

Aspergillus niger 유래의 Soluble과 고정화 Transglucosidase의 속도상수, pH 및 열 특성 비교

안장우 · 박관화* · 서진호*

청강문화산업전문대학 식품공업과,
*서울대학교 식품공학과 및 농업생물신소재연구센터

Comparison of Kinetic Parameters, pH and Thermal Properties of Soluble and Immobilized Transglucosidase from *Aspergillus niger*

Jang-Woo Ahn, Kwan Hwa Park* and Jin-Ho Seo*

Department of Food Science and Technology, Chung Kang College of Cultural Industries

*Department of Food Science and Technology and Research Center
for New Bio-Materials in Agriculture, Seoul National University

Abstract

Enzymatic properties of immobilized transglucosidase (TG) from *Aspergillus niger* was characterized and compared with soluble TG. Michaelis-Menten constant (K_m) and maximum velocity (V_{max}) of immobilized TG were 122 mM, 3.9×10^2 mM/min and in case of soluble TG, 21 mM, 0.4 mM/min. The optimum pH of immobilized TG was pH 5.0 like soluble TG but immobilized TG showed 16% and 45% higher activity than soluble TG at pH 5.0 and pH 6.0. Both of immobilized TG and soluble TG were stable from pH 2.0 to pH 9.0, and therefore their activities in these pH ranges were remained more than 90%. The temperature was optimal at 60~70°C and 70~80°C for soluble TG and immobilized TG, respectively. The thermal stability of immobilized TG was significantly improved than that of soluble TG, and immobilized TG retained 32~40% higher activity than soluble TG. D-values from thermal inactivation of immobilized TG were 7690 sec at 65°C, 83 sec at 75°C, 7.2 sec at 80°C. Z-values of soluble and immobilized TG were 6.4°C and 5.3°C, respectively. The little difference of activation energies of soluble TG and immobilized TG supposed that there was little difference in mass transfer limitation during the reaction of soluble TG and immobilized TG.

key words: transglucosidase, isomaltoligosaccharides, immobilization

서 론

Transglucosidase (TG)는 maltose를 기질로 하여 당진이에 의해 이소말토올리고당을 생산하는 효소이다. 이소말토올리고당의 주성분은 α -(1 \rightarrow 6)-glucosidic linkage를 가지고 있는 isomaltose, panose, isomaltotriose 등으로 효모에 의해 발효되지 않는 비발효성 당으로서 여러 식품에 존재하며^(1,3), 인체에 유익한 생리적 특성을 보인다고 알려져 있다^(4,13). 또 식품 가공적성도 좋아 식품에 광범위한 응용이 가능하다고 알려지면서^(4,15) 식품신소재로서 소비도 계속 늘어나고 있는 추세이다⁽¹⁶⁾.

그러나, 현재 산업적으로 생산되는 이소말토올리고당의 생산공정에서 가장 문제가 되는 것은 고가의 효소를 한번만 사용하고 재사용하지 못하기 때문에 효소의 비용이 많이 든다는 점이다. 또 회분식 반응기 내에서 반응시키는 경우 soluble 효소의 대부분이 안정성이 높지 않기 때문에 반응이 진행될수록 활성의 저하와 함께 반응시간이 오래 걸린다는 단점과 함께 연속공정에 비해 생산성이 낮다는 점도 문제라고 할 수 있다. 이와 같은 관점에서 볼 때 현재의 이소말토올리고당의 생산공정은 효소비용 절감을 통한 원가절감 효과와 생산성이 향상될 수 있는 여지가 많다고 할 수 있다. 따라서 고정화 효소를 적용한다면 여러 번 반복해서 사용이 가능하므로 회분식 공정에 비해 효소비용이 크게 절감될 수 있고 외부 환경에 대해 안정성이

Corresponding author: Jin-Ho Seo, Department of Food Science and Technology, Seoul National University, Seodoo-dong, Kwunsun-gu, Suwon, Kyunggi-do 441-744, Korea

향상되는 것은 물론, 연속공정의 도입도 가능하게 되어 전체적으로 생산성의 향상효과를 기대할 수 있다.

올리고당 생산에 관여하는 효소의 고정화와 관련된 연구를 보면 Yoshida⁽¹⁷⁾가 *exo-maltotetrahydrolase*의 고정화에 대해, Mohamed⁽¹⁸⁾가 물리적 결합, 이온 결합, 공유결합을 이용한 효소고정화를 실시한 결과, 고정화 효소의 최적온도가 모두 10°C이상 상승하였음을 보고하였다. Kimura⁽¹⁹⁾는 *Pseudomonas stutzeri* 유래의 *amylase*를 고정화하여 *maltotetraose*를 생산했다고 보고하였다. Ravet⁽²⁰⁾ 등은 고정화 β -glucosidase를 이용한 gluco-oligosaccharide의 합성 반응에서 가용성 효소보다 5배 이상 더 효과적임을 보고하였다. Xylosylooligosaccharide도 *Aspergillus niger* 유래의 β -xylosidase를 이용한 transxylosylation 반응을 통해 합성이 가능하였다고 보고되었다⁽²¹⁾. 한편 이온결합에 의해 β -fructofuranosidase를 고정화시켜 fructooligosaccharides를 생산하였다는 보고도 있으며⁽²²⁾ calcium alginate를 이용한 entrapment 방법으로 β -fructofuranosidase를 고정화시킨 후 fructooligosaccharides를 장기간 연속공정으로 생산하였다고 보고하였다⁽²³⁾.

본 연구에서는 앞서 보고된 *Aspergillus niger* 유래의 TG의 이소말토올리고당의 생성반응 특성⁽²⁴⁾과 TG의 고정화 방법을 선정⁽²⁵⁾한데 이어 고정화 TG의 효소적 특성을 조사하여 soluble TG와 비교하였다.

재료 및 방법

Soluble TG과 고정화 TG

본 실험에서 사용한 TG는 *Aspergillus niger*에서 유래한 효소이다. 이소말토올리고당을 생산하기 위해 (주) 삼양제넥스에서 사용하고 있는 "Transglucosidase Amano L"을 액상으로 공급받아 사용하였다. 효소의 고정화를 위해 CNBr-activated sepharose 4B (Sigma사), 1 g을 1 mM HCl로 세척하고 효소용액 0.5 mL와 0.1 M sodium acetate buffer(pH 5.0)를 첨가하여 30°C에서 60 rpm으로 부드럽게 교반하면서 12시간동안 담체와 결합시켰다. 담체와 효소의 결합반응을 중지시키기 위해 동일한 buffer를 용매로 하여 제조한 blocking 용액인 0.2 M glycine 용액 내로 담체를 옮겼다. Buffer로 담체를 3~4회 세척하고 동일한 buffer에 현탁시켜 4°C에 보관하여 사용하였다.

TG의 활성 측정 방법

TG의 활성측정 방법은 전보⁽²⁴⁾와 같은 방법으로 측정하였다. 효소의 1 unit는 40°C, pH 5.0에서 1분에 1

mole의 panose를 생성시키는 효소의 양으로 결정하였다. 고정화 TG의 활성은 soluble TG의 그것과 동일하나 고정화 TG의 무게를 측정하여 첨가하여 반응시켰다. 효소반응에 의해 생성된 panose와 그 밖의 반응산물의 농도는 ion chromatography로부터 얻은 chromatogram을 이용하여 분석하였다. Ion chromatography의 분석조건과 정량은 참고문헌⁽²⁶⁾과 동일한 방법으로 하였다.

고정화 TG의 속도상수

TG의 속도상수인 K_m 과 V_{max} 를 알아보기 위해 반응속도(v)와 기질농도(S)에 대해 Lineweaver-Burk plot으로부터 구하였다. 기질용액은 0.1 M sodium acetate buffer (pH 5.0)에 7.7 mM로부터 250 mM까지의 농도를 가진 maltose 용액을 사용하였다.

TG 활성에 미치는 pH의 영향

pH가 효소의 활성에 미치는 영향을 살펴보기 위해 pH 2.0에서 pH 12.0에 이르는 buffer를 준비하였다. Buffer는 0.1 M D(+)-tartaric acid, NaOH buffer (pH 2.0, pH 3.0), 0.1 M sodium acetate, acetic acid buffer (pH 4.0, pH 5.0), 0.1 M maleate, tris, NaOH buffer (pH 6.0, pH 7.0, pH 8.0), 0.1 M boric acid, NaOH buffer (pH 9.0, pH 10.0), 0.1 M Na_2HPO_4 , NaOH buffer (pH 11.0, pH 12.0) 등을 사용하였다. 각각의 buffer 1.2 mL씩을 시험관에 넣고 1% (w/v) maltose 수용액 1.5 mL를 넣은 뒤에 0.3 mL의 효소를 첨가하여 40°C에서 2분간 반응시킨 후 끓는 물에서 5분간 가열하여 효소를 불활성화시켰다. 그 후 5분간 시수로 냉각시킨 뒤 ion chromatography로 분석하여 상대활성(%)을 계산하였다.

pH에 대한 TG의 안정성

pH 2.0에서 pH 12.0까지의 여러 종류의 buffer, 1.74 mL를 2 mL eppendorf tube에 넣어 온도를 4°C로 내린 후에 TG용액, 60 μ L를 넣은 직후 4°C에서 20시간 동안 보관하였다. 20시간 후에 이 용액 내에 남아 있는 효소의 잔존활성을 비교하여 상대활성(%)을 계산하였다.

TG 활성에 미치는 온도의 영향

1% (w/v) maltose 용액, 1.5 mL와 0.1 M sodium acetate buffer (pH 5.0), 1.2 mL를 cap tube에 넣고 미리 원하는 온도로 설정되어 있는 진탕항온수조에 넣고 예열시켰다. 온도범위는 30°C부터 80°C까지 10°C 간격으로 측정하였다. 내부의 온도가 원하는 온도만큼 상

승되었을 때, 0.3 mL의 효소용액을 투입하여 2분간 반응시킨 후, 효소활성 측정방법과 동일한 과정을 거쳐 분석한 다음 각 온도에 대해 상대적인 활성(%)을 조사하였다.

온도에 대한 TG의 안정성

2 mL eppendorf tube에 0.2M sodium acetate buffer (pH 5.0), 0.25 mL를 넣어 마개로 막은 후에 floating rack상에서 65°C, 70°C, 75°C, 80°C에서 각 1분간 예열시켰다. 여기에 0.25 mL의 효소용액을 투입하여 원하는 시간만큼 열불활성화를 시킨 후, 즉시 꺼내어 미리 준비된 ice bath에 담가 냉각시킨 다음 효소의 잔존 활성을 측정하였다. 반응액의 온도는 Brookfield 점도계용 temperature probe로 측정하였다.

Arrhenius Plot과 활성화에너지

효소반응의 활성화에너지는 soluble TG와 고정화 TG의 반응속도, v 를 30°C에서 80°C의 범위에서 측정하고 절대온도의 역수($1/T$)에 대해 $\log(v)$ 관계를 나타낸 Arrhenius plot으로부터 구하였다.

결과 및 고찰

Soluble과 고정화 TG의 속도상수

Soluble과 고정화 TG의 속도상수인 K_m 과 V_{max} 를 알아보기 위해 maltose 용액을 기질로 하여 반응속도(v)와 기질농도(S)에 대해 soluble TG를 Lineweaver-Burk plot으로, 고정화 TG를 Hanes-Woolf plot으로 나타낸 결과는 다음의 Fig. 1과 같다. Soluble TG의 Lineweaver-Burk plot은 넓은 기질농도 범위에서 직선관계를 보였고 r^2 은 0.9977이었다. Soluble TG의 K_m 은 21 mM, V_{max} 는 0.4 mM/min로 나타났다. 고정화 TG의 Hanes-Woolf plot에서 구한 직선의 r^2 은 0.9159이었고 고정화 TG의 K_m 은 122 mM, V_{max} 는 3.9×10^2 mM/min로 나타났다. 담체에 결합되어 있는 효소에 의한 기질의 전환 속도는 효소까지 도달되는 기질의 이동속도에 영향을 받기 때문에 일반 균질한 용액 내의 효소반응 속도와는 차이가 나는 것이 일반적이다. Xylanase와 β -xylosidase의 경우 고정화 방법에 관계없이 고정화 효소의 V_{max} 가 soluble 효소보다 10~30%로 감소되었다고 보고되었다⁽¹⁸⁾. 고정화 효소의 Michaelis constant ($K_{m,im}$)과 soluble 효소의 Michaelis constant ($K_{m,so}$)의 관계는 고정화 반응조건에 따라 다르게 나타난다^(18,27). 고정화 효소의 내부저항이 매우 큰 경우에는 $K_{m,im}$ 이 $K_{m,so}$ 보다 10배 이상 큰 값을 갖는다고 보고되었다^(27,28). 담체와 기

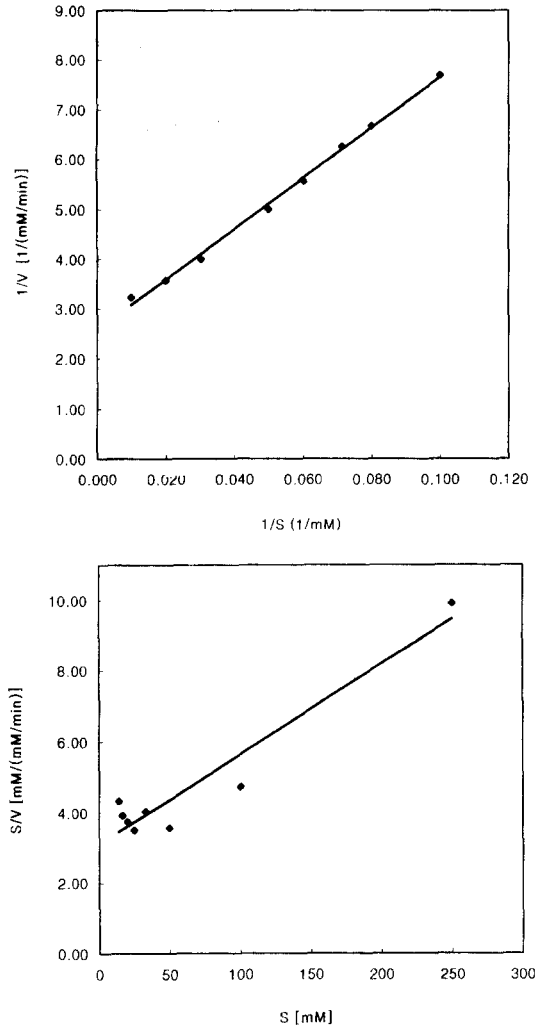


Fig. 1. (a) Lineweaver-Burk plots to determine the Michaelis-Menten constant (K_m) and maximum velocity (V_{max}) of soluble TG and (b) Hanes-Woolf plot of immobilized TG at pH 5.0 and 40°C.

질이 같은 극성을 띠고 있는 경우에는 $K_{m,im}$ 이 $K_{m,so}$ 보다 큰 반면, 다른 극성을 띠고 있으면 $K_{m,im}$ 이 $K_{m,so}$ 보다 작게 된다. 그러나 고정화 효소의 V_{max} 와 soluble 효소의 V_{max} 사이의 관계는 실험적으로 뚜렷이 밝혀진 바 없다⁽²⁹⁾. 효소가 담체의 표면이나 내부에 고정화되었을 때 기질은 효소가 존재하는 위치까지 확산되어야 하는데 대개 확산저항이 있는 경우에는 기질과 반응산물의 확산에 모두 영향을 준다. 따라서 기질의 확산 속도가 효소반응속도보다 느리면 겉보기 효소반응속도는 용액 내에 존재하는 효소 양에 비해 더 느린 것처럼 보이게 된다. 고정화 효소의 미세환경(microenvironment) 내

에서 생성된 반응산물의 축적도 같은 효과를 보인다.

pH가 soluble과 고정화 TG의 활성과 안정성에 미치는 영향

Asp. niger 유래의 TG를 공유결합법으로 고정화시키고 soluble과 고정화된 TG에 대한 여러 특성을 조사하였다. 본 실험에서 사용된 고정화 TG는 pH의 변화에 대해 Fig. 2에서 보는 바와 같이 soluble TG와 기본적인 패턴은 유사하고 최적 pH도 5.0으로 동일하게 나타났다. 그러나 pH 2.0, pH 3.0에서는 soluble TG에 비해 30~40% 더 낮은 활성을 보이는데 반해 pH 6.0에서는 45%, pH 7.0에서는 16% 더 높은 활성을 보였다. 고정화 효소의 활성은 pH에 따라 soluble 효소와 차이

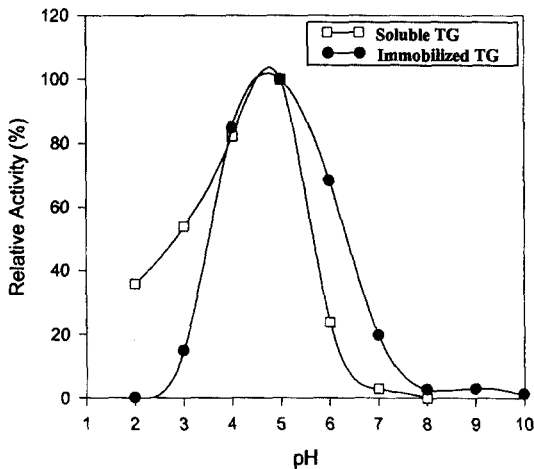


Fig. 2. pH-activity profiles of soluble TG and immobilized TG at pH 5.0 and 40°C.

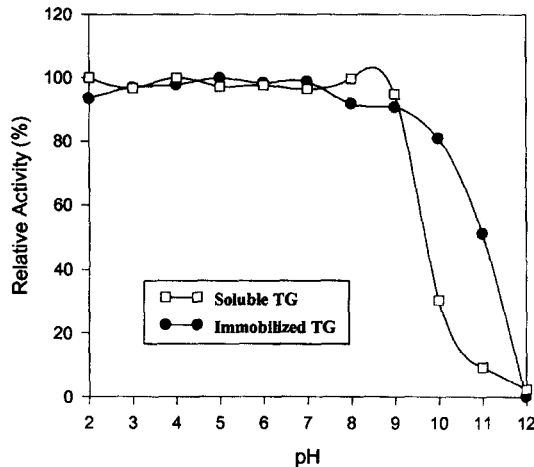


Fig. 3. Effect of pH on the stability of soluble TG and immobilized TG.

가 나는 경우가 많다고 알려져 있다⁽³⁰⁾. 이것은 대부분의 담체가 어느 정도 전하를 띠고 있으므로 해서 반응용액(macroenvironment)의 pH와 고정화 효소가 있는 미세환경의 pH가 서로 다르기 때문이다⁽³¹⁾. 그러나 본 실험에서는 반응용액과 미세환경의 pH가 크게 차이 나지 않는 것으로 판단되었다. pH가 미치는 안정성 결과에서 soluble과 고정화 TG 모두 pH 2.0에서 pH 9.0까지의 비교적 넓은 pH 범위에서 90%이상의 활성이 유지됨을 보였다(Fig. 3). pH 10.0과 pH 11.0에서는 고정화 TG가 soluble TG에 비해 안정성이 상대적으로 증가되는 것으로 나타났다. 그리고 pH 12.0에서는 두 형태의 효소 모두 활성을 보이지 않았다.

온도가 soluble과 고정화 TG의 활성과 안정성에 미치는 영향

다음의 Fig. 4에 온도에 따른 TG의 활성을 나타내었다. 두 형태의 효소 모두 전체적으로 동일한 양상을 보였다. Soluble TG의 최적온도는 60~70°C인 것으로 나타난 반면, 고정화 TG의 경우에는 80°C인 것으로 나타나 고정화를 통하여 최적온도가 약 10°C이상 상승한 것을 알 수 있었다. 고정화로 인해 최적온도가 향상된다는 보고는 여러 논문에서도 보고된 사실이다^(17,18,32).

고정화 TG의 온도에 대한 안정성을 다음의 Fig. 5에 나타내었는데 본 연구에서도 고정화 효소의 장점 중의 하나인 여러 특성중 특히 열에 대한 안정성이 높아졌음을 확인하였다. 65°C에서는 초기활성의 99%, 70°C에서는 약 82%, 75°C에서는 37%의 활성이 잔존

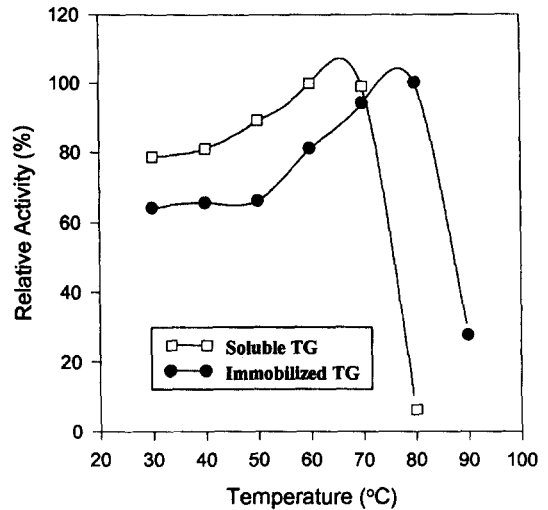


Fig. 4. Effect of temperature on the activity of soluble TG and immobilized TG at pH 5.0.

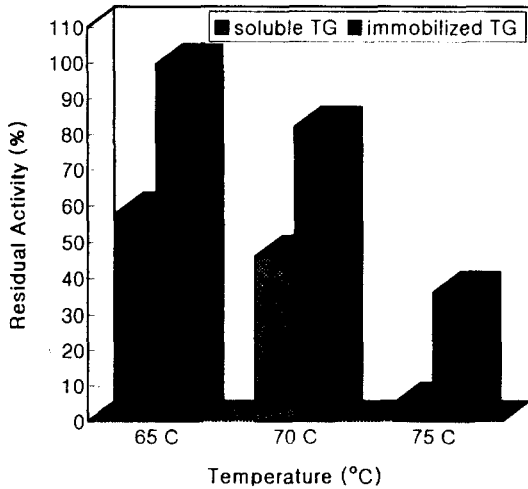


Fig. 5. Thermal stability of soluble TG and immobilized TG after 60 sec heating at each temperature.

하였다. 이것은 soluble TG에 비해 32~40% 정도의 활성이 더 유지된다는 것을 보여주는 결과였다. 효소 고정화는 효소의 안정성을 향상시키는 매우 효과적인 방법으로 알려져 있으며⁽³³⁾, 이것은 효소단백질이 담체에 결합되어 있는 상태에서는 변성 조건하에서도 unfolding이 쉽게 일어나지 않기 때문이다. 연속 공정에서 가장 중요한 요인 중의 하나인 고정화 효소의 안정성은 담체와 효소의 결합상태, 담체의 내부나 외부의 물리적, 물리화학적 특성의 변화, 기질에 의한 열불활성화 억제효과, 기질의 물질전달 저항 등에 영향을 받

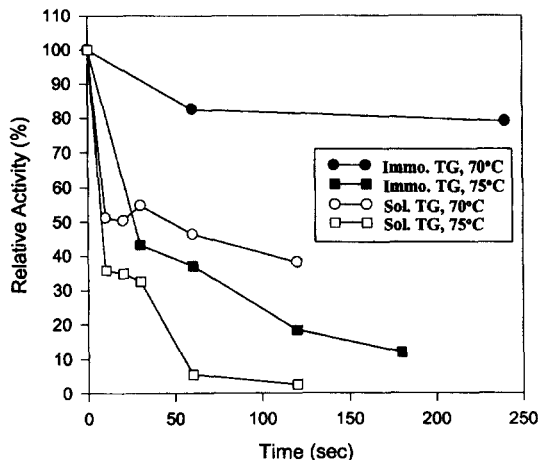


Fig. 6. Thermal inactivation of soluble TG and immobilized TG at 70°C and 75°C in 0.1 M sodium acetate buffer (pH 5.0).

는다고 알려져 있다⁽³⁴⁾. 고정화 TG와 soluble TG의 열불활성화 정도를 명확히 비교하기 위해 고정화 TG와 soluble TG의 열불활성화 곡선중 70°C, 75°C에서 실시한 2개의 곡선을 Fig. 6에 함께 나타내었다. 고정화 TG의 열안정성이 soluble TG보다 월등하게 향상되었음을 알 수 있었다.

Soluble과 고정화 TG의 열불활성화 속도상수

고정화 TG의 초기 열불활성화 곡선의 기울기로부터 초기 활성에서 1/10로 감소하는데 걸리는 시간인 D-value는 65°C에서 7690 초, 70°C에서 200 초, 75°C에서 83 초, 80°C에서 7.2 초로 나타났다. 이렇게 구한 D-value로부터 Log를 취하여 얻은 값을 soluble TG의 결과와 함께 각각의 온도에 대해 그래프로 나타내면 다음의 Fig. 7과 같다. 위의 두 직선으로부터 D-value를 1/10로 감소시키는데 필요한 온도의 상승치인 Z-value를 구하면 soluble TG가 6.4°C, 고정화 TG가 5.3°C로 나타났다. Soluble TG와 고정화 TG의 각 온도에서의 D-value와 Z-value를 다음의 Table 1에 나타내었다. 65°C에서 고정화 TG는 soluble TG에 비해 96배, 70°C에서 58배, 75°C에서 37배 정도 내열성이 향상되었다.

효소를 열불활성화가 일어나는 온도 이상에서 가열할 때 효소의 열불활성화 속도는 일차반응으로 초기 활성 A₀와 t시간 열처리후의 효소활성 A와의 관계는 다음과 같다.

$$\log \frac{A}{A_0} = \frac{k_d}{2.303} t = \frac{1}{D} t \tag{1}$$

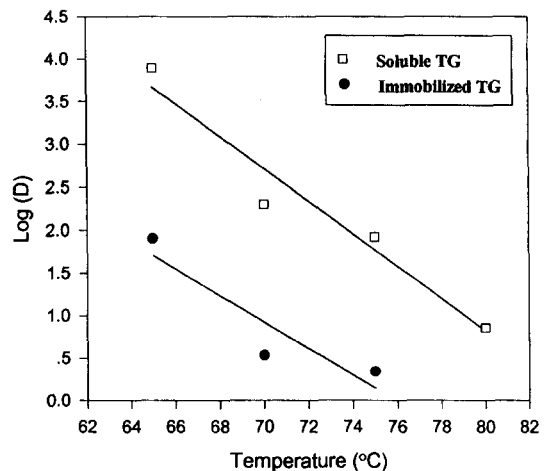


Fig. 7. Relation between temperature and log(D) of soluble TG and immobilized TG at various temperatures.

Table 1. D-values, thermal inactivation constants, Z-values and activation energy for thermal inactivation of soluble and immobilized TG

Parameters	Temperature	Soluble TG	Immobilized TG
D-value (sec)	65°C	80.0	7890
	70°C	3.4	200
	75°C	2.4	83
Thermal inactivation constant, kd (sec-1)	65°C	2.9×10^{-2}	2.9×10^{-4}
	70°C	6.8×10^{-1}	1.2×10^{-2}
	75°C	1.1	2.8×10^{-2}
Z-value (°C)		6.4	5.3
Activation energy (J/mol) for thermal inactivation		8.7×10^4	1.7×10^5

(k_d : 열불활성화 속도상수, sec⁻¹)

(1)식을 이용하여 각 온도에서의 D-value로부터 k_d 값을 구하였다. k_d 의 온도의존성은 Arrhenius 식으로 설명될 수 있다.

$$k_d = A \exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right) \quad (2)$$

A: Arrhenius factor or frequency factor (sec⁻¹)

E_a : 활성화에너지 (J/mol)

R: 기체상수 (8.314 J/mol·K)

열처리 온도 T_1 과 T_2 에서의 열불활성화 속도상수, $k_{d,T1}$ 과 $k_{d,T2}$ 를 식(2)와 같이 나타내어 정리하면 식(3)과 같다.

$$\frac{k_{d,T1}}{k_{d,T2}} = \exp\left(\frac{-E_a}{k} \cdot \frac{T_2 - T_1}{T_1 T_2}\right) \quad (3)$$

$$\log \frac{D_{T1}}{D_{T2}} = \frac{1}{2.303} \frac{E_a}{R} \frac{T_1 - T_2}{T_1 T_2} \quad (4)$$

식 (4)를 이용하여 70°C, 75°C의 D-value로부터 soluble TG와 고정화 TG의 열불활성화 반응의 활성화에너지를 구하여 다음의 Table 1에 나타내었다.

Arrhenius Plot과 효소반응 활성화에너지

Soluble TG와 고정화 TG의 여러 온도에 대한 반응 속도, v 를 측정하고 절대온도의 역수(1/T)에 대해 log(v)관계는 다음의 Fig. 8과 같다. 1/T에 따른 log(v)의 관계는 두 형태의 효소 모두 직선관계를 보였다. 효소 반응의 속도상수를 k 라 할 때 활성화에너지 E_a 는 (2)식과 같은 Arrhenius식으로 표현되고 이 식은 (8)식과 같다.

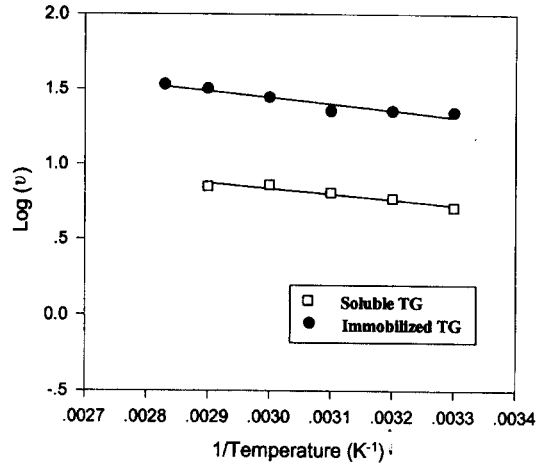


Fig. 8. Determination of activation energy for soluble TG and immobilized TG.

$$\log k = -\frac{E_a}{2.303R} \cdot \frac{1}{T} + \log A \quad (5)$$

(R은 기체상수: 8.314 J/mol·K)

위에서 얻은 직선으로부터 기울기를 구하면 soluble TG는 -404, 고정화 TG는 -461이었다. 위의 식 (5)에서 기울기는 $-\frac{E_a}{2.303R}$ 로 표현되고 soluble TG와 고정화

TG의 효소반응에 대한 활성화에너지는 각각 7.7×10^5 J/mol, 8.8×10^5 J/mol임을 알 수 있었다. 물질전달에 의해 효소반응이 제한을 받는 고정화 효소의 경우에는 효소반응의 활성화에너지가 감소하기 때문에⁽⁵⁾ 기울기가 커지게 된다(절대값으로는 감소). 그러나 고정화 TG 직선의 기울기가 soluble TG 직선의 기울기와 차이가 없는 것으로 보아 고정화 TG에 대한 물질전달의 저항은 거의 없는 것으로 판단된다.

요 약

Aspergillus niger 유래의 TG를 공유결합법으로 고정화시키고 고정화된 TG에 대한 효소적 특성을 soluble TG와 비교하였다. Soluble TG의 K_m 은 21 mM, V_{max} 는 0.4 mM/min인데 비해, 고정화 TG의 K_m 은 184 mM, V_{max} 는 7.4 mM/min로 나타났다. 고정화 TG는 soluble TG와 같이 최적 pH도 5.0으로 동일하였으나 고정화 TG가 soluble TG에 비해 pH 6.0에서는 45%, pH 7.0에서 16% 더 높은 활성을 보였다. pH에 대한 안정성은 두 형태의 효소 모두 pH 2.0에서 pH 9.0까지의 비교적 넓은 pH 범위에서 90%이상의 활성이 유지되었다. 고정화 TG의 반응최적 온도는 soluble TG가

60~70°C인데 반해 70~80°C로 향상되었다. 고정화 TG의 열안정성은 soluble TG보다 32~40% 이상 더 높은 활성이 유지되었다. 고정화 TG의 열불활성화 곡선으로부터 구한 D-value는 65°C에서 7690초, 70°C에서 200초, 75°C에서 83초, 80°C에서는 7.2초이고 Z-value는 soluble TG가 6.4°C, 고정화 TG가 5.3°C로 나타났다. Soluble TG와 고정화 TG의 효소반응 활성화에너지는 각각 7.7×10^3 J/mol, 8.8×10^3 J/mol이었다. 고정화 TG의 반응중 물질전달의 저항은 거의 없는 것으로 판단되었다.

문 헌

- Nunokawa, Y.: Oligosaccharides in sake. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, **28**, 109-117 (1981)
- White, J.W. and Hoban, N.: Composition of honey. IV. identification of the disaccharides. *Arch. Biochem. Biophys.*, **80**, 386-392 (1959)
- Nishino, R., Ozawa, Y., Yasuda, A. and Sakasai T.: Oligosaccharides in soy souce, *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, **28**, 125-131 (1981)
- Kanno, T.: Isomaltooligosaccharides (in Japanese). In *Functional Food and Its Prospect of Development*, CMC, Tokyo, p.89-106 (1988)
- Takanobu, K., Fukui, F., Takaku, H., Machida, Y., Arai, M. and Mitsuoka, T.: Effect of isomaltooligosaccharides on human fecal flora. *Bifidobacteria Microflora*, **7**, 61-69 (1988)
- Lee, H.W.: Functionality of isomaltooligoosaccharides and application in food (in Korean). *Bulletin of Food Technology*, **7**, 49-56 (1994)
- Hidaka, H., Eida, T., Takizawa, T., Tokunaga, T. and Tashiro Y.: Effects of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health. *Bifidobacteria Microflora*, **5**, 37-50 (1986)
- Delzenne, N.M. and Roberfroid, M.R.: Physiological effects of non-digestible oligosaccharides, *Leswnsm. -Wiss. Technol.*, **27**, 1-6 (1994)
- Hamada, S., Koga, T., Fujiwara, T. and Ooshima T.: Role of oligosaccharides in dental caries development. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, **31**, 83-91 (1984)
- Park, K.H.: Kinds and properties of funtional oligosaccharides (in Korean). In *Physiological functionality of oligosaccharides*, Symposium in Korean Society of Food Science and Technology, p.1-23 (1994)
- Hamada, S. and Ooshima, T.: Development of food for dental caries prevention (in Japanese). *Up-to-date Food Processing*, **29**, 4-7 (1994)
- Takaten, I. and Matsukyu, H.: Significance of sugar substitutes in oral health (in Japanese). *Up-to-date Food Processing*, **29**, 8-10 (1994)
- Kaneko, T., Kohmoto, T. and Kikuchi, H.: Digestibility of isomaltooligosaccharides by rats and effects on serum lipids. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **66**, 1211-1220 (1992)
- Kim, C.M.: Oligosaccharides (in Korean). In *Market initiation and recent development of physiologically functional foods*. KINITI, p.24-31 (1992)
- Kwun, H.K. and Yook, C.: Physiochemical properties and application of isomaltooligosaccharides in food (in Korean). *Bioindustry*, **7**, 26-30 (1994)
- Seo, J.H.: Recent research and development of oligosaccharides in Korea (in Korean). In *Physiological functionality of oligosaccharides*, Symposium in Korean Society of Food Science and Technology, 56-65 (1994)
- Yosida, M., Kimura, T., Ogata, M. and Nakakuki, T.: Immobilization of the the exo-maltotetraohydrolase and some properties of the enzyme. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, **35**, 245-252 (1988)
- Mohamed, A.A.: Immobilization of *Aspergillus niger* NRC 107 xylanase and β -xylosidase, and properties of the immobilized enzymes. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **38**, 69-81 (1993)
- Kimura, T., Ogata, M., Yosida, M. and Nakakuki, T.: Continuous production of maltotetraose using immobilized *Pseudomonas stutzeri* amylase. *Biotechnol. Bioeng.*, **32**, 669-676 (1988)
- Ravet, C., Thomas, D. and Legoy, M.D.: Gluco-oligosaccharide synthesis by free and immobilized β -glucosidase. *Biotechnol. Bioeng.*, **42**, 303-308 (1993)
- Kizawa, H., Shinoyama, H. and Yasui, T.: The Synthesis of new xylosyloligosaccharides by transxylosylation with *Aspergillus niger* β -xylosidase. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 671-678 (1991)
- Kim, M.H.: Production of fructooligosaccharides using immobilized β -fructofuranosidase. Seoul National University, *Ph.D Thesis*, Seoul, Korea (1994)
- Hayashi, S., Tubouchi, M., Takasaki, Y. and Imada, K.: Long-term continuous reacton of immobilized β -fructofuranosidase. *Biotechnol. Letters*, **16**, 227-228 (1994)
- Ahn, J.W., Hong, S.S., Park, K.H. and Seo, J.H.: Reaction mode of transglucosidase from *Aspergillus niger* for production of isomaltooligosaccharides (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.* **28**, 273-278 (1996)
- Ahn, J.W., Hong, S.S., Park, K.H. and Seo, J.H.: Immobilization of transglucosidase from *Aspergillus niger* (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **29**, 320-325 (1997)
- Ahn, J.W.: Production of isomaltooligosaccharides by transglucosidase from *Aspergillus niger*. Seoul National University, *Ph. D. Thesis*, Seoul, Korea (1995)
- Siso, M.I.G., Graber, M., Condoret, J., Combes, D.: Effect of diffusional resistance on the action pattern of immobilized alpha-amylase. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **48**, 185-200 (1990)
- Simos, G. and Georgatsos, J.G.: Immobilization of barley β -glucosidase on solid supports-yields and properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **33**, 51-53 (1990)
- Shiraishi F.: Experimental evaluation of the usefulness of equations describing the apparent maximum reaction rate and apparent Michaelis constant of an immobilized enzyme reaction. *Enzyme Microb. Technol.*, **15**, Feb., 150-154 (1993)
- Godfrey, T.: Immobilized enymes. In *Industrial Enzymology -The application of enzymes in industry-*, p.437-449

- (1983)
31. Goldstein, L.: Kinetic behavior of immobilized enzyme systems. In *Methods in Enzymology*, Mosbach, K.(ed.) Academic Press, New York, Vol. 44, p.397-443 (1976)
 32. Manolov, R.J., Kambourova, M.S. and Emanuilova, E.I.: Immobilization and properties of *Bacillus stearothermophilus* pullulanase. *Appl. Biochem.*, **18**, 409-415 (1993)
 33. Monsan, P. and Combes, D.: Enzyme stabilization by immobilization. In *Methods in Enzymology*, Colowick, S.P. & Kaplan, N.O.(ed.) Academic Press, New York, Vol. 137, p.584-598 (1988)
 34. Kimura, T., Ogata, M., Yoshida M., and Nakakuki, T.: Stability of immobilized maltotetraose-forming amylase from *Pseudomonas stutzeri*. *Biotechnol. Bioeng.*, **33**, 845-855 (1989)
 35. Kim, J.H.: Properties of immobilized enzymes and cells. In *Principles of Enzyme Technology and Their Application*. KAIST (1987)
-
- (1998년 5월 15일 접수)