

푸룩토실트란스페라제생성균의 선발에 관한 연구

리창호, 김련화, 심금석

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《우리는 발전된 나라들에서 이러한 과학기술의 성과를 널리 받아들이고 그것을 더욱 발전시킴으로써 최신과학기술의 높은 봉우리를 빨리 점령하여야 합니다.》(《김정일선집》 중보판 제11권 142페이지)

푸룩토올리고당(FOS)은 소화관의 유용한 미생물인 *Bifidobacterium*의 성장을 촉진하여 소화관미생물상을 개선하는 생물학적으로 중요한 올리고당이다.

현재 세계적으로 FOS는 사탕용액에 푸룩토실트란스페라제(FTase, EC 2.4.1.9)를 작용시켜 효소적방법으로 합성하고있다. FTase로는 미생물기원의 효소가 많이 리용되고있는데 주요효소생성균은 *Aureobasidium*과 *Aspergillus*속의 곰팡이들이다.[3, 5]

이로부터 우리는 보존균들가운데서 FTase생성능이 높은 균주를 선발하고 효소반응생성물의 당조성과 함량을 밝히기 위한 연구를 하였다.

재료 및 방법

실험재료로는 순도가 99%이상되는 정제사탕을 리용하였다. 균주로는 균주보존연구소와 실험실에 보관되어있던 *Aureobasidium*, *Aspergillus*속 균주들을 리용하였다.

균배양을 위한 배지조성은 사탕 20%, 효모엑스 0.5%, NaNO_3 1%, KH_2PO_4 0.5%로 하였으며 배지를 멸균한 다음 균을 접종하고 30℃에서 60h동안 진탕배양하였다.[5] 배양이 끝나면 배양액을 원심분리하여 균체를 제거하고 상청액을 효소용액으로 리용하였다.

FTase활성측정을 위한 효소반응계는 80% 사탕(w/v) 0.6mL, 0.2mol/L 초산완충액(pH 5.5) 0.1mL, 효소용액 0.1mL로 하였으며 55℃에서 1h동안 반응시킨 후 끓는 수욕에서 10min간 방치하여 반응을 정지시켰다.[5] FTase활성 1U는 1min동안에 1 μmol 의 과당을 전이시키는 효소의 량으로 하였다. 전이된 과당(F')의 농도는 환원당(R)농도(소모기-넬슨법)와 포도당(G)농도(o -톨루이딘법)를 측정하여 다음의 식으로 계산[4]하였다.(F 는 전이되지 않은 유리과당)

$$F = R - G$$

$$F' = G - F = 2G - R$$

과당전이률(T_F , %)은 다음의 식으로 계산하였다.

$$T_F = \frac{F'}{F + F'} \times 100 = \frac{F'}{G} \times 100$$

효소반응생성물의 당조성과 함량분석은 HPLC분석법으로 하였다.[1]

결과 및 논의

1) FTase활성이 높은 균주의 선발

사탕으로부터 푸룩토올리고당을 효소적으로 합성하기 위하여 FTase활성이 높은 균주를 선발하였다. 보존된 *Aureobasidium* 및 *Aspergillus*속의 균주들을 진탕배양하여 배양상청액의 FTase활성을 측정한 결과는 표 1과 같다.

표 1. 배양상청액의 FTase활성

균주	FTase활성 $/(U \cdot mL^{-1})$	균주	FTase활성 $/(U \cdot mL^{-1})$
<i>Aureobasidium pullulans</i> 8405	12.9 ± 0.5	<i>Asp. niger</i> 8141	0.3 ± 0.1
<i>Aur. pullulans</i> 8498	20.2 ± 0.8	<i>Asp. niger</i> 8541	0.5 ± 0.2
<i>Aur. pullulans</i> 8507	26.9 ± 1.2	<i>Asp. oryzae</i> 8036	2.4 ± 0.2
<i>Aspergillus niger</i> 8672	0.5 ± 0.1	<i>Asp. oryzae</i> 8500	3.5 ± 0.3
<i>Asp. niger</i> 8159	8.2 ± 0.3	<i>Asp. japonicus</i> 8156	13.3 ± 0.4
<i>Asp. niger</i> 8890	21.2 ± 0.7		

표 1에서 보는바와 같이 *Aureobasidium*속의 균주들은 *Aspergillus*속의 균주들보다 FTase활성이 비교적 높았다. 이것은 FOS제조를 위한 FTase생성균으로서 *Aureobasidium*속의 균주를 많이 리용한다는 선행연구자료[2, 3]와도 일치한다.

각이한 균주들의 FTase활성으로부터 우리는 효소활성이 상대적으로 높은 균주들인 8405, 8498, 8507, 8890, 8156균주들을 FTase생성균으로 1차선발하였다.

2) 과당전이률이 높은 균주의 선발

FOS제조를 위한 FTase는 효소활성이 높은것과 동시에 과당전이률이 높아야 한다. 과당전이률이 높아야 사탕이 분해되는 과정에 유리되는 과당을 거의 대부분 전이하여 올리고당저분물을 높일수 있다.

표 2. 선발균주들의 과당전이률

균주	과당전이률/%
<i>Aur. pullulans</i> 8405	93.7 ± 1.0
<i>Aur. pullulans</i> 8498	99.0 ± 0.5
<i>Aur. pullulans</i> 8507	99.5 ± 0.5
<i>Asp. niger</i> 8890	71.4 ± 1.2
<i>Asp. japonicus</i> 8156	51.7 ± 1.5

1차선발한 FTase생성균주들의 과당전이률을 측정한 결과는 표 2와 같다.

표 2에서 보는바와 같이 *Aureobasidium*속 균주들의 과당전이률은 상대적으로 높았다. 과당전이률이 높은 균주들은 8498, 8507이었는데 8507균주가 FTase활성이 높으므로 우리는 *Aur. pullulans* 8507균주를 FOS제조를 위한 FTase생성균으로 선발하였다.

3) 효소반응생성물의 분석

우리는 *Aur. pullulans* 8507균주의 FTase에 의하여 합성되는 FOS의 조성과 함량을 밝히기 위하여 반응생성물을 HPLC법으로 분석하였다.(그림)

그림에서 보는바와 같이 효소반응과정에 기질인 사탕의 함량은 감소하고 생성물인 포도당과 푸룩토올리고당들의 함량은 증가하였다.

HPLC에 의하여 측정된 푸룩토올리고당의 함량은 표 3과 같다.

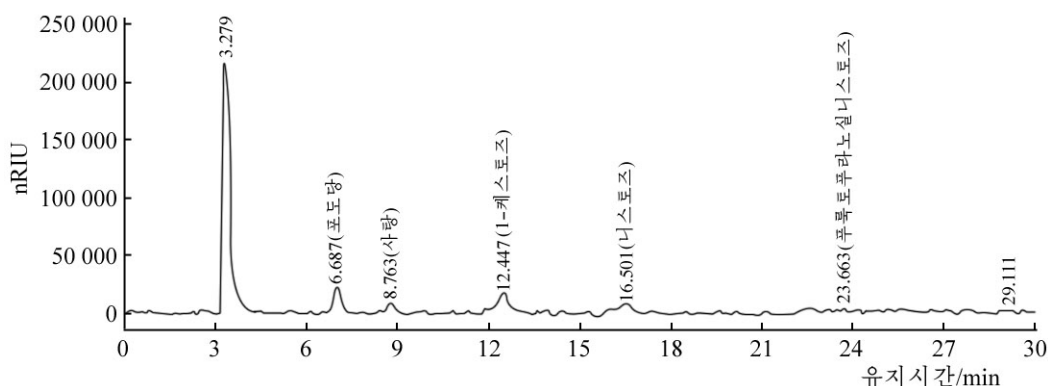


그림. 반응생성물의 HPLC분석결과(효소반응 20h)

표 3에서 보는바와 같이 3당류인 1-케스토즈는 33.0%, 4당류인 니스토즈는 28.7%, 5당류인 푸룩토프라노실니스토즈는 2.7%로서 FOS총함량은 64.4%였다. 선행연구[2]에 의하면 *Aur. pullulans* KFCC 10524가 생성하는 FTase를 리용하여 사탕으로부터 FOS를 제조할 때 반응생성물의 당조성과 함량은 포도당 26.1%, 사탕 19.0%, GF₂ 40.5%, GF₃ 13.8%, GF₄ 0.6%로서 FOS함량은 54.9%였다. 이와 비교하여보면 우리가 선발한 *Aur. pullulans* 8507의 FTase는 사탕을 더 많이 분해하여 FOS생성률을 훨씬 높인다는것을 알수 있다.

표 3. 반응생성물의 당조성과 함량

봉우리 번호	유지 시간 /min	성분	함량/%
1	6.967	포도당(G)	25.0
2	8.763	사탕(GF)	10.6
3	12.447	1-케스토즈(GF ₂)	33.0
4	16.501	니스토즈(GF ₃)	28.7
5	23.663	푸룩토프라노실니스토즈(GF ₄)	2.7
		푸룩토크올리고당(GF _n)	64.4

효소반응 20h

맺 는 말

- 1) FTase활성과 과당전이율이 높은 균주인 *Aur. pullulans* 8507을 선발하였다.
- 2) *Aur. pullulans* 8507이 생성하는 FTase에 의한 반응생성물의 당조성과 함량은 포도당 25.0%, 사탕 10.6%, 1-케스토즈 33.0%, 니스토즈 28.7%, 푸룩토프라노실니스토즈 2.7%로서 FOS총함량은 64.4%이다.

참 고 문 헌

- [1] Iraj Ghazi et al.; Journal of Molecular Catalysis, B 35, 19, 2005.
- [2] Jong Won Yun et al.; Biotechnol. Bioprocess Eng., 1, 18, 1996.
- [3] P. T. Sangeetha et al.; Trends in Food Science & Technology, 16, 442, 2005.
- [4] Quang D. Nguyen et al.; Biotechnology Letters, 21, 183, 1999.
- [5] 曹霞 等; 食品科学, 6, 31, 2000.

주체103(2014)년 7월 5일 원고접수

Selection of Strain Producing Fructosyltransferase

Ri Chang Ho, Kim Ryon Hwa and Sim Kum Sok

We selected the strain highly producing fructosyltransferase(FTase) and analyzed products by enzymatic reaction. *Aureobasidium pullulans* 8507 was highly the FTase activity and fructose transferring rate. Using this microorganism's enzyme, it was obtained a final product with 64.4% of total FOS containing GF₂(33.0%), GF₃(28.7%), GF₄(2.7%), residual sucrose(10.6%) and glucose(25.0%).

Key words: fructosyltransferase(FTase), *Aureobasidium pullulans*