

과당 탄수화물의 산가수 및 효소적 분해 특성연구

강순아 · ¹이은영 · ²정성제 · ³김상무 · ⁴이재철 · †⁴장기효
서울벤처정보대학원대학교 발효식품과학과, ¹경희대학교 동서의학대학원, ²경희대학교 생명공학원,
³강릉대학교 해양생명공학부, ⁴강원대학교 식품영양학과
(접수 : 2006. 1. 4., 게재승인 : 2006. 4. 6.)

Characterization of Formation of Fructose during Acid Hydrolysis and Enzyme Treatment of Fructose Saccharides

Soon Ah Kang, Eun Young Lee¹, Sung Je Jung², Sang-Moo Kim³, Jae-Cheol Lee⁴, and Ki-Hyo Jang^{4†}
Department of Fermented Food Science, Seoul University of Venture & Information, Seoul 137-070, Korea
¹Department of Medical Nutrition, Graduate School of East-West Medical Science,
Kyung Hee University, Seoul 139-701, Korea
²Department of Food Science and Technology, Kyung Hee University, Yongin 449-701, Korea
³Faculty of Marine Bioscience and Technology, Kangnung National University, Gangwon 210-702, Korea
⁴Department of Food and Nutrition, Kangwon National University, Gangwon 245-711, Korea
(Received : 2006. 1. 4., Accepted : 2006. 4. 6.)

Acid- and enzymatic hydrolysis properties of two fructans (inulin and levan) and their oligofructoses has been investigated. At pH 1, the initial fructose release rate differs and is rapidly hydrolyzed in the order of levan oligosaccharide and inulin oligosaccharide, levan, inulin. At pH 4.5, 7 and 14, no or little amount of fructose are found from four samples. At the presence of inulinase in the reaction mixture, the fructose is rapidly produced from all samples, whilst invertase treatments show low activities. The results allow the estimation of the fructose release rate in many foodstuff processing conditions.

Key Words : Inulin, levan, oligofructose, acid hydrolysis

서론

플라кт란은 과당이 β -2,1 또는 β -2,6으로 연결된 중합체로써, 이눌린 (inulin), 레반 (levan), 그리고 일부 식물체에서 발견되는 phlein이 있다(1, 2). 이눌린은 과당의 결합이 주로 β -2,1로 연결된 구조를, phlein은 주로 β -2,6로, 그리고 레반은 β -2,1와 β -2,6의 연결 구조가 함께 나타난다. 현재 대량생산되는 플라кт란은 이눌린과 레반으로, 이눌린은 상온에서는 물과 무수 알코올에서 거의 녹지 않는 반면 레반은 물에서 잘 녹고 무수 알코올에서 녹지않는 특성을 보인다(3). 레반은 분자량이 수백만 ~ 수천만에 이르는 거대 다당류인데 반하여, 이눌린은 과당이 20-60개 연결된 분자량 4,000~12,000 정도로 양파, 마늘, 바나나, 돼지감자, 치커리, 다일리아 등에 함유되어 있다(3-5). 이눌린 올리고당

과 레반 올리고당은 플라кт란을 산가수 분해법에 의하여 생산하거나, 설탕을 원료로 하여 효소적 합성법으로 생산된다

이눌린과 레반은 인체에서 장내세균총에 의해 발효되어 이때 생산된 단쇄지방산은 체내로 흡수되거나 배설된다(6). 플라кт란은 혈중 중성지방을 감소시키고, 대장에서는 유산균 등의 미생물에서 발효되어, 유해한 미생물이 생존하기 어려운 환경을 제공하여 장내환경을 개선하는 효능이 있다(7-11). 이외에도, 이눌린 올리고당은 어는점을 낮추는 효과가 있으므로, 일본에서는 이를 이용한 수산물 유통에 응용된다(12). 플라кт란의 생리적 효능은 플라кт란의 분자량과 밀접한 관계가 있다(13). 플라кт란은 용도와 효능이 매우 다양하여 이를 이용하여 제과, 식품, 수산물, 화장품 공업에서 광범위하게 사용되고 있으나, 완제품으로 가공되는 공정중에 적용되는 고온, 고압, 산 또는 알카리 처리 공정 등에 따른 분자량 변화에 대한 연구는 미비한 실정이다. 본 연구에서는 레반과 이눌린 그리고 이들의 올리고당의 pH 안정성과 효소적 분해 특성을 분석하였다.

† Corresponding Author : Department of Food and Nutrition,
Kangwon National University, Gangwon 245-711, Korea
Tel : +82-33-570-6882, Fax : +82-33-570-6882
E-mail : kihyojang@mail.kangwon.ac.kr

재료 및 방법

재료 및 시약

이눌린은 치커리에서 추출된 성분으로 Sigma사 (St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다. 이눌린 올리고당은 제일제당 제품을 사용하였고, 레반과 레반 올리고당은 (주)리얼바이오텍 (충남 연기군) 제품을 사용하였다. 레반은 *Z. mobilis* 유래의 levansucrase를 이용하여 생합성되었으며, 레반의 평균 중합도는 6×10^6 이상으로, 완전히 분해시에는 과당과 극소량의 포도당으로만 이루어져 있었다(Table 1). Inulinase와 invertase는 Fluka사 (Japan) 제품을 사용하였고 그 외의 시약은 특급 시약을 사용하였다.

Table 1. Main characteristics of two fructans and their oligosaccharide samples

	Percentage (%)			Degree of polymerization
	Glucose	Fructose	Glucose-(Fructose) _n	
Levan	0.4	1.5	>98	n=104-105
Levan oligosaccharide	11.1	17.9	71.0	n=1-4
Inulin	<0.1	<0.1	>99	n=20-60
Inulin oligosaccharide	5.6	2.0	92.4	n=1-4

산 가수분해

pH에 따른 산 가수분해 효과를 비교하기 위하여, 반응 용액의 pH를 1, 4.5, 7, 14로 조정하였다. 구체적으로, 1.25%의 당 수용액을, 37°C에서 16시간 동안 저어준 다음, 반응을 중지시키기 위하여 50 mM NaOH나 산을 첨가하여 pH를 중성화 시킨 후에 고속액체크로마토그래피 (HPLC)법으로 분석하였다.

효소활성분석

Inulinase와 invertase 활성은 기질인 당류의 가수분해로 생성되는 과당 생성으로 나타내었다. 효소활성 측정을 위하여, 50 mM sodium acetate buffer (pH 4.5), 1.7% 기질용액, 효소액 1 unit 등의 혼합액을 37°C에서 16시간 동안 반응시켰다. 효소반응의 종결은 NaOH를 첨가하여 효소활성을 불활성화 하였다. 효소활성 1 unit은 1분동안 1 μmol의 서당을 분해하는 효소의 양으로 정의하였다. 단백질의 정량은 ovalbumin을 표준시료로 하여 시판중인 Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad, USA)로 정량하였다.

탄수화물의 분석

과당, 포도당, 서당, 이눌린과 이눌린 올리고당, 레반과 레반올리고당의 조성 분석은 반응액을 0.45 μm 여과막으로 여과한 다음, 여액 20 μL을 HPLC (Backman, USA)에 주입하여 정량하였다. HPLC 분석조건은 50°C로 유지시킨 칼럼(Ionpak KS-802, Shodex사 제품)을 이용하여 증류수를 0.4 mL/min의 속도로 흘려주었고, 굴절율 (refractive index)에 의해 검출하였다. 각 표준당을 각 농도별로 20 μL loop에 주입하여 검출하였으며, 각 농도별에 따른 peak 면적을 이용하여 표준곡선을 작성하였다. 반응시간, 반응 pH에 따른 플라탄의 분해율은 반응액의 전체당에 대해 분해되어

생성된 과당의 비로써 나타내었다. 초기 과당생성률은 반응시간에 따른 과당생성량을 나타낸 그래프에서 기울기를 구하여 측정하였다.

결과 및 고찰

플라탄의 특성

본 실험에 사용한 수용액 상태의 레반은 50°C에서는 점차 가수분해가 일어나 단당류로 분해 되었으나, 0-37°C에서는 중성인 pH 조건에서는 30일 이상 안정성을 보였다. 공급업체에 따르면, 이눌린의 평균중합도는 20-60였다. 레반 올리고당과 이눌린 올리고당은 효소적 방법에 의하여 기질인 서당을 이용하여 생합성 되었다. 레반 올리고당은 levansucrase를 서당에 반응시켜 생성되었으며(14), 약 11% 포도당, 18% 과당을 포함한 중합도 1-4의 당으로 구성되었다. 이눌린 올리고당은 공급처에 따르면, 24% 포도당, 2% 과당, 15% 서당을 포함한 중합도 1-4의 당으로 구성되었다 (Table 1).

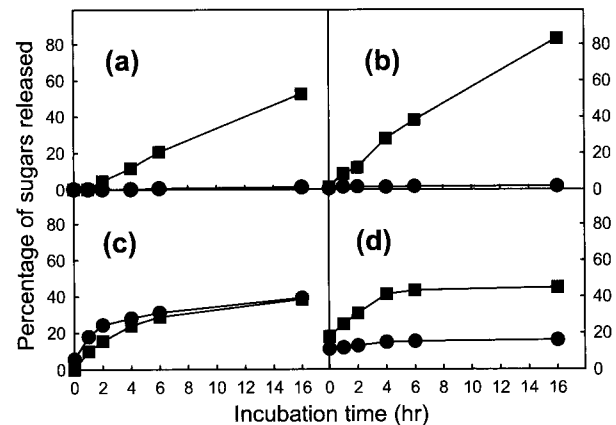


Figure 1. Hydrolysis of four sugars by acid treatment (pH 1) ((a) inulin, (b) levan, (c) inulin oligosaccharide and (d) levan oligosaccharide. 1.25% solutions were incubated with acid at 37°C for up to 16 hr, then the proportions of fructose were determined using HPLC. Symbols: ■, fructose; ●, Glucose).

플라탄의 pH 안정성

네가지 시료의 pH와 반응시간에 대한 효과를 비교한 결과를 Fig. 1와 Table 2에 나타내었다. 모든 시료에서 강한 산성인 조건에서는, 산 가수분해 시간에 비례하여 시료의 가수분해가 진행되었으나, 가수분해의 속도는 레반 올리고당과 이눌린 올리고당이 0.73 mg의 fructose/mL.hr으로 가장 빠르게 분해되었고 레반은 0.64 그리고 이눌린은 0.43의 속도로 분해되었다(Fig. 1). 레반과 이눌린은 pH 4.5, 7, 14의 조건에서는 매우 안정된 결과를 보였으며, 이들의 올리고당은 pH 4.5, 7에서는 분해가 미비하였으며, pH 14에서 레반 올리고당과 이눌린 올리고당은 각각 0.12와 0.08 mg of fructose/mL.hr으로 약간 분해되었다. 이러한 결과는 플라탄은 강한 산성인 조건에서 가공하거나 저장하는 것은

좋지 않으며, 약한 산성조건이나, 알칼리 조건에서는 상대적으로 뛰어난 안정성을 나타냄을 보여준다. 강산의 조건(pH 1)에서 과당 올리고당이 레반과 이눌린보다 빠르게 분해되고 이눌린이 레반보다 빠르게 분해된 결과로부터, 플라탄의 산 가수분해는 플라탄의 크기 이외에도 다른 변수가 있음을 알 수 있다. 레반의 결합구조는 주로 β -2,6으로, 그리고 이눌린의 결합구조는 β -2,1으로 이루어져 있다. 따라서, 레반을 형성하는 β -2,6 결합은 이눌린의 결합구조인 β -2,1 결합구조와 비교시에 산 가수분해가 쉽게 진행되는 것으로 추정된다. 이눌린과 이눌린 올리고당을 이용한 Blecker 등(15)의 선행연구결과에 의하면, 고온(70°C)에서는 pH 1차이에 의하여 과당 생성속도는 약 10배 증가하며, 과당 중합도 4 > 5.5 > 9 > 22의 순으로 저분자량 이눌린 올리고당에서 빨리 분해되는 결과를 보였다. 본 연구결과에서도 동일한 경향을 확인할 수 있었다. 본 실험에서는 레반과 레반 올리고당에서도 유사한 결과를 확인하였으나, 다양한 분자량의 올리고당을 사용하지 못하였으므로 분자량 변화에 따른 pH 효과를 설명하기에는 어려움이 있다.

플라탄 분해효소의 영향

플라탄에 대한 효소적 분해정도를 측정하기 위하여 네 가지 시료에 inulinase와 invertase를 사용하였다(Fig. 2, 3). 정상적인 효소활성 여부를 판단하기 위하여 1.7% 서당을 사용하였을 때, 두가지 효소 모두 효소 반응 1시간 이내에 서당을 완전히 분해하여 과당과 포도당을 생성하였다. Inulinase 효소실험에서는 반응후 1시간 내에 레반 올리고당과 이눌린 올리고당은 완전히 분해되었으며, 이눌린의 경우에는 1, 2, 16시간 효소반응에서 각각 61.2%, 63.5%, 75.3%의 시료가 분해되었다. 레반은 1, 2, 16시간 효소반응에서 각각 8.1%, 24.9%, 67.7%의 시료가 분해되었다. 플라탄은 일반적인 당류의 결합형태와는 달리 베타결합으로 구성되어, 소화기내에 존재하는 소화효소 (glucoamylase, alpha-amylase 등)에 의하여 분해되지 않는다. 다만, 레반은 levanase, levan fructotransferase에 의하여, 이눌린은 inulinase, inulin fructotransferase에 의하여 분해된다(16). Inulinase는 기질 특이성이 높는데, 본 연구에서는 이눌린 이외에도 레반에 대해서도 분해력을 나타내어, 후속연구를 통하여 기질특이성에 대한 정확한 기전을 연구할 예정이다. 16시간 동안의 invertase 효소 반응에서는, 이눌린은 전혀 분해가 되지 않았고 레반은 12%가 분해되었다. 이눌린 올리고당과 레반 올리고당은 각각 24.5%와 17.1%가 분해되었다. 실험에 사용한 이눌린 올리고당과 레반 올리고당은 HPLC 분석결과 주요 구성성분이 2-4 당류로 이루어져 있었으며, 이외에도 단당류, 5-6당류가 포함되어 있었다. 단당류나 서당의 경우에는 유산균의 선택적 배양효과가 작은 반면에, 과당 올리고당과 플라탄에서는 선택적인 유산균의 배양을 촉진시켜 준다(17). 장내에서 고분자량의 플라탄이 효소분해와 산가수분해에 의하여 보다 작은 분자량의 과당 올리고당으로 분해되며, 저분자량의 과당 올리고당이 장내미생물에 의하여 발효되면서 생성되는 단쇄지방산 등의 발효산물에 의해 장내유해미생물의 생육을 억제하는 것으로 생각된다. 따라서, 과당 올리고당 이외에도

서당, 포도당 등의 다른 당류가 많이 포함된 상업용 과당 올리고당보다는 플라탄이 prebiotic 효능에서는 유리할 것으로 예상된다. 이러한 근거로 볼 때 레반과 이눌린의 열안정성 및 효소 분해 특성에 대한 본 연구결과는 플라탄을 이용한 식품가공에서 플라탄의 분해정도를 예측하는데 도움을 줄 것으로 사료된다.

Table 2. Initial fructose release rate of four sugars at various pHs. 1.25% solutions were incubated with acid/alkali at 37°C for up to 16 hr, then the proportions of fructose were determined using HPLC.

	pH 1		pH 4.5	pH 7	pH 14
	Fructose	R2	Fructose	Fructose	Fructose
Levan	0.64*	0.99	<0.04	<0.04	<0.04
Levan oligosaccharide	0.73	0.99	<0.04	<0.04	0.12
Inulin	0.43	0.99	<0.04	<0.04	<0.04
Inulin oligosaccharide	0.73	0.95	<0.04	<0.04	0.08

* Unit : mg of fructose/mL.hr

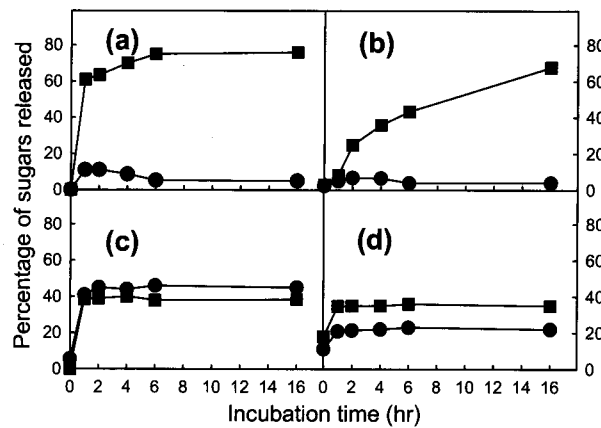


Figure 2. Hydrolysis of four sugars by inulinase treatment ((a) inulin, (b) levan, (c) inulin oligosaccharide and (d) levan oligosaccharide. 1.7% sugar in 50 mM sodium acetate buffer (pH 4.5) solutions were incubated with 1 U of inulinase at 37°C for up to 16 hr, then the proportions of fructose were determined using HPLC. Symbols: ■, fructose; ●, Glucose).

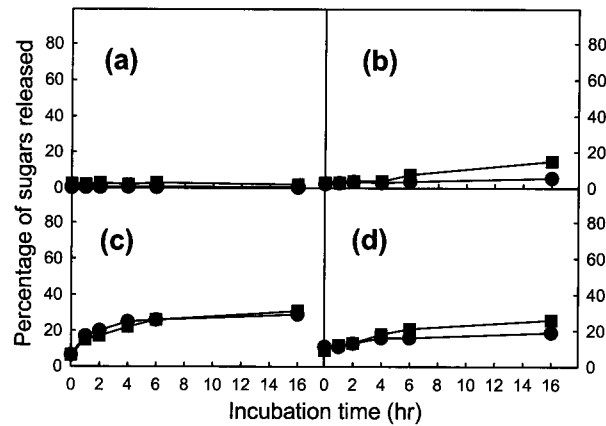


Figure 3. Hydrolysis of four sugars by invertase treatment ((a) inulin, (b) levan, (c) inulin oligosaccharide and (d) levan oligosaccharide. 1.7% sugar in 50 mM sodium acetate buffer (pH 4.5) solutions were incubated with 1 U of inulinase at 37°C for up to 16 hr, then the proportions of fructose were determined using HPLC. Symbols: ■, fructose; ●, Glucose).

요 약

본 연구는 레반과 레반 올리고당, 이눌린과 이눌린 올리고당의 산 및 효소적 안정성을 분석하였다. 네 종류의 플라타탄을 1.25% 농도로 30°C, 16시간 반응시킨 후 생성된 과당의 양으로 가수분해 정도를 판단하였다. 네 종류의 플라타탄은 중성과 알칼리 pH 에서는 비교적 높은 안정성을 보여, pH 14인 조건에서 레반과 이눌린은 2% 이하, 이눌린 올리고당은 10%, 레반 올리고당은 14%가 가수 분해 되었다. pH 5의 조건에서는 거의 분해되지 않았으나, 산성 조건에서는 (pH 1.4) 빠르게 가수분해되어, 이눌린보다 레반이 더 빠르게 가수분해 되었다. 플라타탄은 inulinase에 의하여 분해되었으나, invertase에서는 분해정도가 적었다. 이눌린 올리고당은 inulinase와 invertase 모두에서 분해되는 특성을 보였다. 본 연구결과는 플라타탄을 이용한 식품가공과 보관 공정에서 플라타탄의 분해속도를 예측하는데 도움을 주리라 생각된다.

감 사

본 연구는 삼척대학교 2004년도 신진교수 연구지원사업에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Franck, A. and De Leenheer (2002), Inulin. pp. 439-480. In: Baets, S. De., E. J. Vandamme, and A. Steinbuechel (ed.). *Biopolymers*. Vol 6. Wiley-VCH Verlag GmbH, Germany.
2. Rhee, S. K., K. B. Song, C. H. Kim, B. S. Park, E. K. Jang, and K. H. Jang (2002), Levan. pp. 351-377. In: Baets, S. De., E. J. Vandamme, and A. Steinbuechel (ed.). *Biopolymers*. Vol 5. Wiley-VCH Verlag GmbH, Germany.
3. Iizuka, M., N. Minamiura, and T. Ogura (2000), *Glycoenzymes*. Japan Scientific Societies Press, Japan.
4. Robinson, R. (1995), The potential of inulin as a functional ingredient, *Brit. Food J.* **97**, 30-32.
5. Kang, T. H., S. J. Jung, S. A. Kang, K. H. Jang, E. K. Jang, S. H. Kim, I. H. Kim, C. H. Kim, S. K. Rhee, and U. H. Chun (2002), Preparation of levan oligosaccharides by acid hydrolysis and its application in growth of lactic acid-producing bacteria, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **17**, 137-141.
6. Jang, K. H., S. A. Kang, Y. Cho, Y. Y. Kim, Y. J. Lee, K. Hong, E. K. Jang, C. H. Kim, and R. W. Choue (2002), The effects of levan and inulin on the growth of lactic acid-producing bacteria and intestinal conditions in rats, *Korean J. Nutr.* **35**, 912-918.
7. Kang, S. A., and K. H. Jang. (2005), Effect of dietary fructan on cecal enzyme activities in rat, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **10**, in press.
8. Seo, E. S., J. H. Lee, J. Y. Cho, M. Y. Seo, H. S. Lee, S. S. Chang, H. J. Lee, J. S. Choi, and D. M. Kim (2004), Synthesis and characterization of fructooligosaccharides using levansucrase with a high concentration of sucrose, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **9**, 339-344.
9. Marx, S. P., S. Winkler, and W. Hartmeier (2000), Metabolization of β -(2,6)-linked fructose-oligosaccharides by different Bifidobacteria, *FEMS. Microbiol. Lett.* **182**, 163-169.
10. Roberfroid, M. B. (1999), Caloric value of inulin and oligofructose, *Am. J. Clin. Nutr.* **129**, 1436S-1437S.
11. Kang, S. K., S. J. Park, J. D. Lee, and T. H. Lee (2000), Physiological effects of levanoligosaccharide on growth of intestinal microflora, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **29**, 35-40.
12. Yoshimizu, M., Y. Ezura, and I. Kojima (1996), Effects of levans and oligolevans on cultured cells originated from fish when subjected them to freeze preservation. Annual meeting of the Japanese Society of Fisheries Science 1996, p.24.
13. Ohta, A., M. Ohtsuki, S. Baba, M. Hirayama, and T. Adachi (1998), Comparison of the nutritional effects of fructooligosaccharides of different sugar chain length in rats, *Nutr. Res.* **18**, 109-120.
14. Seo, J. W., K. H. Jang, S. A. Kang, K. B. Song, E. K. Jang, B. S. Park, C. H. Kim, and S. K. Rhee (2002), Molecular characterization of the growth phase-dependent expression of the *Isra* gene, encoding levansucrase of *Rahnella aquatilis*, *J. Bacteriol.* **184**, 5862-5870.
15. Blecker, C., C. Fougny, J. C. van Herck, J. P. Chevalier, and M. Paquot (2002), Kinetic study of acid hydrolysis of various oligofructose samples, *J. Agric. Food Chem.* **50**, 1602-1607.
16. Roberfroid, M. B., and N. M. Delzenne (1998), Dietary fructans, *Annu. Rev. Nutr.* **18**, 117-143.
17. Jang, K. H., S. A. Kang, Y. H. Cho, Y. Y. Kim, Y. J. Lee, K. H. Hong, K. H. Seong, S. H. Kim, C. H. Kim, S. K. Rhee, S. D. Ha, and R. W. Choue (2003), Prebiotics properties of levan in rats, *J. Microbiol. Biotechnol.* **13**, 348-353.