J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.
26(3), 534~539(1997)

한국식품영양과학회지

Quaternary Alkyl Alkanolammonium기를 가지는 다공성 지지체에 Fructosyltransferase의 고정화

정미선 · 이선희 · 전덕영* · 황금택** · 엄태붕***†

전북대학교 응용생물공학부, *전남대학교 식품영양학과
**전북대학교 식품영양학과, ***전북대학교 생물과학부 및 유전공학연구소

Immobilization of Fructosyltransferase to a Porous Carrier Bearing Quaternary Alkyl Alkanolammonium Groups

Mi-Sun Chung, Sun-Hee Lee, Deok-Young Jhon*, Keum-Taek Hwang and Tai-Boong Unm***†**

Faculty of Biotechnology, Chonbuk National University, Chonju 561-756, Korea
**Dept. of Food Sciences and Nutrition, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea*
***Dept. of Food Science and Human Nutrition and ***Faculty of Biological Sciences and Institute for Molecular Biology and Genetics, Chonbuk National University, Chonju 561-756, Korea*

Abstract

In order to reuse enzyme efficiently, a method for ionic binding of fructosyltransferase to a porous carrier bearing quaternary alkyl alkanolammonium groups was investigated. The fructosyltransferase activity of the immobilized enzyme increased with increasing amount of loaded enzyme, and maximally reached 770U/g of the carrier when loaded amount of the enzyme was 18.2mg/g carrier. The immobilized fructosyltransferase had optimum pH and temperature of 7.5 and 45°C, respectively, whereas soluble enzyme had 6.5 and 55°C : the Km value for the immobilized enzyme was 27.8 mM for sucrose, which was the same as that of soluble enzyme. In a batch reactor, the enzyme produced a mixture of fructooligosaccharides, mainly F_2G to F_5G, from sucrose with the slight loss of enzyme activity during continuous operation of 12 days at 42°C.

Key words: immobilization, fructosyltransferase, fructooligosaccharides

서 론

세계시장에서 올리고 과당은 건강 지향적인 기능식품으로서 그 역할(1)이 보고되고 있기 때문에 수요가 급증하고 있다. 이러한 특성들은 저칼로리 감미료(1.5 kcal/g), 식이섬유로서의 역할, *Bifidus* 및 장내 유익균의 증식인자의 기능으로 요약될 수 있다. 올리고 과당의 생산은 2가지 방법을 생각할 수 있는데 한가지는 설탕(sucrose)에 fructosyltransferase를 넣어 전이에 의한 합성방법이고 다른 하나는 식물에 존재하는 과당 중합체인 이눌린(중합도 30~50)에 endoinulinase를 반응시켜 일정한 크기들의 올리고당으로 분해시키는 방법이다. 현재 일본의 Meiji Seka나 한국의 삼양 제넥스, 제일제당, 세원 등은 기질로서 설탕을 쓰는 앞의 방법을 이용하는 반면 벨기에의 Orafti는 치커리에서 분리한 이눌린을 기질로 한 후자의 방법을 쓰고 있다. 치커리나 돼지감자는 단위면적당 높은 수확량을 보이며 이눌린 이용시 반응 공정의 단순성 및 높은 올리고 과당의 수율(약 90%)을 보이기 때문에 앞으로 올리고 과당의 주된 생산수단이 될 수 있다. 그러나, 현재 상업적으로는 설탕의 가격이 이눌린 가격 보다는 저렴하기 때문에 경제적인 관점에서 올리고 과당의 생산은 설탕을 이용하는 방법이 유리한 것 같다. 올리고 과당 생산에 이용되는 fructosyltransferase는 미생물로부터 추출 및 분리가 쉽지 않기 때문에 경제적이고 효율적인 재이용을 위해서 여러 고정화 방법이 시도되어 왔다. 즉, 지지체로서 다공성 유리(1,2), DEAE cellulose(3), 다공성 음이온 교환수지(4,5)에 효소의 고정화와 calcium alginate bead

†To whom all correspondence should be addressed

내에 *Aureobasidium pullulans*세포를 직접 고정화(6)하는 방법을 시도하였다.

고정화 방법들 중 제일 제당에서 개발한 효모세포의 직접 고정화 방법은 현재 상업적인 성공 케이스로 여겨진다. 이 방법은 많은 장점을 가지고 있지만, 몇 개월마다 고정화된 효모를 폐기하고 다시 만들어야하기 때문에 환경 문제를 야기할 수 있고, 반응의 정확한 유지를 위하여 반응조 및 배지의 정교한 조절이 필요하며, 단위 시간당 생산 수율이 다른 효소 고정화 방법보다 낮은 단점이 있다. 한편 세포 고정화가 아닌 효소 고정화 방법들은 일반적으로 효소의 정제 비용, 지지체의 높은 가격에 비한 낮은 고정화율 때문에 아직도 상업적 성공을 거두지 못하고 있다. 그러나, 이 고정화 방법을 위한 지지체들 중 이온교환수지는 몇가지 장점이 있다. 즉, 상업적 이용용도가 넓기 때문에 공유 결합 지지체에 비해 가격이 저렴하고, 효소활성이 떨어졌을 시 반복사용이 용이하기 때문에 유지비용이 낮다.

이러한 이유 때문에 우리는 주로 경제성이 있는 이온교환수지 및 흡착제들에 fructosyltransferase을 고정화시킨 뒤 이들 중 상업적 응용 가능성이 있는 고정화 방법과 그 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

효소의 조제

Aspergillus ficuum ATCC 16882의 배양액을 농축시킨 뒤 CM-Sepharose 4B에서 fructosyltransferase를 Norman 및 Hojer-Pedersen방법(7)에 따라 정제하였다. 정제된 효소는 분자량 10,000의 한외 여과막을 통해 12mg/ml로 농축한 뒤 사용되었다. SDS-PAGE상에서 이 조제는 미량의 다른 불순물들을 포함하고 있었지만 fructosyltransferase의 활성에 영향을 미치지 않았다. *Aspergillus niger* fructosyltransferase(Meiji Seka. Japan)가 비교효소로서 사용되었는데 설탕분해에 대한 TLC 분석결과 정제된 *Aspergillus ficuum*효소와 동일한 패턴을 보였다.

효소의 고정화

2g의 4가 alkyl alkanolammonium기를 가지는 고다공성 음이온 교환수지(Diaion HPA 75, Mitsubishi Kasei)를 0.1M 염산용액에 1시간 정도 담근 뒤 염산을 제거하기 위하여 증류수로 충분히 세척하였다. 여기에 10ml의 50% 설탕용액과 적당히 희석된 효소용액을 첨가한 후 4°C에서 24시간 동안 천천히 교반하였다. 고정화된 효소는 교환수지내의 기공들로 공기가 들어가지 않게 끔 조심스럽게 충분히 증류수로 세척하고 탈수한 후 이것을 고정화 효소의 특성을 보는데 사용하였다. 고정화율은 첨가된 효소의 활성에 대한 고정화된 효소의 활성비로 나타내었다.

분석방법

고정화 효소에 의한 반응산물의 분석을 위해 Aminex HPX-42C 칼럼(300×7.8mm, Bio-Rad)에 의한 HPLC를 이용하였으며 정성분석은 박층 크로마토그라피(Kieselgel 60 F254, Merck)로 분석하였다. HPLC의 칼럼 온도는 80°C였고 유속은 1.0ml/min이었으며 반응산물은 굴절률 검출계(Model RID-6A, Shimadzu)를 이용 분석하였다. 박층크로마토그라피의 이동상 용매구성은 1-butanol : methanol : water(4 : 2 : 1, v/v/v)로 52°C의 온도에서 상향 전개하였고 전개 후 95% 메타놀에 5% 황산이 든 용액을 분무하고 105°C에서 발색하였다. 올리고당의 표준품은 삼양 제넥스 중앙 연구소로부터 기증받았다.

효소 활성

0.02M 인산완충액(pH 6.5)에 녹은 5% 설탕용액 0.1ml에 5μl 가용성 효소용액을 넣고 45°C에서 5분간 반응시켰다. 반응종료 후 100°C에서 3분간 가열하여 효소반응을 정지시킨 다음 반응에 의해 생성된 포도당의 농도를 peroxidase-glucose oxidase-dianisidine dihydrochloride kit(Sigma)를 사용하여 측정하였다. 고정화 효소의 활성은 pH 7.5에서 가용성 효소와 같은 반응조건하에서 교반한 뒤 측정하였다. 효소활성의 1unit는 상기 반응조건에서 1분간 1μmol의 포도당 생성을 촉매할 수 있는 효소의 양으로 정의하였다. 단백질의 양은 Bradford 시약에 의해 측정하였으며 표준단백질은 bovine serum albumin을 사용하였다.

결 과

Fructosyltransferase 고정화를 위한 지지체의 선별

효소의 고정화를 위한 지지체의 선별을 위하여 몇가지 종류의 이온교환수지와 흡착제를 이 실험에 사용하였다(Table 1). 여기서 첫번째 선별조건으로 고정화율을 고려하였으며 다음으로는, 고정화율이 높은 지지체 중 반응안정성을 조사하였다. 조사된 효소 지지체 중 반응기가 4가 alkyl akanolammonium인 고다공성

Table 1. The relative activity yields of fructosyltransferase immobilized on different support types

Support type	Property	Relative activity
DEAE-Sephacel[1)]	Weak basic anion exchanger	0.80
HP 20[2)]	Adsorbent	0.66
SP 207[2)]	High porous adsorbent	0.46
SP 850[2)]	High porous adsorbent	0.54
SA 20APL[2)]	Strong basic anion exchanger	0.52
SA 10A[2)]	Strong basic anion exchanger	0.64
Sk 1B[2)]	Strong basic cation exchanger	0.44
HPA 75[2)]	High porous anion exchanger	1.00

[1)]Pharmacia Biotech
[2)]Mitsubishi Kasei

강음이온 교환수지가 가장 높은 활성을 보였으며 6번의 반복된 사용 동안 효소활성의 감소는 보이지 않았다. 고정화를 위해 선정된 이 지지체(Diaion HPA-75)는 styrene과 divinylbenzene의 공중합체 수지이며 약 250μm 직경의 구슬 형태로 수많은 기공(0.625g/ml의 밀도)을 함유하고 있다. 이 실험에 사용된 SA 20APL과 SA 10A 역시 HPA-75와 같은 반응기를 가지는 음이온 교환수지이지만 그 고정화율은 더 낮았다. 한편 DEAE-Sephacel의 고정화율은 다른 지지체들에 비해 비교적 더 높았지만 반복되는 사용동안 그 효소활성은 급격히 감소하였다.

고정화 반응조건 및 fructosyltransferase 농도의 영향

고정화의 최적 조건을 찾기 위해 frutosyltransferase의 농도에 따라 고정화율의 변화를 조사하였다(Fig. 1). 고정화반응을 할 때 지지체와 효소 외에 설탕을 첨가하였는데 이러한 첨가는 고정화율을 증가시켰다. 즉, 설탕이 없는 상태에서 고정화율은 31%이었지만 설탕이 첨가되었을 때는 38%로 증가하였다. 이 조건하에서 지지체 g(젖은 무게로)당 효소가 9.2mg부터 45.8mg까지 첨가되었을 때 약 20mg의 효소 농도까지는 농도의 증가에 따라 고정화율도 증가하였다. 지지체 g당 효소 18.2mg이 첨가되었을 때 고정화 효소는 770U/g로 38%의 최대 고정화율을 보였다. 이 값은 건조된 지지체의 g당 2564U 값에 해당된다. 그러나, 지지체 g당 효소가 45.8mg이 첨가되었을 때 고정화 효소의 활성은 지지체 g당 621U로 오히려 감소하였다.

고정화 fructosyltransferase의 최적 pH 및 열 안정성

고정화 효소의 최적 활성 pH는 7.5로서 가용성 효소

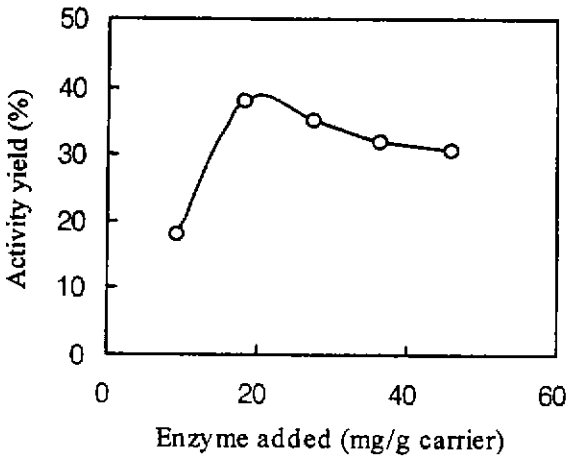

Fig. 1. Effect of enzyme concentration on immobilization of fructosyltransferase onto HPA-75.
Various amounts of fructosyltransferase were immobilized onto the support in the presence of sucrose.
The activity yields were calculated as described in the text.

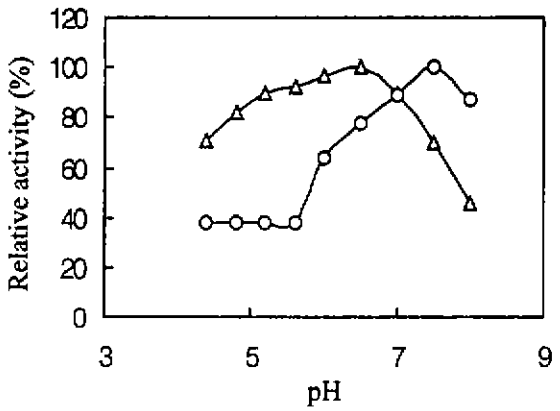

Fig. 2. Effect of pH on activity of free(△) and immobilized(○) fructosyltransferase.
Buffer solutions used were: 0.02M sodium acetate buffer(pH 4.0~5.6) and 0.02M sodium phosphate buffer(pH 6.0~8.0).

의 최적값인 6.5 보다 약 1만큼 알칼리쪽으로 이동하였다(Fig. 2). 한편 고정화 효소는 30°C, pH 6~8의 범위에서 24시간 동안 안정하였다. 효소를 각 온도에서 3시간 정치 후 고정화 효소와 가용성 효소의 활성을 비교하였는데 오히려 열 안정성은 고정화 후 감소됨을 보였다(Fig. 3). 가용성 효소는 55°C까지 그 원래 활성을 유지한 반면 고정화 효소는 약 42°C까지만 그 원래 활성을 유지했다. 그러나 불활성화되기 시작하는 온도 이상에서, 온도 증가당 활성 감소율은 고정화 효소가 가용성 효소 보다 약간 낮았다.

고정화 효소의 기질 친화도

고정화 효소의 설탕에 대한 Km(Michaelis constants)은 27.8mM로서 가용성 효소의 값과 같았다(Fig. 4).

고정화 효소의 반응 산물

기질로서 3% 설탕용액을 사용하면서 반응시간에 따른 반응 생성물이 박층크로마토그라피를 통하여 정성적으로 조사하였다(Fig. 5). 233U의 고정화 효소에 4.5ml의 기질을 넣었을 때 반응시작 첫 5분에는 설탕으로부터 1-kestose(F-F-G)와 미량의 포도당이, 그리고 10분 반응 경과시 nystose(F-F-F-G)가 나타났다. 반응 시작 5시간 후에는 F_2G, F_3G, F_4G, F_5G가 주된 산물이었으나 그중 가장 많은 생성물은 F_2G와 F_3G이었다.

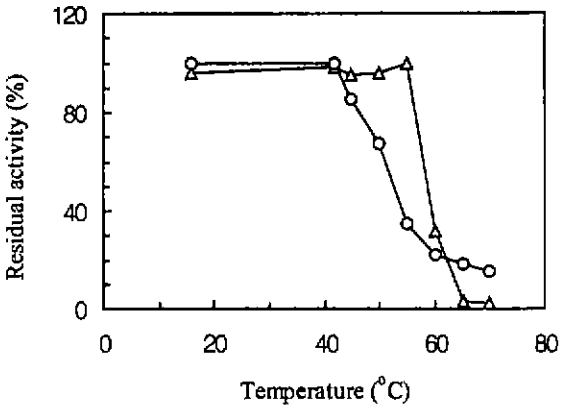

Fig. 3. Effect of thermal stability on immobilized fructosyltransferase activity(○).
Immobilized enzyme preparation in distilled water was pre-incubated for 3h at various temperatures and then remaining activity was measured under the standard assay condition.
Symbol(△) indicates the thermal stability of free enzyme under the same incubation condition

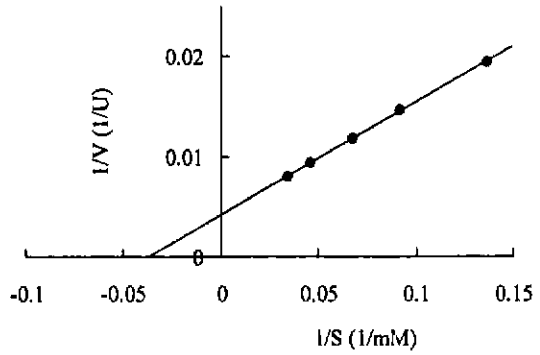

Fig. 4. Lineweaver-Burk plot of immobilized fructosyltransferase.
Sucrose(7.3 to 29.4mM) was used as substrate. All other conditions were described in the text.

반복된 반응 후 고정화 활성의 안정성

고정화 효소의 가장 중요한 요소인 반응 안정성을 회분식 반응기에서 조사하였다. 233U의 고정화 효소에 50% 설탕기질을 넣고 40°C에서 24시간씩을 한 주기로 하여 12일간 연속 반복 사용하였다. 12일 후 고정화 효소의 활성은 원래 활성의 82%인 192U로 반복 사용하는 동안 손실되는 고정화 효소의 양을 고려한다면 더 높은 활성을 유지하는 것으로 보인다(Fig. 6).

고 찰

효소의 고정화에 가장 중요한 요건은 경제적이면서 고정화율이 좋고, 고정화되었을 때 효소가 열 안정성이나 pH 안정성, 기질에 대한 친화도가 높으며 반복 사용시 반응 안정성이 좋은 지지체를 선정하는 일이다. 그러나 이러한 요건을 모두 충족시키는 지지체의 선별은 어렵기 때문에 실제 상업적 생산의 응용 예는 예상만큼 많지 않다. 올리고 과당의 생산에 가용성 fructosyltran-

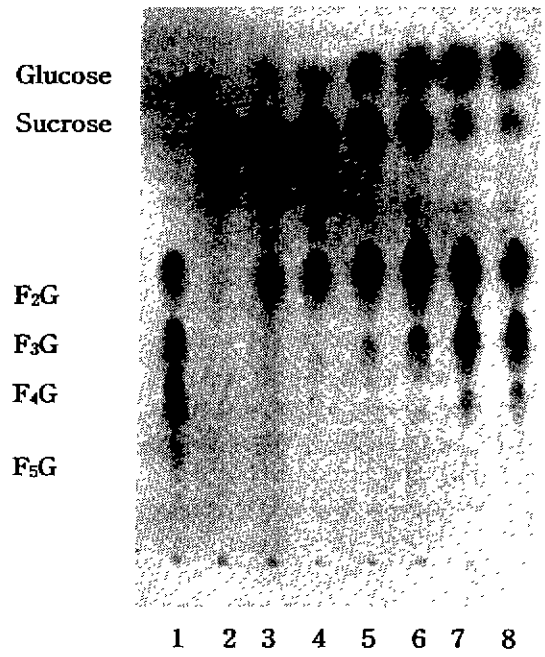

Fig. 5. Time course of fructooligosaccharides production by immobilized fructosyltransferase.
One g of immobilized enzyme was mixed with 10ml 5% sucrose solution with shaking at 42°C. At time intervals, 5μl aliquot was removed and then applied on a TLC plate.
Lane 2 to 8 represent the products at 0, 5, 10, 30, 60, 180, 300min.
Lane 1 represents a standard mixture of fructooligosaccharides ranging from F_2G to F_5G.

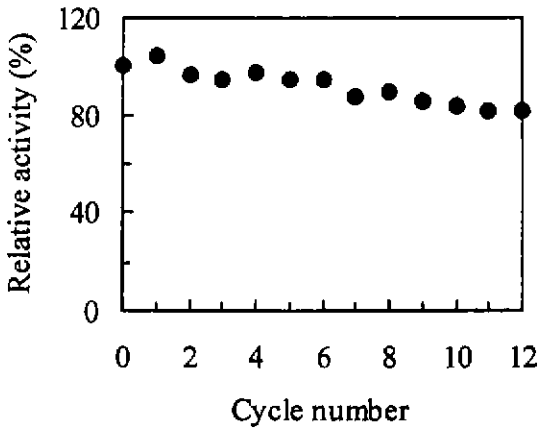

Fig. 6. Effect of repeated batchwise-reactions on the residual activity of immobilized fructosyltransferase.
Reaction time per cycle was 24h under the standard reaction conditions.

sferase를 대체하기 위해서는 우선 지지체의 가격이 저렴해야하기 때문에 지지체의 선별에 고가의 공유결합성 지지체를 사용하는 대신, 다양한 상업적 용도 때문에 가격이 저렴한 흡착제와 이온교환수지들을 사용하였다. 이들의 고정화율은 음이온 교환수지가 양이온 교환수지에 비해 높았고 흡착제들은 그 중간정도의 값이었다. 양이온 교환수지인 CM-Sepharose에서 fructosyltransferase를 pH 4.2의 완충액으로 흘렸을 때 아주 약한 염의 농도경사에서도 용출되는 것으로 보아 이 효소의 순전하는 pH 5 이상의 용액에서 음의 값을 나타내고 따라서 음이온 교환수지에 더 잘 결합하는 것으로 보인다. 동일한 활성기를 가지는 SA 20APL과 SA 10A에 비해 HPA-75는 더 높은 고정화율을 보였는데 이는 비다공성인 이들과 달리 HPA-75의 고다공성에 의한 표면적의 증가와 기공에 의한 효소의 보호효과 때문인 것 같다.

고정화 반응 동안 설탕의 존재는 흥미롭게도 고정화율을 높이는 효과가 있었다. 아마도 설탕분자는 효소의 결합 및 촉매부위(binding and catalytic sites)에 고농도로 분포되기 때문에 지지체와 이 부위 주변사이에 이온 결합은 억제되고 따라서 보호된 활성부위를 가지는 효소의 수는 증가될 수 있을 것이다. 이온교환수지에 고정화된 후 열 안정성 감소와, 음이온 교환수지에 효소를 고정화할 때 최적 pH가 산성 쪽으로 이동될 것(microenvironment effect)이라는 일반적인 예상과는 달리 알칼리 쪽으로 이동한 점, 고정화 효소와 가용성 효소의 Km이 같은 점들은 효소와 지지체사이의 결합이 상당히 복잡한 형태를 띄고 있음을 예상케 한다.

고정화 효소의 반응산물 실험과 회분식 반응기에서 반응 안정성 실험으로부터 이 고정화 방법에 의한 올리고 과당 생산은 상업적 가능성이 있음을 보여주었다. 앞으로 고정화율 증가를 위한 방법의 개발과 연속식 반응조에 의한 올리고 과당의 연속 생산방법, 생성되는 포도당의 효율적 제거를 통한 올리고당의 수율 증가들이 앞으로 해결해야 할 숙제일 것이다.

요 약

설탕으로부터 올리고 과당을 생산하기 위해 fructosyltransferase의 고정화 방법과 고정화된 효소의 특성이 조사하였다. 사용된 여러 이온교환수지들과 흡착제들 중 4가 alkyl alkanolammonium기를 가지는 한 고다공성의 강염기 음이온 교환수지가 선별되었는데 지지체 g당 770U의 활성 및 38%의 고정화율을 보였다. 이 고정화 효소를 3시간 각 온도에서 정치했을 때 42°C까지 그 활성을 유지해 가용성 효소의 55°C 보다 낮았다. 최적 pH는 7.5로서 가용성 효소의 6.5 보다 높았고 설탕에 대한 Km은 27.8mM로서 가용성 효소와 같았다. 설탕을 사용했을 때 고정화 효소의 주 반응산물은 1-kestose와 nystose였고 더 긴 올리고 과당인 F_4G와 F_5G들도 생성되었다. 24시간씩 12번 반복된 반응 후 고정화 효소의 활성은 82%로서 반응 동안 손실된 효소의 양을 고려한다면 반응조에서 설탕으로부터 올리고과당의 연속생산이 가능하다고 생각한다.

감사의 글

이 논문은 농림수산부에서 시행한 농림수산특정연구사업의 연구 결과입니다. 표준 올리고 과당 및 표준 효소 제재로서 *Aspergillus niger* fructosyltransferase를 공여해주신 삼양 제넥스에 감사드립니다.

문 헌

1. Hayashi, S., Itho, K., Nogoguchi, M., Takasaki, Y. and Imada, K. : Immobilization of a fructosyl-transferring enzyme from *Aureobasidium pullulans* sp. on *Shirasu* porous glass. *J. Ferment. Bioeng.*, **72**, 68(1991)
2. Hayashi, S., Kinoshita, J., Nonoguchi, M., Takasaki, Y. and Imada, K. : Continuous production of 1-kestose by β-fructofuranosidase immobilized on *Shirasu* porous glass. *Biotechnol. Lett.*, **13**, 395(1991)
3. Kida, M., Yoshikawa, T., Senda, T. and Yoshihiro, Y. : Formation of fructooligosaccharides from sucrose catalyzed by immobilized β-fructofuranosidase originated from *Aspergillus oryzae*. *Nippon Kagaku Kaishi*, **11**, 1830(1988)
4. Kim, M. H., Choi, S. S., In, M. J., Choi, I. S., Han, M.

S. and Lim, B. S. : Immobilization of fructosyltransferase on a basic, porous anion-exchange resin. US Patent 5,215.905(1993)
5. Yun, J. W., Kang, S. C. and Song, S. K. : Continuous production of fructooligosaccharides from sucrose by immobilized fructosyltransferase. *Biotechnol. Tech.*, **9**, 805(1995)
6. Yun, J. W., Jung, K. H., Oh, J. W. and Lee, J. H. : Semibatch production of fructo-oligosaccharides from sucrose by immobilized cells of *Aureobasidium pullulans*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **24**, 299(1990)
7. Norman, B. and Hojer-Pedersen, B. : The production of fructooligosaccharides from inulin or sucrose using inulinase or fructosyltransferase from *Aspergillus ficuum*. *Denpun Kagaku*, **36**, 103(1989)

(1997년 3월 14일 접수)