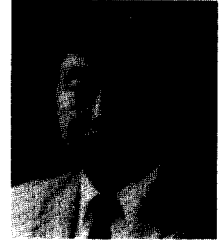


분쇄마찰매체 함유 효소반응계에서의 생전분의 Maltose로의 직접전환

경북대학교 유전공학과 李 龍 賢



I. 서 론

Maltose는 glucose 2분자가 α -1, 4 glycosidic bond로 결합된 이당류로서, 감미도는 설탕의 20-30% 정도이지만 물엿의 주성분으로 옛부터 우리와 친밀하며, 설탕 및 기타 당과는 다른 독특한 감미를 갖고 있고 물 또는 극성화합물과 착화합물을 형성함으로써 보수성, 보향성이 높고, 수분활성의 저하효과가 있으며, 또한 결정화 저해작용, 갈변반응의 억제작용, 높은 열안정성등 많은 특징이 있는 전분유래의 감미료로서, 제과, 음료, 주류, 그리고 통조림 제조등에서 부향제로서, 또한 맛의 개선과 감미를 담백하게 하기 위하여 이용되고 있다. 이외에 효소의 실활을 방지하기 위한 효소안정제, 정맥주사용보당액, 저칼로리 감미료인 maltitol등과 같은 유도체 제조원료, 의약품과 화장품의 재료로서 활용되고 있다(1).

현재 maltose 생산은 전분(질)의 증자액화 과정을 수반하는 2단계 제조공정에 의해 행해진다(1). 첫 단계공정은 전분(질)원료의 액화공정단계로서 전분(질)원료에 증기를 주입하면서 약 80-120°C에서 액화효소 특히 내열성 α -amylase를 첨가하여 수시간 동안 증자 호화하여 가용성 전분 또는 덱스트린으로 전환시킨다. 둘째 단계공정은 이와같이 생성된 액화전분액에 maltose 생성효소인 β -amylase 또는 maltose를 주로 생성하는 α -amylase(Fungal α -amylase; Fungamyl)와 debranching enzyme인 pululanase를 첨가하여 50-55°C에서 48시간 정도 반응시켜 maltose를 생산한다. 이를 다시 농축, 정제하여 maltose가 40-60%인 고maltose액당, 80-95%인 분말 maltose, 또는 95-100%인 정제 maltose등으로 분류제조된다(1-7).

이와같은 증자법에 의한 전통적인 기존의 maltose

생산법은 다음과 같은 결점이 있어서 제조공정의 개선이 필요하다. 즉 (1) 증자에 필요한 특수시설과 유지가 필요하며, (2) 액화시 상당량의 증자열을 필요로 할 뿐만 아니라 고점도의 교반에 많은 에너지가 소요되는 등 에너지 소모형 공정이며, (3) 원료인 전분(질)은 물론 생성된 maltose도 가용상태로 있어 전분과 maltose의 혼합액으로부터 maltose의 분리정제가 어려우며, (4) 비이용잔류 전분(질)의 분리 회수기 또한 어려워 비이용 유용성분의 낭비가 크며 따라서 maltose 수율이 낮고, 또한 (5) 비이용 유용성분은 심각한 환경오염의 원인이 된다. 뿐만 아니라 (6) 전분(질)은 증자에 의해서 팽윤되어 풀과 같은 점도가 매우 높은 상태로 변환됨으로 전분(질)을 고농도로 첨가하기가 어려워 maltose를 고농도로 생산하기 어렵다. 따라서 공정자체의 개선에 대한 연구가 필요하다.

반면 생전분의 직접전환에 의해 maltose를 생산하는 무증자 제조법은 증자에 필요한 에너지를 절약할 수 있고, 고농도의 기질첨가가 가능하며, 원심분리와 같은 간단한 단위조적으로 비이용 전분(질)을 쉽게 분리 회수할 수 있으며, 따라서 재활용에 의한 수율향상을 기할 수 있고, 그리고 생성된 maltose의 분리정제가 용이한 점등의 많은 장점이 있다. 그러나 생전분입자의 불용성과 구조적 특징때문에 생산속도 및 생산수율이 극히 낮아 산업적 공정에 전혀 활용되고 있지 않으며, 또한 생전분의 직접전환에 의한 maltose 생산에 대한 연구도 전혀 이루어지지 않고 있다.

본인 등은 무증자 생전분의 효율적 활용에 관한 연구로서 생전분의 효소당화시 고형의 분쇄 마찰매체를 첨가 교반함으로써 생전분에 대한 amylase 계통효소의 작용을 현저히 촉진시키는 분쇄마찰매체 함유 효소 반응계에 관한 일련의 연구를 수행하고

있으며, 효소작용촉진 mechanism은 생전분이 많은 작은 입자로 단편화됨에 기인함을 밝힌 바 있다(8-12). 최근에는 생전분(질)을 증가하지 않고 maltose 생산효소를 이용하여 maltose를 직접 생산하는 연구를 수행하던 중, 분쇄마찰매체를 첨가하여 교반하여 줄 경우 maltose 생성속도 및 수율이 현저히 증가될 뿐만 아니라 고순도의 maltose를 고농도로 생산할 수 있음을 확인하였으며, 특히 약 알카리 pH 영역에서 좋은 결과를 얻었다(13).

이와같은 효소반응계를 활용한 무증자생전분으로부터의 maltose 제조법은 국내외에서 연구된 바 없는 새로운 독창적인 maltose 제조법이라 할 수 있다. 본 논문에서는 무증자 생전분을 기질로 한 분쇄마찰매체 함유 효소 반응계에서의 여러 maltose 생산효소를 이용한 고농도, 고순도 maltose 제조에 관하여 기술함으로써 새로운 maltose 제조공정을 소개하고자 한다.

II. 분쇄마찰매체 함유 효소 반응계

분쇄마찰매체 함유 효소반응계란 생전분 또는 생전분질의 효소당화시 생전분-효소-완충용액의 혼합 현탁액에 유리구, 폴리아세탈, 또는 테프론과 같은 고형매체를 첨가하여 젖은 상태에서 분쇄마찰 효과를 주면서 액화와 당화를 동시에 행하는 반응계로서 반응장치의 구조는 Fig. 1과 같다. 또한 생전분입자의 효소당화반응계를 미시적인 각도에서 모형화한 것을 Fig. 2에 나타내었다. 전분입자, 전분입자에 부착되지 않은 전분분해효소, 효소-전분 복합체, 그리고 분쇄마찰매체인 유리구를 상대적인 크기로 나타내었다. 분쇄마찰매체의 물리적 충격은 생전분입자를 분쇄 또는 마찰시켜 효소당화를 용이하게 받을 수 있는 상태로 전분구조를 변형시켜 효소당화를 현저히 촉진시키게 된다.

분쇄마찰매체 함유 효소반응계에서 생전분의 효소당화가 촉진되는 기작으로는 다음과 같은 몇가지로 유추해 볼 수 있다. 즉 분쇄마찰매체의 물리적 충격으로 전분의 미세결정구조가 파괴되어 효소당화작용을 쉽게 받게 되는 경우, 물리적 충격으로 전분의 입자에 균열이 생기고 그 틈으로 물분자가 스며들어 전분입자가 팽윤되어 효소당화를 쉽게 받게 되는 경우, 분쇄마찰매체에 의하여 전분입자가

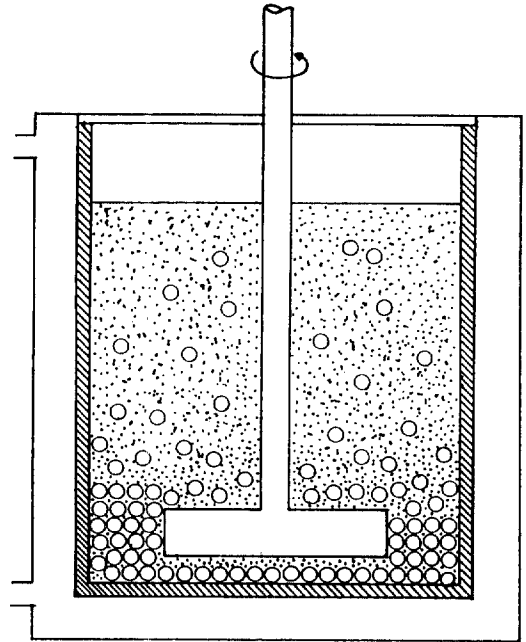


Fig. 1. The Shape of agitated bead enzyme reactor (bioattritor).

조개져 작은 입자로 붕괴되어 효소와 접촉할 수 있는 표면적이 증대되고 이에 따라 효소작용이 촉진되는 경우이다.

III. 분쇄마찰매체 함유 효소 반응계를 활용한 생전분의 Maltose로의 직접전환

1. 분쇄마찰매체 함유 효소반응계의 효용성

Fig. 3은 분쇄마찰매체 함유 불균일상 효소반응계에서의 maltose 생성의 효용성을 기존의 증자법과 비교 검토하기 위하여, 옥수수 생전분을 기질로 분쇄마찰매체 함유 효소반응계에서 maltose-forming fungal α -amylase(Fungamyl)로 효소반응시킨 경우, 매체를 첨가하지 않고 반응시킨 경우, 그리고 전통적인 증자법에 따라 α -amylase(Termamyl)로 증자액화시킨 가용성전분을 기질로 Fungamyl로 효소반응시킨 경우의 생성된 maltose, glucose 그리고 malto-oligosaccharides을 비교한 결과이다.

분쇄마찰매체 함유 효소반응계를 활용한 maltose 생성군의 효소반응속도는 증자군과 비교하여 초기 수시간동안에는 다소 늦었으나 그 이후에는 거의 유사한 수준을 보였다. 이와같이 초기에 반응속도가

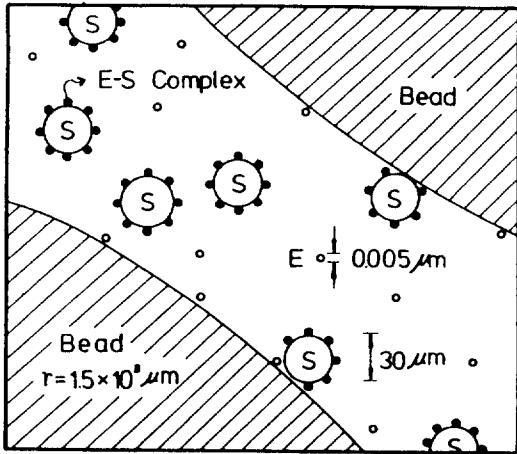


Fig. 2. Schematic model on enzymatic hydrolysis of uncooked starch in an agitated bead reaction system, S is starch, E is enzyme.

다소 느린 것은 전분입자가 분쇄마찰매체에 의해 fragmentation이 충분히 진행될 정도로 효소의 침식작용을 받지 않고 있기 때문이다.

한편 24시간 반응 후의 당화 및 maltose의 수율을 비교하면, 증자법의 경우는 24시간 효소반응후 액화전분의 78% (w/v)가 당화되었고, 이중 60%가 maltose, 8%가 glucose, 그리고 32%가 malto-oligosaccharides로서, 69 g/L의 maltose가 생성되었다. 그러나 무증자 분쇄마찰 효소반응계를 활용할 경우에는 생전분의 84%가 당화되었고, 이중 72%가 maltose, 19%가 glucose, 그리고 9%가 malto-oligosaccharides로서, 95 g/L의 maltose가 얻어졌으며 증자군에 비하여 현저히 높았다. 또한 생성된 malto-oligosaccharides는 주로 maltotriose였고 maltotetraose이상의 oligosaccharides는 거의 생성되지 않았다. 반면 매체를 첨가하지 않은 군은 24시간 후에도 소량의 maltose가 생성됨에 그쳤다.

이와같은 효용성으로 판단컨대 분쇄마찰매체 함유 효소반응계를 활용하여 생전분으로부터 maltose를 직접 생산하는 방법은 현재 산업적으로 활용되고 있는 전통적인 증자공정을 대체할 수 있는 고효율 maltose 제조법으로 사료된다. 또한 분쇄마찰매체 함유 효소반응계에 잔류하는 미이용 생전분은 액화전분과는 달리 원심분리와 같은 단순한 단위조작으로 쉽게 분리할 수 있어, maltose 함유율이 높은 수용성 당액을 얻을 수 있음으로 maltose의 분리

정제가 용이한 장점도 예상된다.

2. 효소반응 pH의 생성당조성 조절작용

반응액의 pH가 당생성 및 당조성에 미치는 영향을 검토한 결과는 Fig. 4와 같다. 가용성 액화전분액을 기질로 maltose를 생성할 경우 사용 Fungamyl의 최적 pH는 약산성인 pH 5.0-5.5였다(14). 그러나 분쇄마찰 효소 반응계의 경우는 pH 5.0-5.5인 약산성에서는 24시간후에도 생전분의 60%만 당화되었다. 한편 당조성은 포도당, maltose, 그리고 maltotriose의 농도가 각각 36, 30, 24 g/L로서, 포도당과 maltotriose가 상당량 생성된 반면 maltose의 생성량은 비교적 낮았다. 그러나 현탁액의 pH가 8.0인 약알칼리에서는 생전분의 84%가 당화되었고, 또한 당조성도 glucose, maltose 그리고 maltotriose의 농도가 각각 20, 95, 13g/L로서, maltose의 함량이 72%로 크게 증가하였다. 그러나 pH가 9.0으로 증가될 경우에는 생성당 중의 maltose의 함량은 76%로 계속 증가하였으나 생전분의 당화율이 현저히 감소하여 50%만이 당화됨으로서 maltose의 생성량도 매우 감소되었으며, 이는 pH에 따른 효소 실험에 기인하는 것으로 사료된다.

위와같은 Fungamyl 사용시 분쇄마찰 효소 반응계에서 관찰되는 최적 pH가 알칼리 영역으로 변화하는 현상은 Fungamyl이외의 bacterial α -amylase인 조맥야효소와 식물유래의 정제된 β -amylase에서도 관찰되었다. 분쇄마찰 효소반응계에서 생전분으로부터 maltose를 생산할 경우 조맥야효소의 경우는 pH 9.0에서 maltose생성이 가장 촉진되었고 반면 glucose생성이 억제되었다. 또한 β -amylase의 최적 pH는 8.0임을 알 수 있었다.

위에서와 같이 각종 maltose 생산효소를 이용하여 분쇄마찰 효소반응계에서 생전분으로부터 직접 maltose를 생산할 때 관찰되는 현상으로서 가용성전분을 기질로 할 때의 최적 pH인 약산성에서 보다는 오히려 약알칼리 영역에서 높은 당화율과 속도를 나타내며 또한 maltose의 함유율도 증가하는 것은 매우 특이한 효소적 현상이다. 이는 생전분의 구조가 완충액 중의 알칼리 이온에 의해 영향을 받거나, 효소의 분자구조가 생전분의 분해에 적절한 상태로 변형되든지, 또는 알칼리 영역에서의 효소안정성이 maltose에 의하여 증가되는 등 때문이라 유추된다. 그러나 정확한 mechanism을 규명하기 위해서는

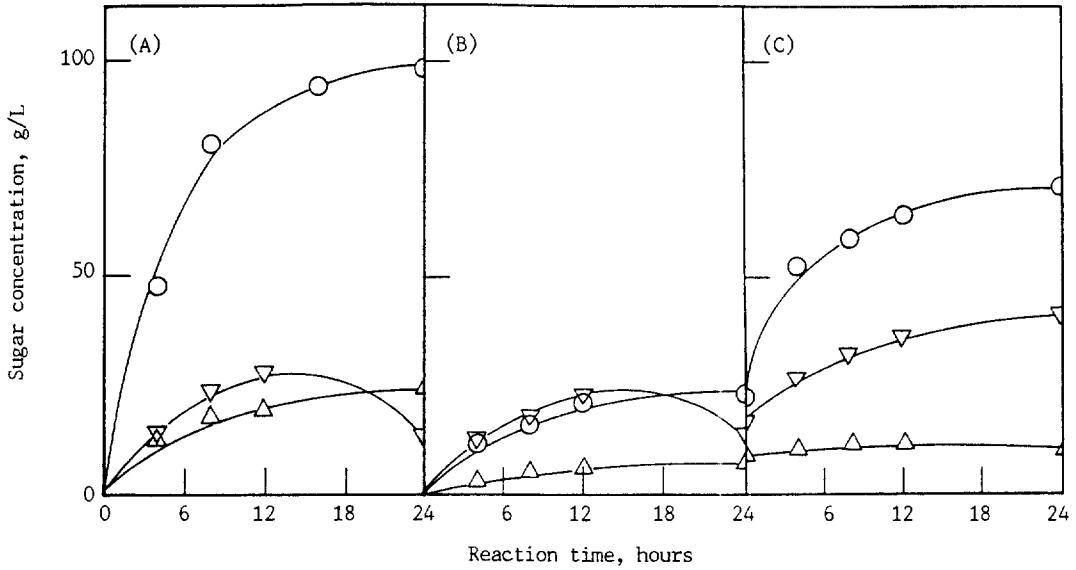


Fig. 3. Comparison of sugar compositions : maltose (○-○), glucose (△-△), and malto-oligosaccharides (▽-▽). A) 150g/L raw starch, 1,100 units/L Fungamyl, 600g/L glass bead, pH 8.0 (50 mM boric acid-NaOH buffer), 50°C, and 250 rpm. B) same with A but without bead. C) 150g/L liquefied starch (with 5,600 units/L -amylase), 280 units/L Fungamyl, pH 5.0 (50 mM Na-acetate buffer), without bead, 50°C, and 250 rpm.

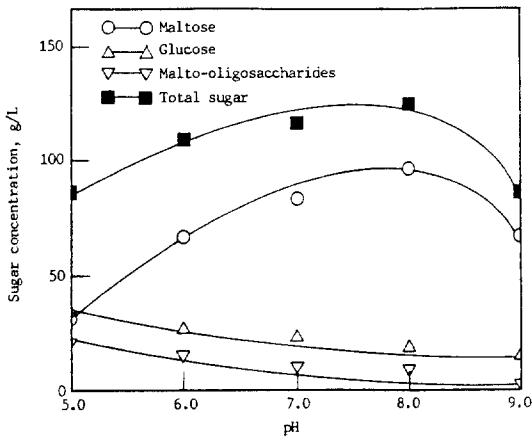


Fig. 4. Effect of pH on maltose formation from raw starch : 150g/L raw starch, 1,100 units/L Fungamyl, 600g/L glass bead, 50°C, and 250 rpm. pH 5.0, 6.0, and 7.0: 50 mM wide-range buffer, pH 8.0 and 9.0: 50 mM boric acid-NaOH buffer.

후속연구가 필요하다.

3. 고농도 기질에서의 Maltose로의 전환반응

Table 1은 생전분의 농도에 따른 maltose 생성량과 당조성의 변화를 나타낸 것이다. 생전분의 농

Table 1. Effect of substrate concentration on the production from raw corn starch.

(w/v)	G ₁ ^a	G ₂ ^b	MO ^c	MY ^d	MP(%) ^e
5%	6	15	15	0.29	42
10%	11	55	19	0.52	65
15%	24	95	13	0.60	72
20%	61	104	22	0.50	56
30%	105	123	25	0.39	49
40%	140	138	40	0.33	44

* Condition: pH 8, 50°C, 250 rpm.

a: Glucose concentration, g/L

b: Maltose concentration, b/L

c: Malto-oligosaccharide concentraion, g/L

d: Maltose yield (Maltose g/L/Strach g/L)

e: Maltose purity (b/a + b + c)

도가 증가함에 따라 maltose 생성량은 증가하여, 생전분 농도가 40% (w/v)일 때 138 g/L의 가장 높은 maltose 생성을 보였다. 이 때 생성된 총당은 310 g/L로서 생전분의 70%가 당화되었다. 그러나 이와 같은 고농도에서는 glucose 생성도 동시에 현저히 증가하여 maltose농도와 유사한 140 g/L가 생성됨으로서 maltose의 함유율은 오히려 44%로 감소하

여, 15% (w/v) 기질첨가의 경우의 함유율인 72%에 비해 매우 낮았다. 그러나 maltose의 생성농도가 높음을 볼 때 고농도기질로부터의 고농도 maltose의 생산이 가능함을 알 수 있으며, 기질의 유가식 또는 연속 첨가, 생전분에 적합한 효소의 개발, bioattritor의 구조개선에 대한 연구등을 통하여 고생전분 농도에서의 maltose 생산이 가능하리라 본다.

4. Maltose 전환에 미치는 다른 인자

생전분으로부터 maltose를 생성하는 데 있어 첨가되는 효소량에 따라 maltose 생성량 및 당조성이 현저히 달랐으며, 1,100 unit/L의 효소첨가시 생전분으로부터 고농도, 고순도의 maltose가 얻어졌다. 그 이상의 효소 첨가시에는 maltose의 생성량에는 변동이 없었으나 당조성에서 glucose는 증가하고 maltotriose는 현저히 감소되는 경향을 보여, maltose의 함유율이 감소하였다.

생전분으로부터 maltose를 생성하는 데 있어 분쇄마찰매체 첨가량이 증가함에 따라 maltose 생성량이 현저히 증가하여 분쇄마찰내체의 첨가량이 매우 중요함을 알 수 있었다. 이는 분쇄마찰매체를 어느정도 이상 첨가하여야만이 효율적으로 전분의 구조가 변형되어 생전분으로부터 maltose의 생성이 현저히 촉진된다고 사료된다. 600 g/L 첨가시 95 g/L의 높은 maltose를 얻었으며, 이 이상에서는 다소 증가하였으나 큰 변화가 없었다.

Fungamyl외에 다른 보충효소로 α -amylase를 첨가할 경우에는 Fungamyl만 사용할 경우의 glucose 24 g/L, maltose 95 g/L, malto-oligosaccharides 13 g/L와 달리 12,97,27 g/L의 당이 각각 생성되었다. α -amylase를 보충 첨가함으로써 Fungamyl만을 다량 첨가할 경우와 유사한 높은 수준의 maltose 생성량과 생성속도를 얻을 수 있었다. 그러나 당조성을 Fungamyl만을 다량 첨가할 경우와 달리 glucose는 적고 maltotriose가 증가하는 경향을 보였다. 반면 debranching 효소인 pullulanase의 보충첨가시는 malto-oligosaccharides의 생성을 증가시켜 maltose의 함유율을 오히려 감소시켰다. 위와같이 α -amylase를 전분액화시 사용되는 양과 동일량을 보충첨가함으로써 Fungamyl의 사용량을 현저히 줄일 수 있었으며, 앞으로 효소사용량을 감소시키면서 더욱 고농도, 고순도의 maltose를 얻기위한 효소의 상호 보완 작용에 관한 연구를 하고자 한다.

5. 미반응 잔류전분의 분리성

무증자법에 의한 맥아당 생성의 경우는 증가하지 않으므로 전분(질)원료에 함유된 대부분의 미발효성 유용성분은 효소 반응후 불용성상태로 남아 있어 원심분리 및 여과등의 방법으로 쉽게 제거할 수 있다. 24시간의 효소반응후의 미분해 잔류성분은 5분간, 6000g에서 원심분리하여 잔류전분(질)의 95% 이상을 분리할 수 있었다.

IV. 結 論

Maltose를 경제적으로 생산할 수 있는 한 방법으로 무증자 생전분을 이용한 maltose 제조공정을 들 수 있으나, 이는 증자공정에 비하여 maltose 생성속도와 생성수율이 매우 낮아 개선이 요구되고 있다. 생전분(질)을 증자하지 않고 maltose 생산효소로서 maltose를 생성할 경우 전분질과 효소현탁액에 분쇄마찰매체를 첨가하여 분쇄마찰 효과를 주면서 생전분으로부터 고농도, 고순도의 maltose를 생산하는 새로운 효소당화법을 소개하였다. 분쇄마찰매체를 활용한 무증자 생전분으로부터의 maltose 생산은 지금까지 연구된 바 없는 새로운 maltose 제조공정으로서 부가가치가 매우 높고, 산업적 활용가능성이 매우 높은 공정으로 사료된다. 앞으로 고농도 기질을 활용하여 더욱 고농도, 고순도의 maltose 생성을 위한 연구가 필요하며, 당화조건의 최적화, 저에너지 소모형 당화장치의 개발, 새로운 무증자 maltose 제조공정의 경제성에 대한 평가가 요망된다.

참고문헌

1. Saha, B. C. and J. G. Zeikus, *Process Biochemistry* June, **78** (1987).
2. Slominska, L. and G. Starogardzka, *Starch/starke*, **38**, 205 (1986).
3. Goering, K. J., B. W. DeHaas, D. W. Chapman, R. F. Eslick, and R. E. Gramera, *Starch/starke*, **32**, 349 (1980).
4. Maeda, H. and G. T. Tsao, *Process Biochemistry*, July, **2** (1979).
5. Whistler, R. L., J. N. Bemiller, and E. F. Paschall, *Starch-Chemistry and Technology*, Second

- ed., Academic Press, N. Y., p.127 (1984).
6. Aunstrup, K., *Annul Reports on Fermentation Processes*, First ed., Academic Press, N. Y., vol. **2**, p. 136 (1978).
 7. Sata, H., H. Tanaguchi, and Y. Maruyama, *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 151 (1978).
 8. 이용현, 조구형, *산업미생물학회지*, **14**, 29 (1986).
 9. 조구형, 이용현, *산업미생물학회지*, **14**, 407 (1986).
 10. 이용현, 박진서, *산업미생물학회지*, **17**, 349 (1989).
 11. 박동찬, 이용현, *산업미생물학회지*, **18**, 260 (1990).
 12. 이용현, 박동찬, *산업미생물학회지*, **18**, 352 (1990).
 13. 이용현, 박진서, *산업미생물학회지*, **19**, 290 (1991).
 14. Novo Co., *Enzyme Catalogue-Fungamyl*, Denmark, 1990.