

## 내열성 효소를 이용한 전분으로부터 6-인산과당의 제조

권 규 혁 · 차 월 석 · <sup>1</sup>김 복 희 · † 신 현 재  
조선대학교 공과대학 생명화학공학과, <sup>1</sup>서원대학교 RIC  
(접수 : 2007. 8. 8., 게재승인 : 2007. 10. 2.)

## Production of Fructose 6-Phosphate from Starch Using Thermostable Enzymes

Kyu-Hyuk Kwun, Wol-Suk Cha, Bokhee Kim<sup>1</sup>, and Hyun-Jae Shin<sup>†</sup>

Department of Chemical & Biochemical Engineering, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

<sup>1</sup>Regional Innovation Center, Seowon University, Cheongju-si, Chungbuk 361-742, Korea

(Received : 2007. 8. 8., Accepted : 2007. 10. 2.)

Phosphosugars are found in all living organisms and are commercially valuable compounds with possible applications in the development of a wide range of specialty chemicals and medicines. In carbohydrate metabolism, fructose 6-phosphate (F6P) is an essential intermediate formed by phosphorylation of 6' position of fructose in glycolysis, gluconeogenesis, pentose phosphate pathway and Calvin cycle. In glycolysis, F6P lies within the glycolysis metabolic pathway and is produced by isomerisation of glucose 6-phosphate. For large-scale production, F6P could be produced from starch using many enzymes such as pullulanase, starch phosphorylase, isomerase and mutase. In enzymatic reactions carried out at high temperatures, the solubility of starch is increased and microbial contamination is minimized. Thus, thermophile-derived enzymes are preferred over mesophile-derived enzymes for industrial applications using starch. Recently, we reported the production of glucose 1-phosphate (G1P) from starch by *Thermus caldophilus* GK24 enzymes. Here we report the production of F6P from starch through three steps; from starch to glucose 1-phosphate (glucan phosphorylase, GP), then glucose 6-phosphate (phosphoglucomutase, GM) and then F6P (phosphoglucoisomerase, GI). Using 200 L of 1.2% soluble starch solution in potassium phosphate buffer, 1,253 g of G1P were produced. Then, 30% yields of F6P were attained at the optimum reaction conditions of GM : GI (1 : 2.3), 63.5°C, and pH 6.85. The optimum conditions were found by response surface methodology and the theoretical values were confirmed by the experiments. The optimum starch concentrations were 20 g/L under the given conditions.

**Key Words** : Phosphosugar, fructose 6-phosphate, glucose 1-phosphate, starch phosphorylase, phosphoglucomutase, glucose 6-phosphate isomerase

### 서 론

6-인산과당 (fructose 6-phosphate, F6P)은 과당의 6번 위치가 인산화된 당 화합물로서 식물세포나 동물의 조직 내에 광범위하게 존재한다. 특히 식물세포 내에서는 해당과정 (glycolysis)이나 당생성과정 (gluconeogenesis), 5당인산화과정 (pentose phosphate pathway) 및 캘빈회로 (Calvin cycle)의 중

요한 중간물질이다. 이 물질은 또한 동물 조직 내에서 6-인산포도당 (glucose 6-phosphate, G6P)과 평형을 유지하며 존재하는 것으로 알려져 있다. 일반적으로 D-형 이성질체로 존재하며 생명체내에서 F6P의 합성은 해당과정의 두 번째 단계에서 6-인산포도당에 이성질화효소 (phosphoglucoisomerase)가 작용하여 생성된다(1). 문헌에 따르면 6-인산과당은 다양한 용도가 잠재되어 있는 것으로 밝혀졌다(2). 최근 탄수화물에 인산이 결합된 인산화당 혹은 인산당 (phosphosugar)이 당뇨병, 염증 등 무척 다양한 분야에 사용될 수 있는 가능성이 언급되었다(2).

효소를 이용한 생물전환 (bio conversion)이 산업적으로 유용하게 사용되기 위해서는 효소의 안정성 및 생산성이 무척 중요하다. 이런 점에서 재조합 내열성 효소는 그 산업적

† Corresponding Author : Department of Chemical & Biochemical Engineering, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

Tel : +82-62-230-7518, Fax : +82-62-230-7226

E-mail : shinhj@chosun.ac.kr

가치가 무척 높다고 할 수 있다. 최근 산업적으로 유용하게 사용할 수 있는 미생물 가운데 대표적인 *Thermus* sp.의 계통정보가 공개되어 유용한 유전자 자원으로서의 그 가치가 더욱 높아졌다(3, 4). 그러나 내열성 효소를 이용한 기능성 탄수화물, 특히 인산당중에 F6P의 대량 생전환에 관한 보고는 아직까지 알려진 바가 거의 없다.

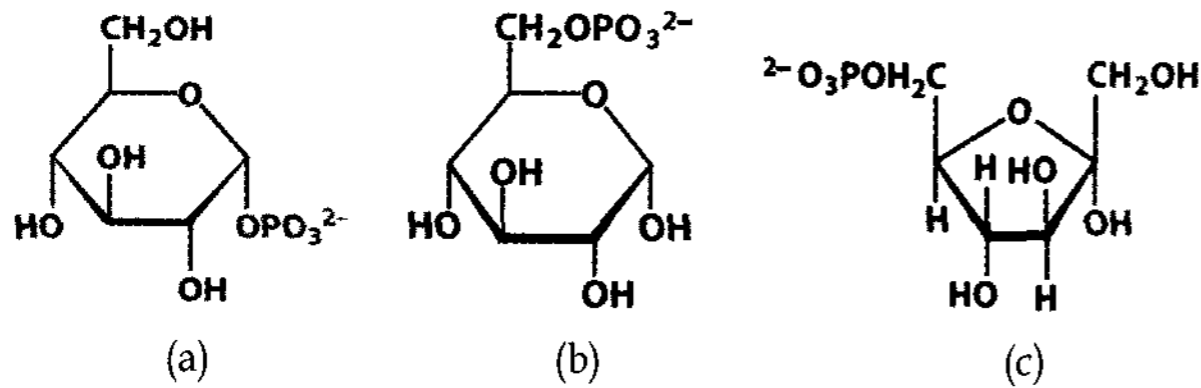


Figure 1. Chemical structure of three phosphosugars ((a) Glucose 1-phosphate (G1P), (b) Glucose 6-phosphate (G6P), (c) Fructose 6-phosphate (F6P)).

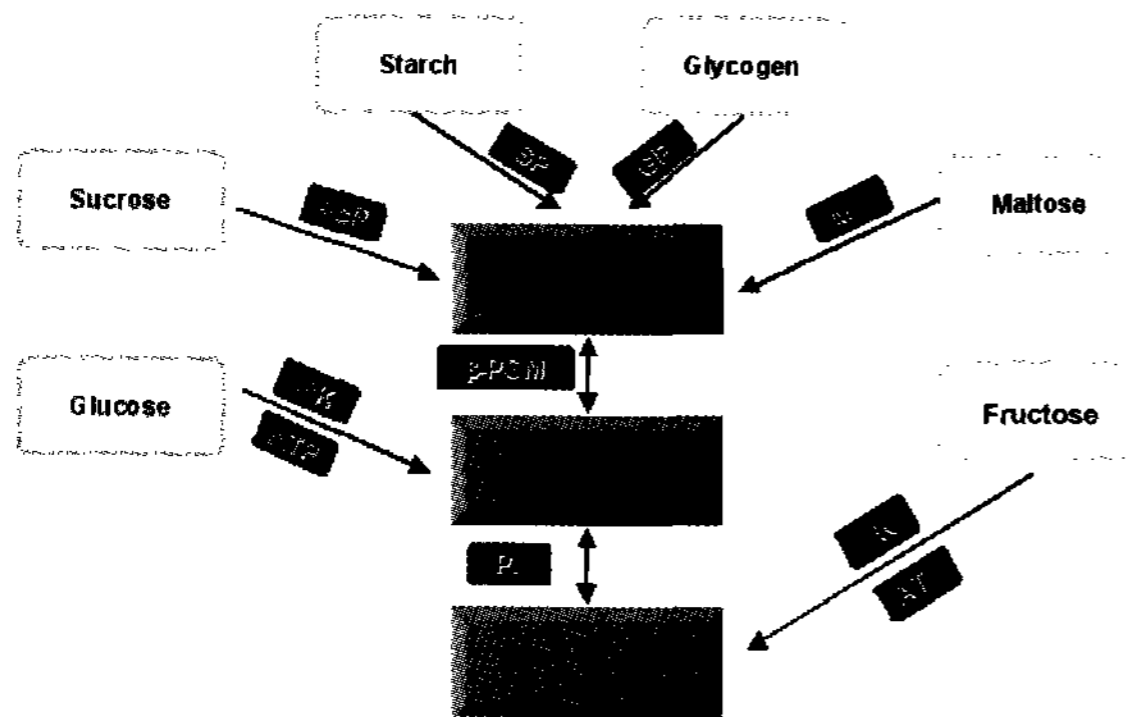


Figure 2. Possible pathways for the enzymatic production of F6P from readily available substrates (MP: maltose phosphorylase, HK: hexokinase, G6P: glucose 6-phosphate, PI: phosphoglucose isomerase, SP: starch phosphorylase, GP: glycogen phosphorylase, ScP: sucrose phosphorylase,  $\beta$ -PGM:  $\beta$ -phosphoglucose mutase, FK: fructose kinase, ATP: adenosin triphosphate).

인산당의 생전환에 관한 연구로서 주목할 만한 것으로는 1-인산포도당 (glucose 1-phosphate, G1P)의 생전환 연구가 있다. 우선 효소를 이용한 G1P의 생산에는 설탕(sucrose)으로부터 과당 (fructose)과 G1P를 합성하는 *Leuconostoc mesenteroides* 유래의 설탕인산화효소 (sucrose phosphorylase)가 보고되어 있으며(5), 또한 알파-글루칸 ( $\alpha$ -glucan) 또는 말토덱스트린 (maltodextrin), 덱스트린 (dextrin), 전분 등과 같은 높은 중합체 당으로부터 G1P를 합성하는 글루칸 인산화효소 ( $\alpha$ -glucan-phosphorylases)가 보고되었다(6). Shigeto 등과 여러 연구자들은 전분으로부터 전분인산화효소를 이용하여 G1P를 60%까지 생전환할 수 있음을 보고하였다(7, 8). 그리고 담체에 고정화된 전분 인산화효소를 이용한 G1P의 연속 생산 공정 개발에 관한 보고도 있다(9). 한편 G6P는 G1P로부터 내부 생전환되어야 하는데 이는 설탕의 소비 및 합성에 있어서 자리옮김효소 (phosphoglucose mutases, GM)에 의해 이루어진다. 이 효소는 유전자 재조합 방법에 의하여 여러 다양한 형태의 단백질로 발현될 수 있음이 알려져 있다(10). 마지막으로 F6P를 생산하기 위해서는 G6P가 6-인산포도당이성질화효소 (phosphoglucose isomerase, GI)에 의해 전환되어야 한다. 이 효소는 바나나와 같은 식물 유래의 것도 있

으며, *Aeropyrum pernix*, *Thermoplasma acidophilum* 등과 같은 미생물 유래도 보고되어 왔다(11, 12). G1P, G6P, F6P의 화학구조는 Fig. 1에, 다양한 기질로부터 가능한 F6P의 생산 경로는 Fig. 2에 정리하여 나타내었다.

본 연구에서는 F6P생산을 위해 우선 전분으로부터 G1P로의 생전환, 그리고 G1P에서 G6P로의 내부 생전환, 다음으로 G6P로부터의 F6P로의 생전환 등 총 세 단계를 거쳤다. 각 단계마다 재조합 내열성 효소를 이용하였으며 F6P의 최적 생산을 위해 반응표면분석법 (response surface methodology, RSM)을 사용하였다.

### 재료 및 방법

#### 사용균주 및 plasmids

본 연구에 사용된 모균주 및 유전자는 한국생명공학연구원 당생물학실에서 분양받았으며, 재조합용 균주로는 *E. coli* DH5a가 plasmid 제작을 위한 균주로 사용되었으며, 유전자 조작을 위한 배양은 Luria-Bertani 배지 (LB, 10 g/L bacto-tryptone, 5 g/L yeast extract, 10 g/L NaCl)를 기본 배지로 사용하였다. 효소생산을 위한 클로닝과 발현은 Choi 등(13)의 방법을 사용하였다.

#### 배지 및 배양조건

발효조 접종용 균주의 배양은 200 ml CPGY (50 g/L glycerol, 30 g/L peptone, 5 g/L yeast extract, 3 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 7 g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 3 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 5 g/L glutamic acid, 1 g/L  $\text{MgSO}_4$ , 1 g/L citric acid) 배지를 사용하여 37°C에서 150 rpm으로 24시간 진탕배양 하였다. 회분배양은 5 N HCl에 용해된 trace metal (10 g/L  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2 g/L  $\text{CaCl}_2$ , 1.5 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.5 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2.2 g/L  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.5 g/L  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 1 g/L  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.1 g/L  $(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.02 g/L  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ) 용액을 1 ml/L로 첨가한 CPGY 배지를 사용하였으며, 유가배양을 위한 첨가 배지는 500 g/L glycerol, 200 g/L yeast extract, 1.5 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.5 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 사용하였다. 회분 및 유가배양은 5 L 발효조 (KoBiotech Co. Korea)를 사용하였으며, 본 배양 배지 2.3 L에 전 배양 배지 0.2 L를 더하여 2.5 L의 working volume으로 가동하였다. 가동 조건은 37°C, 통기량 0.5 vvm이며, 용존산소는 교반속도를 변환시켜 최소 10%를 유지하였다. 배양 pH는 28% 암모니아수를 첨가하여 6.8로 고정하였다.

#### 단백질 정량

세포 파쇄 후 부분 정제된 효소액의 단백질량은 BCA protein assay kit (Pierce Biotechnology, Inc., USA)를 이용해 UV-spectrophotometer (Ultraspec 3100pro: Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)로 측정하였다. 표준물질로는 kit 내 포함된 bovine serum albumin (BSA)을 사용해 미리 구한 검량선을 이용하여 시료의 단백질 농도를 구하였다.

#### 분석시료 준비 및 SDS-PAGE

배양액으로부터 회수된 세포를 Eppendorf tube에 약 0.1 g을

모은 후, glass bead 약 0.2 g과 50 mM potassium phosphate buffer 500  $\mu$ L를 첨가시키고 vortexing하여 세포를 파쇄하였다. 2 min 간 Vortexing 후, 얼음물에 1 min 담그는 과정을 3회 반복하였다. Vortexing 완료 후 tube를 100°C의 끓는 물에서 20 min 동안 열처리하여 단백질을 변성시키고, 이를 원심분리로 제거하고 그 상층액을 분석용 효소 시료로 사용하였다. SDS-PAGE 분석은 12% acrylamide gel을 이용해 단백질 농도가 30  $\mu$ g이 되도록 각각의 시료를 로딩하였으며, 전기영동 밴드는 Coomassie staining으로 확인하였다.

### 효소활성 측정

본 실험에 사용된 세 종류의 내열성 효소의 활성은 pulsed amperometric detector가 장착된 고성능 음이온교환수지 액체크로마토그래프 (high performance anion exchange chromatography, HPAEC 혹은 Bio-LC, Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 측정하였다. 분석에 사용된 컬럼은 CarboPac PA1 (4 mm  $\times$  250 mm)로서 조업조건은 Bae와 Shin 등의 방법과 동일하였다(14, 15).

$\alpha$ -Glucan phosphorylase (GP)는 1 M potassium phosphate buffer (pH 7.0)에 용해성 전분을 5% 농도로 녹인 것 1 mL에 효소액 50  $\mu$ L를 첨가하여 70°C에서 30 min간 반응하였다. Heat shock으로 반응을 중지시키고 냉각시킨 후, 원심분리하여 증류수를 이용하여 100배 희석한 시료를 Bio-LC를 이용하여 분석하였다. 효소의 활성단위는 상기 반응조건에서 분당 생성되는 1  $\mu$ mol의 G1P를 1 unit로 정의하였다. Phosphoglucosmutase (GM)의 경우는 10 mM G1P 100  $\mu$ L, 1 M MgCl<sub>2</sub> 2  $\mu$ L, 증류수 800  $\mu$ L, 효소용액 50  $\mu$ L가 포함된 혼합물을 GP 반응조건과 동일하게 반응시켰다. 효소의 활성단위는 상기 반응조건에서 분당 생성되는 1  $\mu$ mol의 G6P를 1 unit로 정의하였다. Phosphoglucose isomerase (GI)의 경우는 10 mM G6P 100  $\mu$ L, 1 M MgCl<sub>2</sub> 2  $\mu$ L, 증류수 800  $\mu$ L, 효소용액 50  $\mu$ L가 포함된 혼합물을 GP 반응조건과 동일하게 반응시켰다. 효소의 활성단위는 상기 반응조건에서 분당 생성되는 1  $\mu$ mol의 F6P를 1 unit로 정의하였다.

### 균체 농도 분석

균체 농도는 UV spectrophotometer (Ultraspec 3100pro: Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)를 사용하여 600 nm에서 흡광도와 건조 균체량으로 결정하였다.

### G1P의 분리정제

생성된 1-인산포도당 (G1P)은 이온교환수지 컬럼법 및 결정화법을 이용하여 분리, 정제하였다. 전분으로부터 제조된 초기 반응물은 전분, 인산완충용액, 단백질 등 기타 불순물들을 포함하고 있다. 이를 강산성 양이온 교환수지와 약염기성 음이온 교환수지 컬럼에 순차적으로 적용하여 일체 정제하였다. 강산성 양이온 교환수지 컬럼은 4% HCl로 수세 및 전처리하였고, 초순수를 이용하여 용출시켰으며, G1P가 포함된 분획을 모았다. 이어 약염기 음이온교환수지 컬럼에 로딩시킨 후 4% 암모니아수로 용출시켜 G1P 분획을 회수하였다. 결정화시킨 후 1-인산 포도당의 수율은 80% 이상, 순도는 95% 이상이었다.

## 결과 및 고찰

### 효소액의 제조

*Thermus* sp. 균주에서 유래한 G1P유전자를 이식한 대장균의 대량발효를 위해 5 L fermenter에서 working volume 2 L, 700 rpm, 공기유량 1 vvm, 배양온도 37°C, 접종량 10%로 하여 배양을 실시하였다. Batch culture를 시행하였을 경우 최고 세포량이 O.D. 14에 머물렀으나 fed-batch culture를 시행한 경우 최고 세포량이 O.D. 45까지 증가함을 알 수가 있었다(data not shown). 이 때  $\alpha$ -glucan phosphorylase (GP) 효소를 생산하기 위해 첨가되는 IPTG의 농도는 5 mM이었다. 또한, 본 연구에서 사용되는 더머스 칼도필러스 (*Thermus caldophilus*) 유래의 재조합 효소인 인산포도당 자리옮김효소 (phosphoglucosmutase, GM)와 인산포도당 이성질화효소 (phosphoglucose isomerase, GI) 역시 위와 같은 방법으로 대량 배양시에 유사한 결과를 얻을 수 있었다(data not shown).

Table 1. Production of G1P from soluble starch

Enzyme Dose (U/g-starch)	G1P concentration (mM)			
	1 h	4 h	8 h	72 h
13	-	20	60	141.6
25	45.1	91.7	100	152.2
50	55.5	95	109.8	158.7

### 전분으로부터 1-인산포도당의 제조

G1P는 용해성 전분으로부터  $\alpha$ -glucan phosphorylase에 의해 용이하게 생전환된다. *Thermus* sp. 유래의 재조합  $\alpha$ -glucan phosphorylase은 고온 (70°C 이상)에서 반응이 원활하게 이루어지므로 전분의 용해도를 증가시킬 수 있어 고농도의 기질반응이 가능한 장점이 있다. 5% 용해성 전분과 1 M potassium phosphate buffer (pH 7.0)와 함께 70°C에서 효소 13 U/g-전분을 첨가함으로써 반응이 시작되었으며, 72 h 경과 후 141.6 mM G1P가 생성되었다(Table 1). 반면 산업용 불용성 전분으로 반응을 할 경우 용해도 제한으로 인해 고농도의 전분을 기질로 이용할 수 없었다. 즉 2% 불용성 전분과 300 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)와 함께 70°C에서 효소 37 U/g-전분으로 반응이 이루어질 경우 15.3 mM의 G1P를 얻을 수 있었다. 불용성 전분의 농도별 G1P의 생성량을 Table 2에 나타내었다. 기질 농도가 높아질수록 G1P의 생산량은 증가하였다(Table 2). 한편 전환수율을 고려하면 저농도에서의 반응이 효율적이거나 전분 가격대비 G1P의 가격을 고려하면 5-10 g/L 범위 내에서 사용하는 것이 유리하리라 판단된다.

Table 2. Production of G1P from insoluble starch

Starch concentration (g/L)	G1P concentration (g/L)	Productivity (Ys/g)*
1	0.5(0.2)	0.17
5	10(3.3)	0.67
10	10.8(3.6)	0.36
20	15.3(5.1)	0.26

300 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) was used.

\*Ys/g = G1P concentration (g/L)/starch concentration (g/L)

**전분으로부터 1-인산포도당의 대량 생산**

G1P의 대량생산을 위해 500 L 반응기에서 200 L의 working volume으로 조업을 수행하였다. 200 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)에 1.2% 용해성 전분을 녹인 용액을 기질로 이용하여 α-glucan phosphorylase에 의한 70℃에서 16시간 반응 결과 생산된 G1P는 1,253 g으로 대략 초기전분 양의 50%가 전환되었다. 이 G1P를 분리 정제하여 F6P 생산을 위한 초기 기질로서 사용하였다.

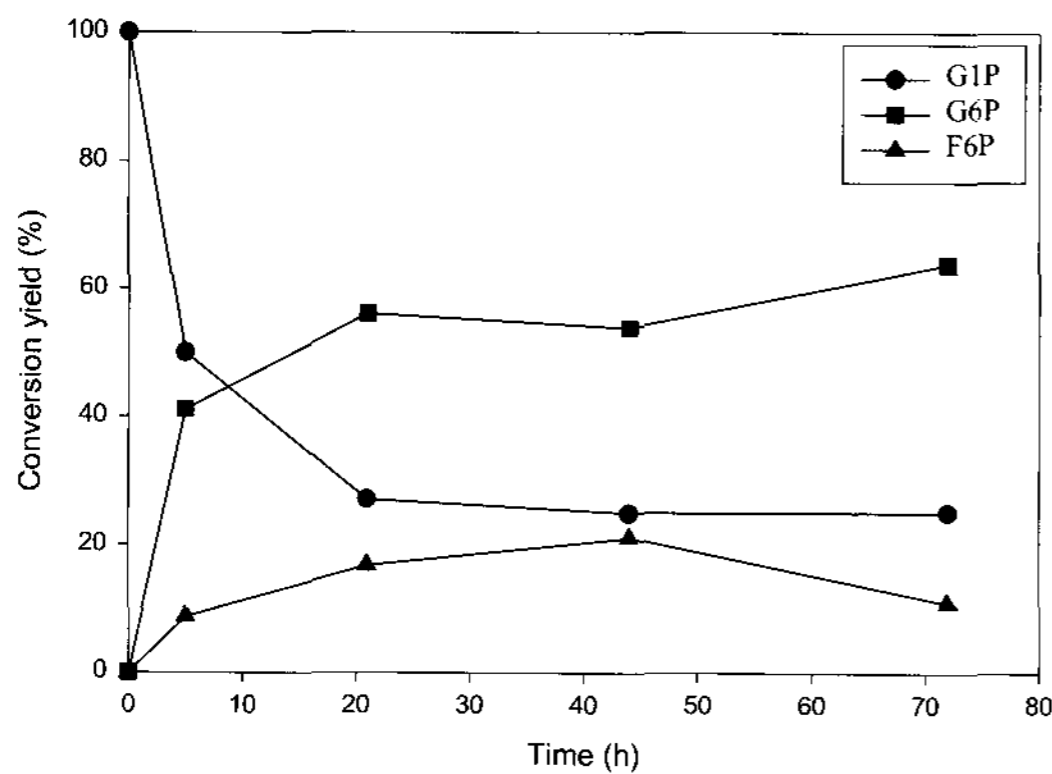
**Table 3.** Effect of (a) starch and (b) buffer concentration of G1P, G6P and F6P production

Concentration (g/L)		Conversion yield (%)		
	G1P	G6P	F6P	
0.1	8.3	81.9	9.8	
0.5	7.9	81.4	10.7	
1.0	8.9	82.3	8.8	
5.0	10.6	82.7	6.7	

Concentration (mM)		Conversion yield (%)		
	G1P	G6P	F6P	
5	8.1	77.8	14.1	
10	9.0	82.0	9.0	
25	19.9	71.5	8.6	
30	26	74	nd	

G1P 4 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, GM : GI = 1 : 1, 1 ml vol, 70 °C, 21 h reaction



**Figure 3.** SDS-PAGE of three enzymes (M: molecular weight marker, A: α-glucan phosphorylase, B: phosphoglucan mutase, C: phosphoglucan isomerase).

**1-인산포도당으로부터 6-인산과당의 제조**

본 실험에서 사용된 효소는 *Thermus sp.* 유래의 단일 분자량 61 kDa의 재조합 자리옮김효소 (phosphoglucosmutase (GM), EC 5.4.2.2.)와 46 kDa의 이성질화효소 (phosphoglucose isomerase (GI), EC 5.3.1.9.)이다. 실험에 사용된 세 가지 효소의 전기영동 및 분자량 확인 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 이 효소들은 *Thermus sp.* 유래의 재조합 효소로써 반응 온도 뿐만 아니라 여러 반응 조건들이 동일하여 한 단계에 두 효소를 동시에 첨가하여 반응을 실시할 수 있다. 반응기에 25 g/l G1P, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, GM 효소 0.05 U, GI 효소 0.05 U를 투입하고 70℃에서 72시간 동안 정치 또는 약하게 진탕상태

에서 반응시켰다. 그 결과 44 h에 최대 F6P생산은 21%를 기록했으며, 시간이 지남에 따라 F6P의 양이 줄고 G6P양이 증가됨이 관찰되었다(Fig. 4).

**Table 4.** Optimization of F6P production using response surface methodology((a) predicted and experimental results and (b) result of ANOVA analysis)

Rows	Enzyme ratio	Temp. (°C)	pH	F6P yield (g/L)	F6P predicted (g/L)
1	1:2	70	5	1.65	1.60
2	1:2	70	9	0.14	0.08
3	1:2	50	7	1.17	1.48
4	1.5:1.5	70	7	1.23	1.21
5	1:2	30	9	0.13	0.05
6	2:1	30	9	0.15	0.17
7	1.5:1.5	50	7	1.38	1.25
8	2:1	70	9	0.31	0.41
9	2:1	70	5	1.92	1.95
10	1.5:1.5	50	7	1.43	1.25
11	2:1	30	5	0.11	0.12
12	1.5:1.5	50	5	0.92	1.07
13	2:1	50	7	1.88	1.72
14	1.5:1.5	30	7	0.11	0.28
15	1:2	30	5	0.11	-0.03
16	1.5:1.5	50	9	0.32	0.33

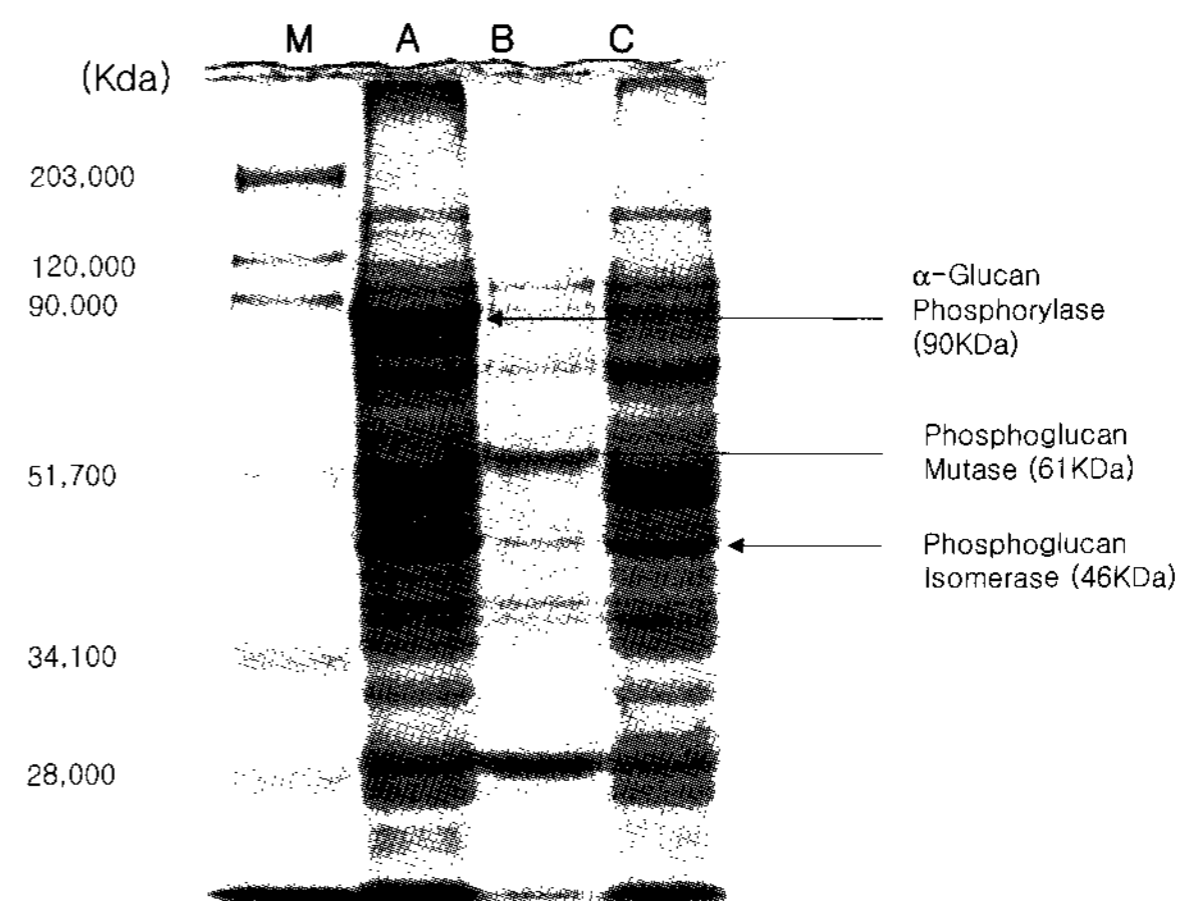
- 20 mM (6.6 g/L) G1P: 500 ul (10 mM), 1 M MgCl<sub>2</sub>: 2 ul (2 mM), 200 mM buffer (pH 5,7,9): 100 ml

- enzyme: GM : GI = 2 (0.1 U) : 1 (0.05 U), 1.5 (0.075 U) : 1.5 (0.075 U), 1 (0.05 U) : 2 (0.1 U) (total 150 ml, 0.15 U), D.W. 350 ml, 30-70°C, 24 h

(b) ANOVA Analysis

Source	Model	Error	Corrected total
Sum of squares	7.163	0.265	7.428
Degree of freedom	9	6	15
Mean square	0.796	0.044	
F-value	18.037		
Prob>F	0.001		

Optimized value; Enzyme ratio: GM : GI = 1 : 1.23, Temperature: 63.5 °C, pH: 6.85, the F6P yield: 30%



**Figure 4.** Time course of F6P production from G1P (Reaction conditions are as follows; reaction volume: 1 L, G1P: 25 g/L, MgCl<sub>2</sub>: 3 mM, GM : GI = 1 : 1 (total 260 U)).

이때 상기 반응조건 아래에서 F6P 생산에 있어서 전분의 농도와 완충액의 농도가 F6P의 생산에 저해효과를 나타내는 것이 관찰되었다. 다음으로 4 mM G1P (1.32 g/L)와 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 저해제를 농도별로 첨가하고 두 가지 효소를 모두 첨가한 반응물을 70°C에서 21 h 동안 반응을 수행하였다. F6P 생산을 하는데 있어 반응 저해물질들 즉 starch와 phosphate buffer의 영향을 조사해본 결과 Table 3과 같다. 실험결과 전분과 phosphate는 최종산물 F6P를 생산하는데 모두 저해 작용을 하고 있음을 볼 수 있다. 따라서 전분으로부터 F6P 생산을 위한 효소들의 동시 반응보다는 우선 G1P를 합성하고 이로부터 F6P를 생산하는 2단계 반응을 수행하는 것이 합리적이라 판단된다.

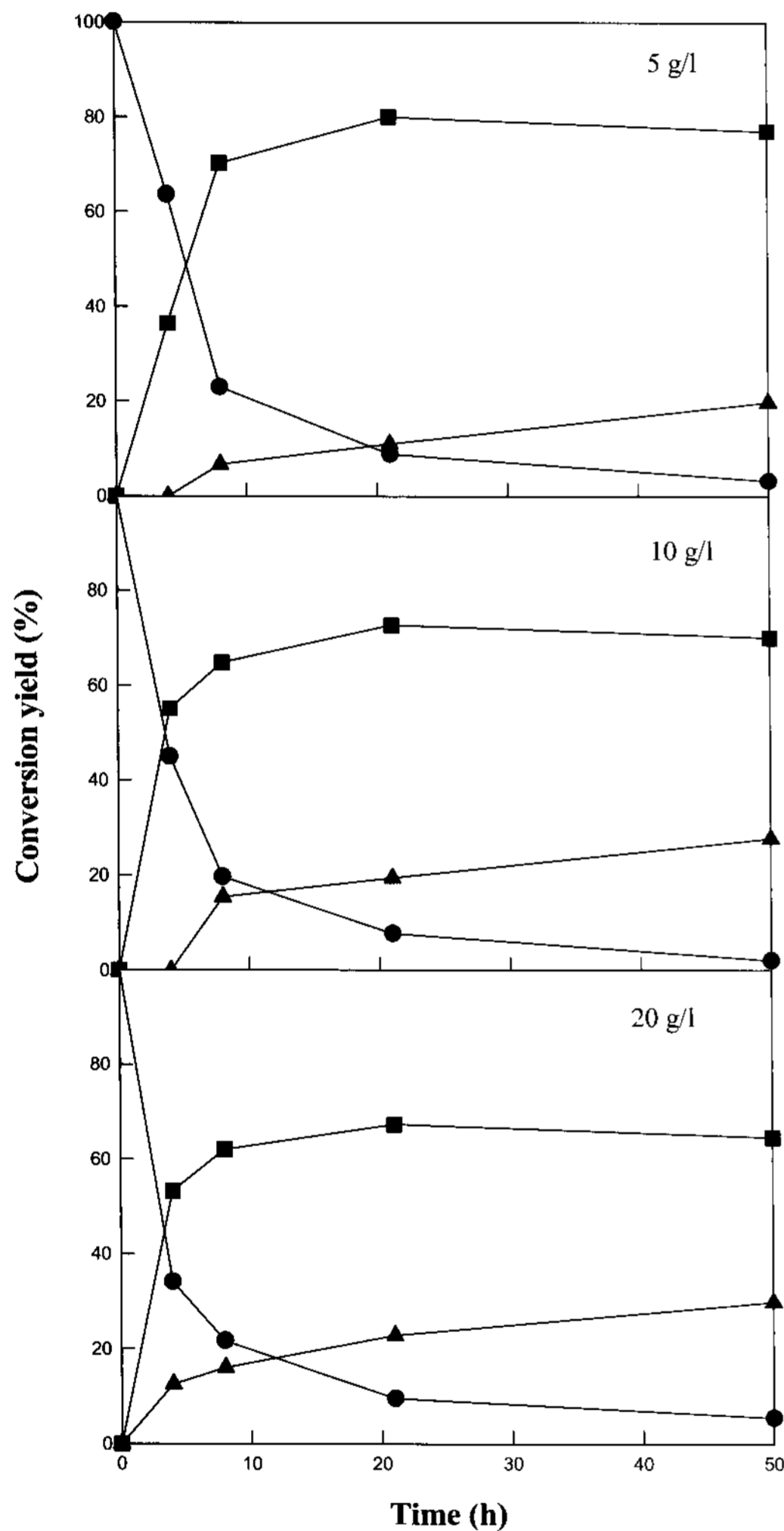


Figure 5. Time course of F6P production at the optimum conditions with different concentrations of G1P.

**반응표면분석법을 통한 F6P 생산 최적화**

F6P의 생산에 있어 보다 효율적인 반응 조건을 조사하기 위해 통계적 기법인 response surface method (RSM)를 사용하였다. 반응물은 10 mM G1P, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM potassium phosphate buffer를 이용하고, 반응조건 변수로는 온도, pH, enzyme ratio를 선정하였으며 최종 산물인 F6P의 생산량을 목적함수로 평가하여 Table 4와 같은 결과가 도

출되었다. 본 연구결과에서 보는 바와 같이 실험적 결과와 이론적 추정치 사이의 상관관계는 R값이 0.96, R<sup>2</sup>값이 0.91로 실험값과 이론값이 일치함을 알 수 있었다. 본 반응표면분석 (response surface analysis) 결과에 따르면 효소의 비율은 GM : GI = 1 : 1.23, 온도 63.5°C, pH 6.85로서 이 조건에서 30%의 F6P 수율을 보여 최적 반응조건으로 결정되었다. 이 조건을 기본으로 하여 전분의 농도를 증가시키면서 최적화 실험을 수행하여 그 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 이 결과를 살펴보면 10-20 g/L의 전분농도에서 30% 이상의 F6P 전환수율을 나타낸 것을 알 수 있다. 그러나 전분의 농도가 증가함에 따라 F6P의 최고수율에 도달하는 시간이 길어짐을 확인할 수 있다. 즉, 초기 실험과는 달리 최적화된 상태에서는 전분에 의해 저해효과가 상당히 상쇄됨을 알 수 있었다. 생산된 6-인산과당은 재료 및 방법에서 언급된 컬럼을 이용한 분리방법과 결정화법을 사용하여 수율 50% 이상, 순도 95% 이상의 순수한 형태로 정제될 수 있었다.

**요 약**

인산당은 모든 유기체에서 발견되며 무척 다양한 유용성을 지니고 있다. 특히 glucose 1-phosphate (G1P), glucose 6-phosphate (G6P), fructose 6-phosphate (F6P) 등은 해당과정, 당합성과정, 5탄당 인산화과정 및 캘빈회로와 같은 탄수화물 대사와 에너지 생산 대사의 주요한 핵심 중간물질이다. 특히 해당과정에서 F6P는 G6P의 이성질화반응에 의하여 생성된다. F6P의 대량생산은 전분을 이용하는 것이 가능한데, 우선 전분에 인산화효소를 가하여 G1P를 얻고, 이 G1P를 자리옮김효소 (phosphoglucomutase, GM)와 이성질화효소 (phosphoglucoisomerase, GI)를 순차적으로 적용하여 G6P와 F6P를 생산하게 된다. 효소반응의 경우 전분의 용해도 증가, 반응속도의 향상 및 미생물의 오염방지 등을 위하여 중온성 효소보다는 고온성 효소 혹은 내열성 효소가 선호된다. 본 연구는 세 가지 내열성 효소를 이용하여 전분으로부터 두 단계반응으로 F6P를 생산하는 것에 관한 것이다. 실험에 사용된 효소는 대장균에서 발현된 재조합 효소로서, 효소의 생산은 유가식 배양을 이용하였다. 1.2% 가용성 전분 200 L를 이용하여 1,253 g의 순수한 G1P를 생산하였으며 이를 이용하여 최종적으로 30% 수율로 F6P를 생산할 수 있었다. 최대수율을 얻기 위하여 반응표면분석법을 이용하여 GM : GI = 1 : 1.23, 63.5°C, pH 6.85의 조건이 도출되었으며, 이 조건하에서 실험을 통하여 20 g/L의 전분을 이용하여 30% 수율로 F6P가 생성됨을 확인할 수 있었다.

**감 사**

이 논문은 2007년 조선대학교 “전통식품 첨단화 인력양성 사업단 (NURI)” 인력양성사업의 일부 연구비 지원에 의해 수행된 결과이며, 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

1. Berg, J., J. Tymoczko, and L. Stryer (2002), Biochemistry, 5th ed., W.H. Freeman and Company, New York.
2. Matti, S., European Patent 0506772 (WO 9109604) (1991), A pharmaceutical composition comprising a phosphosugar.
3. GenBank AE 017221 (*Thermus thermophilus* HB27)
4. GenBank AP 008226 (*Thermus thermophilus* HB8)
5. Koga, T., K. Nakamura, Y. Shirokane, K. Mizusawa, S. Kitao, and M. Kikuchi (1991), Purification and some properties of sucrose phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides*, *Agric. Biol. Chem.* **55**, 1805-1810.
6. Shin, H. J., Y. Shin, and D. S. Lee (2000), Formation of  $\alpha$ -D-glucose-1-phosphate by thermophilic  $\alpha$ -1,4-D-glucan phosphorylase, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 89-93.
7. Shigeto, K., K. Takashi, S. Masaru, I. Takashi, T. Masanobu, K. Tomihiro, European Patent 0305981A2 (JP1063589) (1989), Process for preparing glucose-1-phosphate.
8. Akademia, M. T. and K. T. Osztyalya (1971), Recent developments in the chemistry of natural carbon compounds, Springer, Berlin.
9. Venkaiah B. and A. Kumar (1994), Egg shell bound starch phosphorylase packed bed reactor for the continuous production of glucose 1-phosphate, *J. Biotechnol.* **36**, 11-17.
10. Manjunath, S., C. H. K. Lee, P. V. Winkle, and J. Bailey-Serres (1998), Molecular and biochemical characterization of cytosolic phosphoglucomutase in maize: expression during development and in response to oxygen deprivation, *Plant Physiol.* **117**, 997-1006.
11. Cordenunsi, B. R., J. R. O. do Nascimento, R. V. da Mota, and F. M. Lajolo (2001), Phosphoglucose isomerase from banana: partial characterization and relation to main changes in carbohydrate composition during ripening, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**, 2174-2180.
12. Hansen, T., D. Wendorff, and P. Schonheit (2004), Bifunctional phosphoglucose/phosphomannose isomerase from the Archaea *Aeropyrum pernix* and *Thermoplasma acidophilum* constitute a novel enzyme family within the phosphoglucose isomerase superfamily, *J. Biologic. Chem.* **279**, 2262-2272.
13. Choi, J. Y., W. S. Cha, and H. J. Shin (2006), Production of recombinant trehalose synthase from *Thermus caldophilus* GK24, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **21**, 298-301.
14. Bae, J, D. H. Lee, D. Kim, S. J. Cho, J. E. Park, S. Koh, J. Kim, B. H. Park, Y. Choi, H. J. Shin, S. I. Hong, and D. S. Lee (2005), Facile synthesis of glucose-1-phosphate from starch by *Thermus caldophilus* GK24  $\alpha$ -glucan phosphorylase, *Process Biochem.* **40**, 3707-3713.
15. Shin, H. J., Y. Shin, and D. S. Lee (1999), Analysis of low-level  $\alpha$ -D-glucose-1-phosphate in thermophilic enzyme reaction mixture using high pH anion-exchange chromatography, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **14**, 384-388.