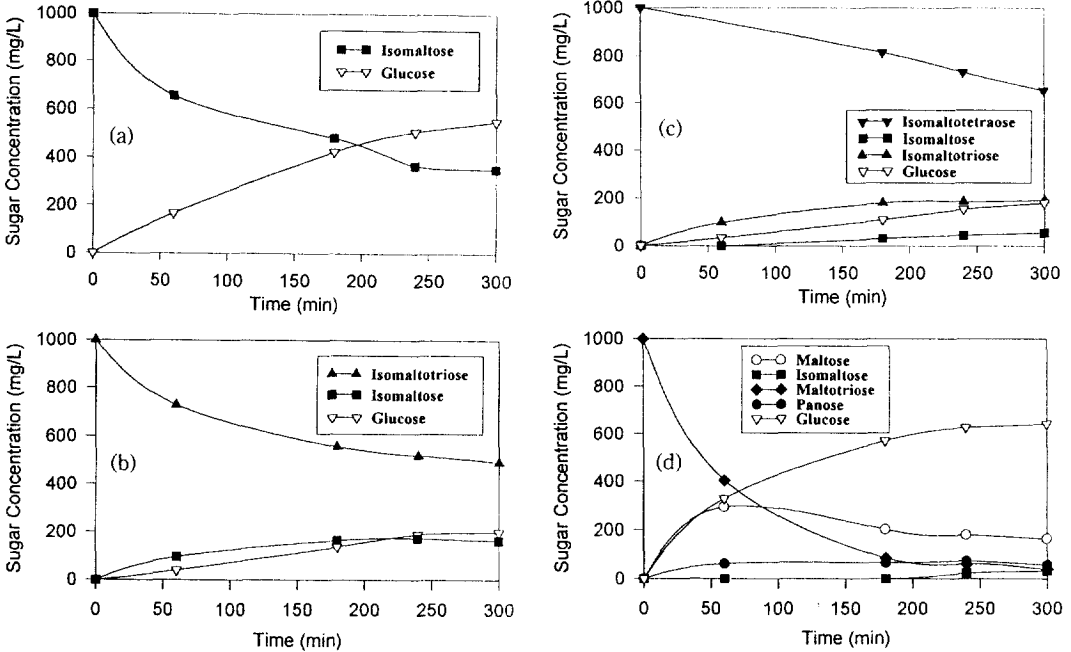


Fig. 4. Time courses of the formation of products from various kinds of substrate by transglucosidase at pH 5.0 and 40°C (concentration of substrate solution : 100 mg/l) a) Isomaltose, b) Isomaltotriose, c) Isomaltotetraose, d) Maltotriose

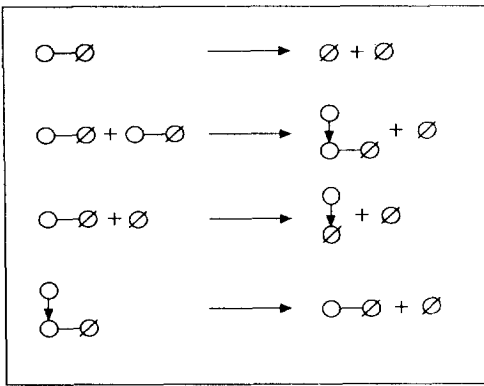


Fig. 5. Proposed model for action pattern of transglucosidase (∅; reducing sugar, ↓; α-1,6 linkage)

2개 가진 maltotriose의 경우는 maltose의 경우와 유사한 패턴을 보였다. 즉, 1 mole의 maltotriose는 반응초기에 먼저 각각 1 mole의 maltose와 포도당으로 분해되고 여기서 생성된 maltose 2 mole이 TG에 의해 당전이 반응을 거쳐 panose와 포도당으로 생성되는 것으로 판단되었다. Maltotriose는 α-1,6-결합만을 가진 기질보다 훨씬 빨리 생성물로 전환되었다.

TG에 의한 분지올리고당의 생성기작은 다음의 Fig. 5의 처음 세 종류의 반응이 동시에 일어난다고 알려져 있다<sup>(21)</sup>. 그러나 앞의 실험결과 등을 볼 때 초기에 생성

된 panose는 다시 maltose와 포도당으로 분해되는 과정을 거쳐서 isomaltose와 isomaltotriose로 전환됨을 알 수 있었다.

말토올리고당을 기질로 한 경우의 반응산물 생성패턴 포도당과 maltose, maltotriose는 포함되어 있지 않고 maltotetraose (G4)부터 maltodecaose (G10)까지로 구성된 말토올리고당을 기질로 하였을 때 TG에 의한 반응산물의 패턴을 조사하였다. 기질은 Sigma Chemical Co.에서 입수한 maltooligosaccharides를 0.2 M sodium acetate buffer (pH 5.0)에 녹여서 25%(w/v) 용액으로 만들어 사용하였고 55°C의 진탕항온수조에서 TG와 반응시킨 결과는 다음의 Fig. 6에 나타내었다. 위의 결과는 maltose만을 기질로 하였을 경우와는 매우 다른 양상을 보였다. 특히 기질의 가수분해로 포도당이 급격히 생성되면서 곧 이어 isomaltose가 생성되었으며 그 후에 isomaltotriose가 증가하기 시작하였다. 반면에 maltose는 초기에 2.6 g/l의 낮은 수준으로 생성된 이후에 반응이 진행되는 동안 큰 변화없이 거의 일정한 수준을 유지하였고 panose 역시 매우 낮은 농도인 0.4 g/l까지 생성된 후에 거의 일정한 농도로 유지되는 패턴을 보였다.

본 연구에서 사용된 *A. niger* 유래의 TG는 기질인 maltose로부터 panose, isomaltose, isomaltotriose를 생

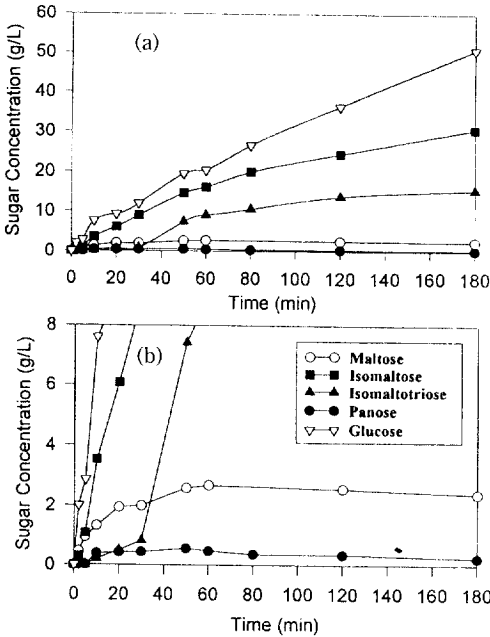


Fig. 6. Time courses of formation of iso-maltooligosaccharides from 25% maltooligosaccharides (G4-G10) as substrate solution by transglucosidase at pH 5.0 and 55°C [a] and b) are the same figure with different scale]

성하였다. TG는 여러 말토올리고당과 이소말토올리고당을 가수분해하지만 phenyl  $\alpha$ -glucoside, 설탕, 가용성 전분에 대해서는 활성이 매우 낮거나 거의 없다고 알려져 있다. *Mucor javanicus*  $\alpha$ -glucosidase는 maltose와 가용성 전분에 대해서는 비교적 높은 활성을 보이나, *A. niger*의 TG와는 달리 isomaltose, panose에는 거의 활성을 보이지 않는다. 또, *M. javanicus*의 효소는 maltose로부터 당전이 반응을 통해 maltotriose가 주요 반응산물로 생성되는데 이것은 포도당 잔기가 maltose를 acceptor로 하여  $\alpha$ -1,4-결합을 생성시켜 maltotriose를 생성시키는 것이다. 그러나 *A. niger*의 TG는 maltose를 acceptor로 하는 것은 동일하나  $\alpha$ -1,4-결합이 아닌  $\alpha$ -1,6-결합을 생성시켜 초기반응의 중요 반응산물로 panose가 생성된다는 것이 특징이라고 할 수 있다. 효모인 *Candida tropicalis* var. *japoica*는 maltose, isomaltose는 물론 가용성 전분에 대해서도 활성을 보였다<sup>(22)</sup>. *Saccharomyces italicus* Y1225  $\alpha$ -glucosidase는 maltose, sucrose에 대해서는 활성을 보였으나 isomaltose에 대해서는 활성을 보이지 않았다<sup>(23)</sup>. TG는 말토올리고당이 기질인 경우에도 가수분해반응에 의한 포도당의 생성과 함께 당전이 반응에 의해 isomaltose나 isomaltotriose가 생성될 수 있음을 보여

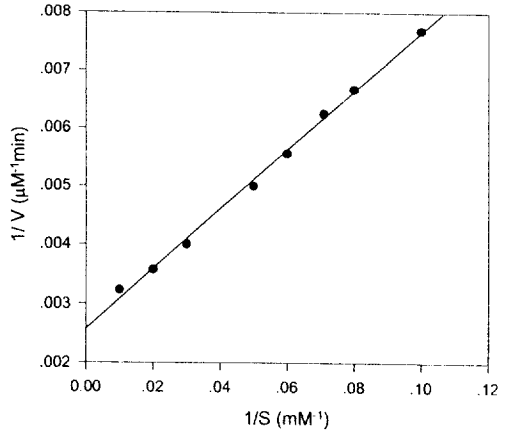


Fig. 7. Lineweaver-Burk plot of soluble transglucosidase at pH 5.0 and 40°C using a maltose solution as substrate

주었으며, maltose가 초기 기질이었을 때와는 달리 중간산물이었던 panose를 거치지 않고도 직접 isomaltose나 isomaltotriose가 생성될 수 있음을 보여 주었다. 또, 포도당 잔기의 acceptor로서 isomaltose의 농도가 높아지면 isomaltotriose의 생성이 촉진되는 반면 포도당 잔기의 acceptor로서 maltose의 농도가 높을 때에는 panose의 생성이 촉진된다는 것을 짐작케 해주었다. 이것은 곧 isomaltose나 isomaltotriose 분자에서 가장 윗 부분에 있는 포도당 잔기가 마지막에 전이된 것임을 의미한다.

속도상수의 결정

maltose를 기질로 하였을 때 panose의 생성속도를 식(1)과 같이 Michaelis-Menten equation으로 표시하였다.

$$v = \frac{d(\text{pan})}{dt} = \frac{V_{\max}(S)}{k_m + (S)} \tag{1}$$

(S)는 maltose의 농도(mmol/l)이고 v는 mmol pan/l·min이다. 실험결과 Lineweaver-Burk plotting으로 해석하여 속도상수 V<sub>max</sub>와 k<sub>m</sub>을 구한 결과 각각 400 μM/min과 21.4 mM이었다(Fig. 7).

요 약

올리고당중에서  $\alpha$ -1,6-결합을 가진 isomaltose, isomaltotriose, panose 등을 주성분으로 하는 이소말토올리고당의 생산을 위해 *A. niger* 유래의 transglucosidase (TG)의 효소학적 특성을 살펴보았다. TG는

maltose를 포도당으로 가수분해하여 panose와 포도당을 생성하였다. Panose가 초기기질일 때 TG는 panose를 maltose와 포도당으로 가수분해하였다.  $\alpha$ -1,6-결합을 가진 isomaltose나 isomaltotriose, isomaltotetraose를 기질로 하였을 때 반응산물의 생성은  $\alpha$ -1,4-결합을 가진 maltose가 기질일 경우와는 다른 양상을 보였다. 반면 maltotriose를 기질로 한 경우에는 maltose와 유사한 양상을 보였다. TG는 maltotetraose (G4)에서 maltodecaose (G10)가 주성분인 말토올리고당을 기질로 한 경우에도 이소말토올리고당을 생성하였다. 기질인 maltose로부터 TG에 의해 panose가 생성되는 반응은 Michaelis-Menten 식으로 표현되었으며 최대속도,  $V_{max}$ 와 Michaelis 상수,  $k_m$ 은 각각 400  $\mu$ M/min과 21.4 mM 이었다.

### 감사의 글

본 과제를 지원해 준 한국과학재단에 감사드립니다.

### 문 헌

- Nunokawa, Y.: Oligosaccharides in sake. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **28**, 109 (1981)
- White, J.W. and Hoban, N.: Composition of honey. IV. Identification of the disaccharides. *Arch. Biochem. Biophys.* **80**, 386 (1959)
- Nishino, R., Ozawa, Y., Yasuda, A. and Sakasai, T.: Oligosaccharides in soy souce. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **28**, 125 (1981)
- 菅野智榮: イソマルトオリゴ糖. 機能性食品と開發展望, シ-エムシ-, 東京, p.89 (1988)
- Takanobu K., Fukui F., Takaku H., Machida Y., Arai M. and Mitsuoka, T.: Effect of isomaltooligosaccharides on human fecal flora. *Bifidobacteria Microflora* **7**, 61 (1988)
- 이현우: 올리고당의 기능성 및 식품에의 이용. *식품기술* **7**, 49 (1994)
- Hidaka, H., Eida, T., Takizawa, T., Tokunaga, T. and Tashiro, Y.: Effects of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health. *Bifidobacteria Microflora*, **5**, 37 (1986)
- Delzenne, N.M. and Roberfruid, M.R.: Physiological effects of non-digestible oligosaccharides. *Lebensm. -Wiss. u. -Technol.*, **27**, 1 (1994)
- Hamada, S., Koga, T., Fujiwara, T. and Ooshima, T.: Role of oligosaccharides in dental caries development. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, **31**, 83 (1984)
- 박관화: 기능성당의 종류와 특성. 올리고당의 기능성 (한국식품과학회 심포지움), 1 (1994)
- 浜田茂幸, 大島隆: 蟲齒の病因を食品の開發, 食品と開發, **29**, 4 (1994)
- 高添一郎, 松久保隆: 口腔保健における砂糖代替糖の意義, 食品と開發, **29**, 8 (1994)
- Kaneko, T., Kohmoto, T. and Kikuchi, H.: Digestibility of isomaltooligosaccharides by rats and effects on serum lipids. *Nippon Nogeikagaku Kaishi.*, **66**, 1211 (1992)
- 金昌睦: 올리고糖. 機能性食品의 導入과 개발동향, **24** (1992)
- 권혁권, 육철: 이소말토올리고당의 물리화학적 특성 및 식품에서의 이용. *생물산업*, **7**, 26 (1994)
- 서진호: 국내 올리고당 연구 및 개발동향. 올리고당의 기능성(한국식품과학회 심포지움), 56 (1994)
- Kim, I.C.: Molecular cloning of thermostable  $\alpha$ -amylase and maltogenic amylase from *Bacillus licheniformis* and characterization of their enzymatic properties. Ph.D. thesis, Seoul National University (1991)
- Kim, I.C., Yoo, S.H., Lee, S.J., Oh, B.H. Kim, J.W. and Park, K.W.: Synthesis of branched oligosaccharides from starch by two amylases cloned from *Bacillus licheniformis*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 416 (1994)
- Yun, J.W., Lee, M.G. and Song, S.K.: Production of panose from maltose by intact cells of *Aureobasidium pullulans*. *Biotech. Lett.*, **16**, 359 (1994)
- 안장우: *Aspergillus niger* 유래의 Transglucosidase에 의한 이소말토올리고당의 생산. 박사학위 논문, 서울대학교 (1995)
- Takaku, H.: Anomalously linked oligosaccharides mixture ("Alo mixture") In *Handbook of Amylase and Related Enzymes: The Sources, Isolation Methods, Properties and Applications*, The Amylase Research Society of Japan, Osaka, Japan (ed.), Pergamon Press, New York, p.215 (1988)
- Sawai, T. and Hehre, E.J.: A novel amylase that catalyzes glucosyl transfer from starch and dextrins. *J. Biol. Chem.*, **237**, 2047 (1962)
- Halvorsar, H. and Ellias, L.: The purification and properties of and  $\alpha$ -glucosidase of *Saccharomyces cerevisiae* Y1225. *Biochimica Biophysica Acta*, **30**, 28 (1958)

(1995년 10월 16일 접수)