

Aspergillus ficuum 기원의 정제 endoinulinase를 이용한 이눌린으로부터 이눌로올리고당의 생산

윤 호 범 · 김 동 현 · 윤 종 원 · 김 병 우 · 송 승 구
부산대학교 화학공학과, ¹대구대학교 생물공학과, ²동의대학교 미생물학과
(접수 : 1998. 2. 2., 게재승인 : 1998. 3. 19.)

Production of Inulo-oligosaccharides from Inulin by a Purified Endoinulinase from *Aspergillus ficuum*

Ho Bum Yoon, Dong Hyun Kim¹, Jong Won Yun¹, Byung Woo Kim², and Seung Koo Song[†]
Dept. of Chemical Engineering, Pusan National University, Pusan 609-735,
¹Dept. of Biotechnology, Taegu University, Kyungbuk 712-714,
²Dept. of Microbiology, Donggeui University, Pusan 614-714, Korea
(Received : 1998. 2. 2., Accepted : 1998. 3. 19.)

Production of inulo-oligosaccharides from inulin was carried out with the maximum yield of 94% using a purified endoinulinase from *Aspergillus ficuum*. The optimum reaction temperature and pH were 55-60°C and pH 5.5-6.0, respectively. The Michaelis constant and maximum reaction velocity of the endoinulinase for inulin were 13.27 g/L and 0.13 g/L · min at 55°C, pH 5.5, respectively. Inulin source had no significant effect on oligosaccharide yield and product composition, although initial production rate differed according to inulin origins. The reaction pH was a critical factor in inulo-oligosaccharide production because considerable free monosaccharides were released, decreasing oligosaccharide yield at low pH conditions. An empirical relationship describing the reaction performance was developed from kinetic data: the time to reach maximum oligosaccharide yield (t_m) as a function of initial concentration of inulin (I_0) and enzyme (E_0); i.e., $\log t_m = -1.025 \log E_0 - 0.011 I_0 + 2.655$.

Key Words : endoinulinase, inulin, inulo-oligosaccharides

서 론

올리고당은 우수한 기능성 때문에 건강식품소재로 광범위하게 이용되고 있으나, 대부분의 제품중의 올리고당의 함량은 50% 전후에 불과할 정도로 낮아서 기능성을 순수하게 이용하는데 제한을 받아왔다 (1-5). 본 연구실에서는 고부가 올리고당 제품을 개발하기 위한 노력의 일환으로 이눌린 (inulin) 으로부터 함량이 높은 새로운 형태의 올리고당을 생산하고자 하였다. 이눌린은 포도당 (G)에 과당 (F)이 β -2,1 결합을 통하여 30-35 분자가 결합된 천연다당류 (GF_n) 로서, 치커리 (chicory), 다알리아 (dahlia), 돼지감자 (Jerusalem artichoke) 등에 풍부하게 함유되어 있다 (6-8). 이들 농산재료 중에 함유되어 있는 이눌린을 산업적으로 이용하려는 노력은 이미 오래전부터 이루어져 왔는데, 주로 과당시럽의 생산원료 (9-10)와 에탄올 생산을 위한 발

효기질 (11-12)이 그 대표적인 사례이다.

최근 백기예의 Roberfroid 연구그룹을 포함한 일부 연구자들이 치커리 이눌린으로부터 이눌로올리고당을 생산하고 이들의 기능성을 규명한 결과, 설탕으로부터 생산되는 프락토올리고당 (fructo-oligosaccharides)과 거의 유사한 장점이 있다는 사실이 밝혀짐에 따라 상당히 큰 관심을 끌게 되었다 (13-17).

본 연구자들은 이눌린분자를 올리고머로 절단하는 효소인 endoinulinase (EC 3.2.1.7; 2,1- β -D-fructan fructanohydrolase)를 사용할 경우, 이눌린으로부터 고품량의 이눌로올리고당 (inulo-oligosaccharides)을 생산할 수 있을 것으로 판단하여, 이미 새로운 분리균주 *Pseudomonas* sp.가 분비하는 효소를 사용하여 이눌로올리고당의 생산에 대한 연구결과를 발표한 바 있다 (18-22).

본 연구에서는 이눌린으로부터 과당시럽을 생산하기 위한 용도로 상업적으로 시판되고 있는 이눌린 가수분해효소 (Novozyme 230, Novo A/S)로부터 endoinulinase를 정제한 후, 이를 이용하여 이눌로올리고당의 생산특성을 연구하고자 하였다. Novozyme 230은 이눌린으로부터 과당시럽을 생산하기 위한 용도로 개발된 효소로서 서로 다른 여러가지 형태의 exoinulinase와

[†] Corresponding author : Department of Chemical Engineering, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea.
Tel : 051-510-2398, Fax : 051-512-8563
e-mail : sksong@pusan.ac.kr

endoinulinase가 혼합된 복합효소이다 (23). 따라서 이 효소를 올리고당생산에 그대로 사용할 경우, exoinulinase의 높은 활성으로 인해 이눌로올리고당의 생산수율이 대단히 낮아짐으로써 (40% 미만) 본 연구에서는 endoinulinase 성분만을 정제하여 이눌로올리고당을 생산하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

특별한 설명이 없는한, 효소반응의 기질로 사용된 이눌린은 다알리아기원의 순품 (Sigma)을 사용하였고, 그 이외의 모든 시약들은 특급시약을 사용하였다.

정제효소

Novozyme 230은 서로다른 5종류의 exoinulinase, 3종류의 endoinulinase, 한종류의 invertase가 혼존되어 있는 복합효소에서 (23), 전보 (20)와 같은 방법에 의해 endoinulinase 만을 순수하게 정제한 후 0.01 M acetate buffer에 녹여 효소용액으로 사용하였다.

효소활성 측정

3.2% (w/v) 순수 이눌린 용액 7.5 ml와 0.01 M에 용해된 효소용액 2.5 mL를 55℃에서 60분간 반응시키고 끓는 물에서 15분간 가열하여 반응을 중지시킨 다음 반응액을 HPLC로 분석하였다. 효소 1 unit는 위의 조건에서 1분간 1μmole의 inulobiose를 생산하는데 필요한 효소량으로 정의하였다.

효소반응

특별한 조건명시가 없는한, 효소반응은 Eppendorf tube를 이용하여 기질 1그램당 효소농도 60 unit, 100 g/L 이눌린을 반응 기질로 사용하여 55℃에서 30시간 동안 효소반응을 수행하였다.

분석

모든 반응액중의 당류의 분석은 고속액체 크로마토그래피 (Shimadzu Co.)를 사용하였고, 사용된 검출기는 RI detector, 컬럼은 Biorad사의 Aminex HPX 42C, 이동상은 초순수 (0.6 mL/min)였으며, 컬럼온도는 85℃로 유지하였다. 반응물의 중합도 확인을 위해서 박층크로마토그래피 시스템을 사용하였는데, Silicagel 60 plates (Merck) 에 시료를 흡착시키고 isopropan-2-ol/ethyl acetate/water (부피비, 6/2/2) 혼합용액상에서 전개시킨 후, 황산/페놀 혼합용액을 발색제로 사용하였다.

결과 및 고찰

정제효소의 반응특성

정제효소의 기본적인 반응특성을 고찰하기 위하여, 최적반응 온도 및 pH, 기질특이성, K_m , V_{max} 등을 조사하였다. Figure 1은 최적반응 온도 및 pH인데, 이눌로올리고당 성분 중에서 생성속도가 가장 빠른 inulobiose의 생성속도를 상대속도로 나타내었다. 그 결과, 최적 반응온도는 55-60℃, 최적 반응 pH는 5.5-6.0 범위였다. 이 결과는 exoinulinase와 invertase가 혼존되어 있는 Novozyme 230 복합효소의 최적 반응온도 및 pH와

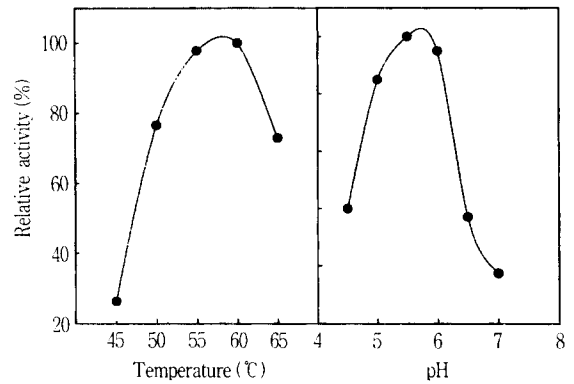


Figure 1. Effect of reaction temperature and pH on the activity of purified endoinulinase.

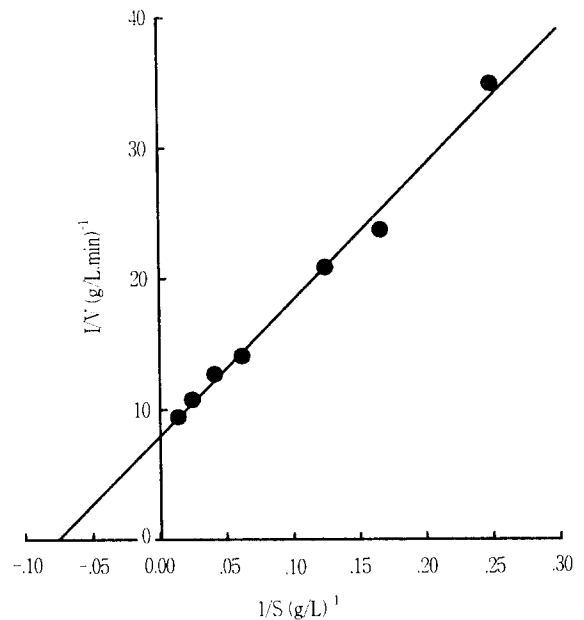


Figure 2. Lineweaver-Burk plot for estimation of Michaelis constant(K_m) and maximum reaction velocity (V_{max}) for the purified endoinulinase. Reactions were carried out at 55℃ and pH 5.5.

일치하는 결과이다 (17). 기질특이성을 조사하기 위하여 과당을 말단기로 갖는 몇가지 당류들 (levan, raffinose, stachyose, melezitose, sucrose, inulin)을 대상으로 반응성을 고찰한 결과, 이눌린 이외에는 기질특이성이 거의 없는 것으로 나타났다 (실험결과는 별도로 나타내지 않았슴). Figure 2는 정제효소의 5 5℃, pH 5.5에서 이눌린에 대한 K_m 및 V_{max} 을 결정하기 위한 Lineweaver-Burk plot이다. 그 결과 K_m 은 13.3 g/L, V_{max} 는 0.127 g/L · min이었다.

기질형태에 따른 이눌로올리고당의 생산특성

이로올리고당의 생산특성을 조사하였다. 초기 반응속도는 치커리 이눌린에 대한 돼지감자, 다알리아 이눌린의 상대속도

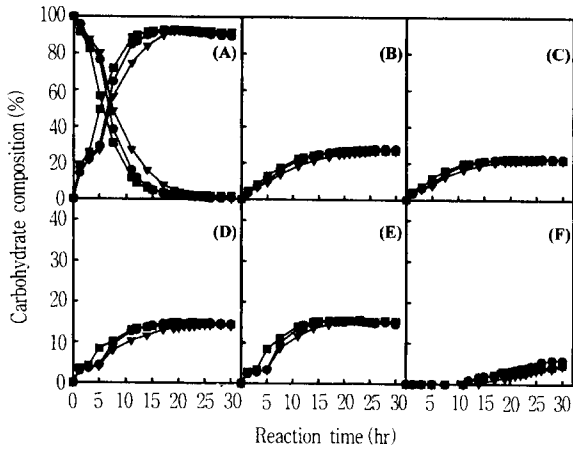


Figure 3. Effect of inulin source on the production of inulo-oligosaccharides: (A) inulin or total inulo-oligosaccharides, (B) DP2, (C) DP3, (D) DP4, (E) DP5, (F) fructose: (●) dahliia, (▼) Jerusalem artichoke, (■) chicory. Reactions were carried out at 55°C and pH 5.5.

는 각각 78, 92% 이었으나, Figure 3에서 처럼 최대 올리고당 수율 (Figure 3A)과 이눌로올리고당의 조성 (Figure 3B-F)은 거의 동일한 결과를 나타내었다. 초기 반응속도의 차이는 평균분자량이 2,800인 치커리 이눌린이 평균분자량 5,000-6,000인 돼지감자와 다알리아 이눌린 보다 작기 때문인 것으로 판단된다.

반응 pH의 영향

이눌로올리고당 생산을 위한 효소반응에서 반응 pH는 효소의 가수분해 활성 특성상 매우 중요할 것으로 판단되어 그 영향을 고찰하였다. 일반적으로 산성영역의 pH에서는 가수분해 활성이 촉진되지만, 본 연구에서와 같이 최종 생산물질이 단당류가 아닌 올리고당류일 경우 반응속도와 생산수율이 동시에 만족되는 최적 반응 pH를 결정하여야 할 것이다. pH 4, 5, 6에서 100 g/L 이눌린을 기질로 사용하여 각각 반응을 수행한 결과, 이눌린 감소속도는 pH 5에서 최대여서 반응 10시간 후 완전히 소모되었고, 이때 올리고당의 최대수율은 약 94% 이었다. pH 6에서는 이눌린이 반응 30시간 후 완전히 소모되었고 최대 올리고당 수율은 pH 5에서와 같이 94%를 나타내었다 (Figure 4A). 한편 pH 4에서는 과당, 포도당 등의 단당류가 많이 유리되어 (Figures 4B, 4C) 상대적으로 DP2-4의 올리고당 생성속도가 낮았으며 (Figures 4D-F), 그 결과 최대 올리고당의 수율이 크게 감소하여 반응10시간 후 약 83%의 수율을 나타내었다. 따라서 본 연구결과에서와 같이 올리고당 생산을 위해 가수분해 효소를 사용할 경우, 반응 pH는 단당류의 유리를 방지할 수 있는 중성영역의 pH 조건의 유지가 중요함을 알 수 있었다.

초기 이눌린농도 및 효소량의 영향

초기 이눌린의 농도와 사용 효소량과의 상관관계는 회분식 효소반응에서 반응수율을 결정하는 중요한 동력학적 인자가 된다. Figure 5는 초기 이눌린의 농도와 효소사용량을 변화시키면서 올리고당의 수율을 나타낸 것이고, Table 1은 올리고당 수율이

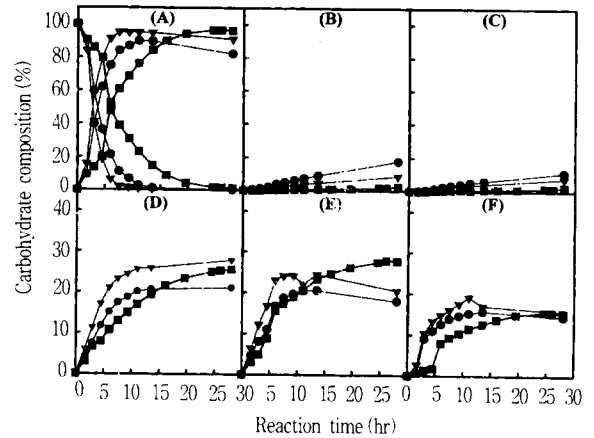


Figure 4. Effect of reaction pH on the production of inulo-oligosaccharides: (A) inulin or total inulo-oligosaccharides, (B) Fructose, (C) Glucose, (D) DP2, (E) DP3, (F) DP4; (●) pH 4, (▼) pH 5, (■) pH 6. Reactions were carried out at 55°C.

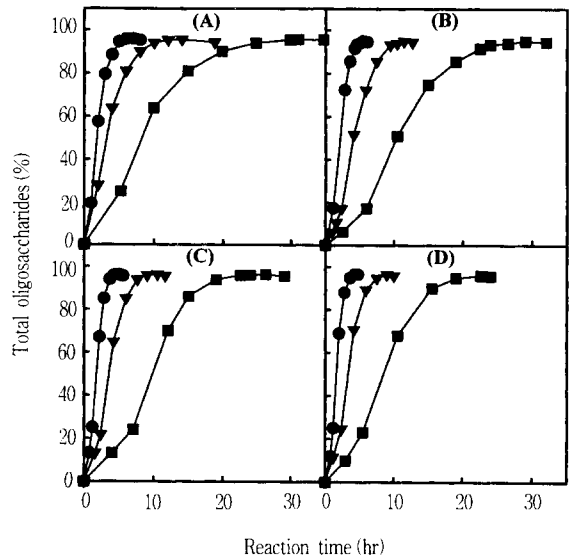


Figure 5. Effect of initial enzyme dosage and inulin concentration on the inulo-oligosaccharide production: (A) 30 g/l inulin, (B) 50 g/l inulin, (C) 100 g/l inulin, (D) 150 g/l inulin; (●) 60 units/g inulin, (▼) 30 units/g inulin, (■) 13 units/g inulin. Reactions were carried out at 55°C and pH 5.5.

최대에 도달하였을 때 각 이눌린 농도별로 반응물의 조성을 나타낸 것이다 (효소사용량, 60 units/g inulin). 일반적인 효소반응의 경우와 같이 효소농도가 증가할수록 반응시간이 크게 단축되었고, 초기 이눌린농도 150 g/L 까지 사용된 모든 효소농도 (13~60 units/g 기질)에서 20시간 전후에서 반응이 종료됨으로써 대체로 고농도 기질에서 올리고당의 생산이 가능하다는 결과를 얻었다. 이 결과는 치커리 또는 돼지감자 등의 이눌린을 함유한 천연자원으로부터 이눌로올리고당을 생산할 경우, 이들의 즙액 (juice)을 직접 기질로 이용할 수 있음을 시사해 준다. 치커리를 예로 들면, 치커리즙액 중 이눌린의 농도는 약 120 g/L

Table 1. Carbohydrate composition of inulo-oligosaccharides produced from different initial concentrations of inulin^a.

Carbohydrate	Product composition (% w/w)		
	50	100	150
Inulin	1.92	1.66	1.02
Glucose	2.48	2.24	2.29
Fructose	3.07	2.48	2.44
Oligosaccharides of			
DP2	26.13	26.50	26.81
DP3	24.67	25.12	26.39
DP4	13.04	13.49	13.86
DP5	15.01	15.30	15.03
>DP5	13.68	13.21	12.16
Total Oligosaccharides ($\sum DP_n$)	92.53	93.62	94.25

^aReactions were carried out at 55°C and pH 5.5.

전후이다 (자료는 보이지 않았음).

가수분해 특성을 지닌 endoinulinase를 이용하여 이눌린으로부터 이눌로올리고당을 생산하기 위한 회분식 효소반응에서 최대 올리고당 수율에 도달한 후 계속해서 반응이 진행될 경우, 생성된 올리고당 성분들이 다시 가수분해되어 과당, 포도당 등의 단당류로 유리되기 때문에 최적 반응시간을 결정하는 일은 대단히 중요하다. 따라서 특정 기질농도와 효소농도 조건에서

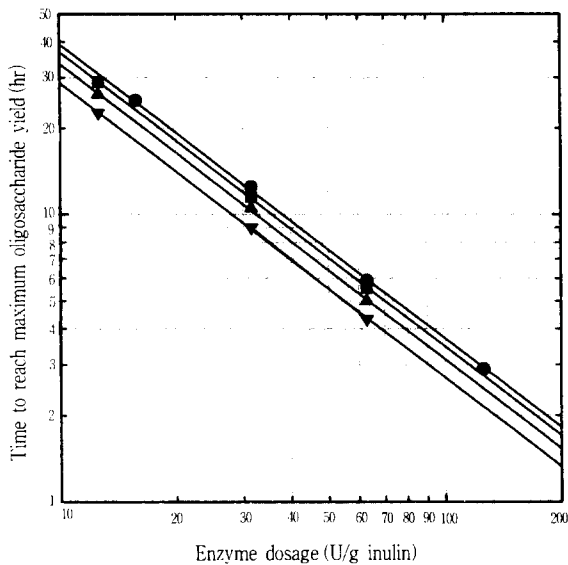


Figure 6. Empirical relationships between enzyme dosage and time to reach maximum inulo-oligosaccharide yield: (●) 30 g/l inulin, (■) 50 g/l inulin, (▲) 100 g/l inulin, (▼) 150 g/l inulin. Reactions were carried out at 55°C and pH 5.5.

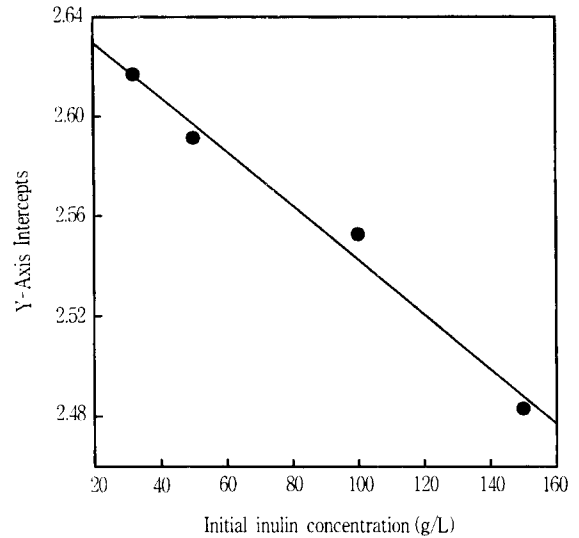


Figure 7. Construction of a linear equation for prediction of reaction performance in inulo-oligosaccharide production. Each Y-intercept means reaction time to reach maximum oligosaccharide yield obtained from Figure 6.

최대올리고당의 수율에 도달하는 시점에서 반응을 종료시켜야 하는데, 이러한 반응성질을 제어하기 위한 동력학적 자료가 필요하다. 앞의 Figure 5로부터 최대수율에 도달되는 시간 (t_M)과 효소농도 (E_0)를 로그-로그 좌표상에서 각각의 기질농도 (I_0)에 대해 도식한 결과, Figure 6에서 처럼 동일한 기울기 (-1.025)를 갖는 직선식들을 구할 수 있었다. Figure 6에서 Y축 절편 (최대수율에 도달할 때의 반응시간) 들을 다시 기질농도와 함께 도식하면 다음의 직선식을 얻을 수 있다 (Figure 7).

$$\log t_M = -1.025 \log E_0 - 0.011 I_0 + 2.655$$

이 상관관계식으로부터 효소반응초기에 결정된 기질농도와 효소농도 조건에서 최대 올리고당 수율에 도달되는 반응시간을 결정할 수 있다. 이러한 상관관계식은 전분으로부터 말토 (malto-) 또는 이소말토올리고당 (isomalto-oligosaccharides)의 생산공정에서와 같이 가수분해 목적산물이 올리고머인 다른 유사한 효소반응 공정에서도 효소반응제어를 위한 기초자료를 제공해 줄 수 있을 것이다.

요 약

Aspergillus ficuum 기원의 정제 endoinulinase를 이용하여 이눌린으로부터 이눌로올리고당을 94% 수율로 생산하였다. 효소반응의 최적 pH 및 온도는 각각 5.5-6.0, 55-60°C 이었으며 이눌린에 대한 K_m , V_{max} 는 각각 13.27 g/L, 0.13 g/L · min이었다. 치커리, 돼지감자, 다알리아 등의 여러 가지 기원의 이눌린은 초기 반응속도에서만 다소의 차이가 관찰되었으나, 올리고당의 수율 및 반응물의 조성차이는 나타나지 않았다. 효소반응시 반응 pH는 올리고당의 최대수율과 생산된 당류들의 조성에 대단히 큰 영향을 나타내었는데, 특히 반응 pH 4이하의 낮은 pH

영역에서는 단당류가 많이 유리되어 올리고당 수율이 낮았다. 효소반응 초기에 결정된 기질농도 (I_0)와 효소농도 (E_0) 조건에서 최대 올리고당 수율에 도달되는 반응시간 (t_M)을 결정할 수 있는 상관관계식을 도출하였다.

$$\log t_M = -1.025 \log E_0 - 0.011I_0 + 2.655$$

감 사

본 연구는 한국과학재단 특정기초연구 (과제번호 96-0502-02-01-3)의 연구비 지원에 의해 수행되었기에 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Yun, J. W., K. H. Jung, Y. J. Jeon, and J. H. Lee (1992), Continuous production of fructo-oligosaccharides from sucrose by immobilized cells of *Aureobasidium pullulans*, *J. Microbiol. Biotechnol.* **2**, 98-101.
2. Yun, J. W. (1996), Fructooligosaccharides-occurrence, preparation, and application, *Enzyme Microb. Technol.* **19**, 107-117.
3. Hidaka, H., T. Eida, and Y. Saitoh (1987), Industrial production of fructo-oligosaccharides and its application for human and animals, *Nippon Nogeikagaku Kaishi* **61**, 915-923.
4. Kuriki, T., M. Tsuda, and T. Imanaka (1992), Highly branched oligosaccharides production by the transglucosylation reaction of neopullulanase, *J. Ferment. Bioeng.* **73**, 198-202.
5. Yun, J. W., M. G. Lee, and S. K. Song (1994), Batch production of high-content fructo-oligosaccharides by the mixed-enzyme system of β -fructofuranosidase and glucose oxidase, *J. Ferment. Bioeng.* **77**, 159-163.
6. Bacon, J. S. D. and J. Edelman (1951), The carbohydrates of the Jerusalem artichoke and other Compositae, *Biochem. J.* **48**, 114-126.
7. Guiraud, J. P. and P. Galzy (1981), Enzymatic hydrolysis of plant extracts containing inulin, *Enzyme Microb. Technol.* **3**, 305-308.
8. Bacon, J. S. D. and R. Loxley (1952), Seasonal changes in the carbohydrates of the Jerusalem artichoke tuber, *Biochem. J.* **51**, 208-213.
9. Zittan, L. (1981), Enzymatic hydrolysis of inulin-an alternative way to fructose production, *Starch*, **33**, 373-377.
10. Vandamme, E. J. and D. G. Derycke (1983), Microbial inulinases: fermentation process, properties, and application, *Adv. Appl. Microbiol.* **29**, 139-176.
11. Kim, J. H., B. K. Hur, C. S. Bae, and H. S. Kim (1990), Ethanol fermentation characteristics of *K. marxianus* on Jerusalem artichoke tuber extract, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **5**, 75-80.
12. Kim, K. and M. K. Hamdy (1986), Acid hydrolyses of Jerusalem artichoke for ethanol fermentation, *Biotechnol. Bioeng.* **28**, 138-141.
13. Roberfroid, M. B., N. Kok, and N. Delzenne (1997), Chicory fructooligosaccharides: Are they effective in modulating lipid metabolism?, Proc. of the international Symposium 'Nondigestible oligosaccharides: healthy food for the colon?' (R. Hartemink ed.), p. 162, Wageningen, the Netherlands.
14. Menne, E., N. Guggenbuhl, J. Absolonne, and A. Dupont (1997), Prebiotic effect of the (fructosyl)_M-1-fructose)_{FM}-type inulin hydrolysate in human, Proc. of the international Symposium 'Nondigestible oligosaccharides: healthy food for the colon?' (R. Hartemink ed.), p. 164, Wageningen, the Netherlands.
15. Lemort, C. and M. B. Roberfroid (1997) Effect of chicory fructooligosaccharides on Ca balance, Proc. of the international Symposium 'Nondigestible oligosaccharides: healthy food for the colon?' (R. Hartemink ed.), p. 163, Wageningen, the Netherlands.
16. Farnworth, E. R. (1993), Fructans in human and animal diets, Science and technology of fructans (M. Suzuki, and N. J. Chatterton, eds.) pp. 257-272, CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
17. Norman, B. E. and B. Hojer-Perderson (1989), The production of fructooligosaccharides from inulin or sucrose using inulinase or fructosyltransferase from *Aspergillus ficuum*, *Denpun Kagaku* **36**, 103-111.
18. Kim, D. H., Y. J. Choi, S. K. Song, and J. W. Yun (1997), Production of inulo-oligosaccharides using endoinulinase by a *Pseudomonas* sp., *Biotechnol. Lett.* **19**, 369-371.
19. Yun, J. W., D. H. Kim, B. W. Kim, and S. K. Song (1997), A comparison of sugar composition between inulo- and fructo-oligosaccharides produced from different enzyme forms, *Biotechnol. Lett.* **19**, 553-556.
20. Yun, J. W., D. H. Kim, T. B. Uhm, and S. K. Song (1997), Production of high-content inulo-oligosaccharides from inulin by a purified endoinulinase, *Biotechnol. Lett.* **19**, 935-938.
21. Yun, J. W., D. H. Kim, B. W. Kim, and S. K. Song (1997), Effect of inulin concentration on the production of inulo-oligosaccharides by soluble and immobilized endoinulinase, *J. Ferment. Bioeng.* **84**, 365-368.
22. Yun, J. W., D. H. Kim, H. B. Yoon, and S. K. Song (1997), Production of inulo-oligosaccharides by immobilized endoinulinase from *Pseudomonas* sp., *J. Ferment. Bioeng.* **84**, 369-371.
23. Ettalibi, M. and J. C. Baratti (1987), Purification, properties and comparison of invertase, exoinulinases and endoinulinases of *Aspergillus ficuum*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 13-20.