

정 정 공 고

한국식품과학회지 제27권 제1호, 80~85쪽(1995)에 발표된 김현구, 김영언, 도정룡, 이영철, 이부용 회원의 논문 “국내산 생약추출물의 항산화 효과 및 생리활성”중 83쪽 Fig. 2를 아래와 같이 정정함.

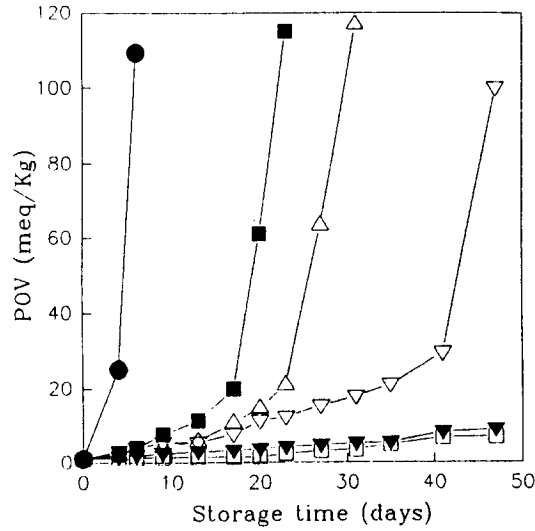


Fig. 2. Changes of the peroxide values of the substrates subjected to autoxidation during the storage

- ; Control
- ▽; BHA (200 ppm)
- ▼; Ethyl acetate extract (1000 ppm)
- ; Acetone extract (1000 ppm)
- ; Methylene chloride extract (1000 ppm)
- △; Chloroform extract (1000 ppm)

A. oryzae와 K. fragilis 유래의 β -Galactosidase 혼합처리에 의한 전이 Galactooligo당의 생성에 관한 연구

문지용·허경택*·이수원**·이재영**

서울우유협동조합 기술연구소, *상지대학 축산학과, **성균관대학교 낙농학과

A Study on the Galactooligosaccharides Produced from Transgalactosylation with β -Galactosidase of *Aspergillus* and *Kluyveromyces*

Ji Woong Moon, Kyeong Tak Huh, Su Won Lee and Jai Young Lee

Seoul Dairy Co-op. Institute of Dairy Food Research

*Department of Livestock, Sangji College

**Department of Dairy Science, Sungkyunkwan University

Abstract

These studies examined the production of oligosaccharides by β -galactosidases originated from *Aspergillus oryzae* and *Kluyveromyces fragilis* mixed. In addition, heat resistance and acid stability of transgalactosylated oligosaccharides were measured. When β -galactosidases from *A. oryzae*, *K. fragilis* and mixed β -galactosidases were added to 30%(w/v) lactose solution, maximum production of transgalactosylated oligosaccharides were 26.9%, 37.05 and 27.2%, respectively. The ratios of disacchride, trisacchride and tetrasaccharide in transgalactosylated oligosaccharides were 20.5 : 5.4 : 0.6, 20.4 : 10.5 : 4.2 and 21.0 : 4.1 : 1.9, respectively. Nine different oligosaccharides were recovered with 30% and 40% ethanol fractions. When the 30% ethanol fraction was treated at 150°C for 10 min more than 90% of oligosaccharides remained stable. More than 90% of the oligosaccharides were stable at 130°C for 3 min with pH 3.0, whereas there of *Kluyveromyces* was more than 90% with pH 3.5.

Key words: β -galactosidases, transgalactosylated oligosaccharides

서 론

β -Galactosidase(β -D-galactoside galactohydrolase, EC 3.2.1.23)는 수용액 상태에서 유당을 glucose와 galactose로 가수분해시킴과 동시에 당전이력에 의하여 galactosyl잔기를 다른 당 또는 알콜에 결합시키는 전이반응을 촉진하여 전이oligo당을 생성시킨다⁽¹⁾. 이러한 lactose 가수분해물 중에는 모유와 같은 oligosaccharides가 존재하며⁽²⁾ 가수분해시 β -1-4와 β -1-6의 glycosidic linkage의 allolactose의 생성이 확인되었으며, lactose로부터 lactose isomer가 β -galactosidase의 서로 다른 site에 결합되어 β -1-3, β -1-4 및 β -1-6 등의 galactosyllactose가 생성된다는 oligo당 생성 mechanism에 대한 이론은 널리 알려져 왔다⁽³⁻⁶⁾.

이러한 전이반응 이론에 대한 연구에 있어서 β -galactosidase의 origin과 activity는 transgalactosylated reaction에 관여하여⁽⁷⁾ lactose 가수분해시 저해작용을 하는

galactose가 당전이반응에서는 oligo당 쪽으로 전이되므로 2당류 이상의 oligo당 생성을 증가시킨다는 연구결과^(8,9)가 있었으며 Roberts와 Petinatti⁽¹⁰⁾는 *Saccharomyces fragilis* 유래의 β -galactosidase로 35%의 유당용액에서 95%의 가수분해율과 44.6%의 oligo당의 최대 생성을 확인하였으며 Prenosil 등⁽¹¹⁾은 *Aspergillus oryzae* 유래의 β -galactosidase를 사용하여 2당류와 3당류의 oligo당 생성을 6개까지 분리 동정하였으며, Nilsson⁽¹²⁾은 5.5% lactose를 함유한 UF(ultra-filtration) whey permeate에 *A. oryzae* 유래의 β -galactosidase 처리로 45%의 유당분해와 8%의 oligo당 생성을 확인하였다고 보고하였다.

또한 Deya 등⁽¹³⁾은 *A. oryzae* 유래의 β -galactosidase로부터 생성된 2당류의 galactosyllactose를 유아분유에 첨가하여 장내 bifidus균을 증식시키는 생리적 효과를 얻었다고 보고하였으며, Toba 등⁽¹⁴⁾도 *A. oryzae* 유래의 β -galactosidase에 의한 유당가수분해물로부터 20개 이상의 2당류를 확인한 바 있으며 이들은 생리적 기능을 갖는 oligo당이라고 보고하였다.

이 연구에서는 *A. oryzae*와 *K. fragilis* 유래의 β -galactosidase를 단독 또는 혼합사용하여 생성되는 galactooligo당의 구성과 최적조건 하에서의 최대생성량 및 생

Corresponding author: Ji Woong Moon, Seoul Dairy Co-op. Institute of Dairy Food Research, 1059 Singildong Ansan Si, Kyunggi-do, 425-120, Korea

성된 전이oligo당의 특성(내열 및 내산성)을 검토하였다.

재료 및 방법

Lactose

유당은 Difco Laboratories(U.S.A)의 분말 α -lactose로서 순도 99.89%, 수분 0.02%, ash 0.03%, pH 3.49, color 6.6, sediment disk 0.07의 순수정제된 제품이었으며 PC(paper chromatography)에 의하여 lactose 이외의 물질이 함유되어 있지 않음을 확인하였다.

β -Galactosidase

2종류의 유당분해효소는 효모류의 *K. fragilis* 유래의 Lactozym 3000L HP-G(Novo Ind., Denmark)와 곰팡이류의 *A. oryzae* 유래의 Sumylact L(Sumitomo Chemical Co., Japan)이었다. 효소의 특성으로 Lactozym 3000L HP-G(Lactozym)는 lactose를 기질로 하는 효소농도가 4.75%(w/v)이었으며 최적 pH 6.5~7.0, 반응온도 37~40 $^{\circ}$ C로서 1분간에 1 μ mole의 glucose를 유리시키는 효소의 양을 1 LAU(Lactozym activity unit)로 하였다. Sumylact L(Sumylact)은 ONPG(O-nitrophenylgalactopyranoside)를 기질로 하는 효소농도 0.15%(w/v)이었으며 최적 pH 6.0~6.5, 반응온도 35~37 $^{\circ}$ C로서 1분간에 1 μ mole의 ONP(O-nitrophenol)을 유리시키는 효소의 활성을 1 unit로 하였다.

Sumylact oligosaccharides(SOS)의 조제

Lactose 4.5g과 Sumylact 600 unit 및 McIlvaine buffer(pH 6.0)를 함유하는 전량 15 ml의 lactose solution(30%, w/v)을 만든 후 37 $^{\circ}$ C의 rotary agitating 항온수조(50 rpm)에서 6시간동안 반응시킨 후 미생물의 발육을 억제하기 위하여 toluene액을 한방울 첨가하였다.

시료의 채취는 매 30분 간격으로 반응미생물 분석용 시료로 1 ml를 test tube에 채취하였으며 미생물시험용 시료는 동일조건 하에서의 galactooligosaccharides(GOS)의 최대생성시간대를 확인한 후 반응액 전량을 회수하였다. 또한 효소의 반응을 정지시키기 위하여 100 $^{\circ}$ C 비등수욕조에 약 15분간 가열하여 효소의 활성을 완전히 정지시켰다.

Lactozym oligosaccharides(LOS)의 조제

Lactose 4.5g과 Lactozym 660 LAU 및 McIlvaine buffer(pH 6.5)를 함유하는 전량 15 ml의 lactose solution(30%, w/v)을 37 $^{\circ}$ C에서 6시간동안 가수분해시켰다. 시료의 채취 및 효소의 반응정지는 SOS의 조제와 동일하였다.

Sumylact와 Lactozym oligosaccharides(SLOS)의 조제

Lactose 7.5g에 McIlvaine buffer(pH 6.0) 10 ml를 첨가하여 용해시킨 후 Sumylact 600 unit를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C의 rotary agitating 항온수조(50 rpm)에서 2시간동안

반응시킨 후 다시 Lactozym 660 LAU를 첨가하여 계속적으로 4시간동안 반응시켰다. 시료의 채취는 SOS와 LOS의 조제와 동일하였다.

Paper chromatography(PC)방법에 의한 oligo당의 생성 확인

PC에 사용되는 여지는 Whatman 1 Chr.(46 \times 57 cm)를 사용하였으며 10%(w/v)로 희석한 당용액을 모세유리관을 사용하여 횡축으로 3 cm 간격으로 여지위에 4~5회 정도 하단에서부터 3 cm되는 지점에 당액을 점적(spot)한 후 n-butanol : pyridine : H₂O를 6 : 4 : 3으로 한 전개용매에 여지의 하단이 약 1 cm 정도 잠기도록 한 후 4중 전개 상승법으로 실시하였다. 전개방법은 여지의 하단이 약 1 cm 정도 전개조 내에 잠기도록 한 후 실온에서 22 시간동안 전개시켰으며 매번 전개가 완료된 때에는 2시간동안 자연건조로 여지를 건조시켰다. PC의 발색은 鈴木과 中村의 방법⁽¹⁵⁾에 준하여 실시하였으며 각 시료의 PC에 나타난 oligo당의 경시적 변화는 각 spot의 galactose에 대한 상대이동도 R_{rel} 로 나타내었다.

Gas chromatography에 의한 구성당의 분석

채취된 시료 중 1.0 ml를 vial tube에 넣고 6시간 이상 동결건조시켜 당 1.0 mg에 pyridine 50 μ l, HMDS(hexamethyldisilazine) 25 μ l 및 TFA(trifluoro-acetic acid) 5 μ l를 순차적으로 가하여 40 $^{\circ}$ C의 항온기에서 30분간 가온하여 TMS(trimethylsilyl)화 유도체를 조제하였다.

TMS처리한 구성당의 분석조건은 다음과 같다.

GC: Hewlett Packard 5890 Series II

Detector: FID

Column: OV-17(1000 \times 0.53 m/m), 1.5% silicone coating

Detector temperature: 250 $^{\circ}$ C

Flow rate: 5 ml/min.

Injection volume: 1 μ l

각 구성당의 정량은 GC chromatogram에 나타난 면적비로부터 농도비를 산출하였다.

활성탄-celite chromatogram에 의한 GOS의 정제

Oligo당의 생성은 다음의 최대생성조건에서 실시하였다. Lactose 25g를 McIlvaine buffer(pH 6.5) 33 ml에 용해시킨 후 Sumylact 1920 unit 및 toluene 세 방울을 첨가하여 30 $^{\circ}$ C에서 2시간동안 반응시켰다. 계속하여 Lactozym 2160 LAU를 첨가하여 4시간동안 반응시킨 후 비등수욕조 중에서 100 $^{\circ}$ C 15분간 가열하여 효소활성을 실효시켰다. 활성탄과 celite를 2 : 1로 혼합한 용액 375 g을 증류수 1000 ml에 잘 희석하여 교반시켰다. Oligo당이 흡착된 활성탄-celite의 혼합물을 2개의 funnel(11 \times 9 cm)에 주입하여 여기에 증류수 5000 ml 및 5%, 15%, 30% 및 40% ethanol을 각각 3000 ml씩 차례로 골고루 흘리면서 활성탄-celite에 흡착되어 있는 oligo당을 용출

시켰다. 각 획분을 감압농축기로 농축시킨 후 획분에 잔류되어 있는 소량의 활성탄을 여과하여 완전히 제거한 후 획분에 함유되어 있는 염을 제거하기 위하여 이온 교환작업으로 강산성 양이온수지(Amberlite IRA-118, H⁺)와 약염기성 음이온수지(Amberlite IRA-68, OH⁻)를 상하로 충전한 column(280×18 mm)에 시료를 통과시켜 완전히 탈염시켰다.

GOS의 최대 생성량 및 구성당의 정량

PC방법에 의하여 경시적으로 GOS의 생성을 확인하여 최적조건 하에서 생성된 GOS의 반응 생성물인 SOS, LOS 및 SLOS를 Brobst와 Lott의 방법⁽¹⁶⁾ 및 Toba와 Adachi의 방법⁽¹⁷⁾에 준하여 TMS처리한 후 GC로 분석한 면적비를 농도비로 환산하여 각 시료의 최대 생성량과 구성당의 농도를 구하였다.

열 및 pH 안정성 시험

최적조건 하에서 생성된 GOS의 내열성 및 내산성 시험을 실시하였다. 시료는 SOS, LOS 및 SLOS와 활성탄-celite로 용출한 30% EtOH과 40% EtOH획분 시료로 사용하였다.

내열성 시험은 110℃, 130℃ 및 150℃의 온도에서 각 시료의 당 농도를 40 Brix로 한 후 oven에 넣고 10분간 가열하였다.

내산성 시험은 citric acid[C₃H₄(OH)(COOH)₃·H₂O; 99.5~100.5%] 용액을 조제한 후 각 시료에 pH meter (Orion Co., U.S.A.)로 pH 1.5에서 6.0까지 0.5 point씩 적정하였다. 조제된 시료를 oven에 넣고 농도별로 10분 간씩 가열한 후 급냉하였다.

또한 가열 및 산 처리한 각 시료는 TMS처리한 후

GC로 당을 분석한 후 구성당의 잔존률(%)을 면적비로 계산하여 구성당의 소실률을 산정하였다.

결과 및 고찰

Paper chromatography로 관찰한 Transgalactosylated oligosaccharides(TOS) 생성의 경시적 변화

Fig. 1은 lactose의 수용액에 *A. oryzae* 유래의 β-galactosidase를 반응시켰을 때 생성된 TOS를 PC로 나타낸 chromatogram이다. Lactose의 가수분해에 의하여 생성된 glucose와 galactose의 점적(spot) 이외에 oligo당의 spot가 반응 0.5시간대부터 나타났으며, 가수분해 반응 2.5시간대에 나타난 spot의 수는 모두 9개였다. 이들 각 spot는 4중전개 상승법에 의하여 나타난 spot이며 상대 이동도(R_{gal})는 여지에 제일 먼저 나타난 galactose spot를 기준으로 이동거리비로 구하였다.

Toba와 Adachi의 방법⁽⁹⁾에 의하여 여지에 나타난 상대이동도를 비교한 결과 R_{gal} 0.91, R_{gal} 0.83, R_{gal} 0.69와 R_{gal} 0.61은 2당류로 추정되었으며, R_{gal} 0.51, R_{gal} 0.36, R_{gal} 0.32, R_{gal} 0.22 및 R_{gal} 0.14는 3당류 이상의 oligo당으로 동정되었다⁽¹⁸⁾. 이들 oligo당의 spot는 반응초기부터 강하게 나타났으며, spot의 농도 및 면적으로 보아 반응 2.5시간을 전후하여 가장 뚜렷하게 나타났으므로 이 시간대를 최대 생성조건으로 설정하였다.

Fig. 2는 *K. fragilis* 유래의 β-galactosidase를 반응시켰을 때 생성된 TOS의 paper chromatogram이다. 반응 시작 0.5시간을 간격으로 각각의 spot에 대한 이동도를 기준으로 면적과 농도를 관찰한 결과 2.5~5.5시간대에 비교적 긴 시간동안 지속적으로 TOS가 생성된 것으로 관찰되었으며, 반응 4.5시간째가 oligo당의 최대 시간대

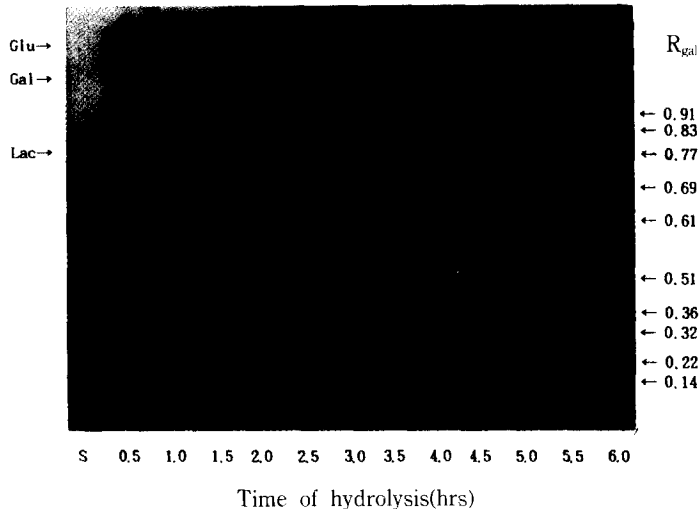


Fig. 1. Paper chromatogram of oligosaccharides formed during hydrolysis by β-galactosidase from *A. oryzae*
 Glu: glucose, Gal: Galactose, Lac: Lactose, S: Standard compound

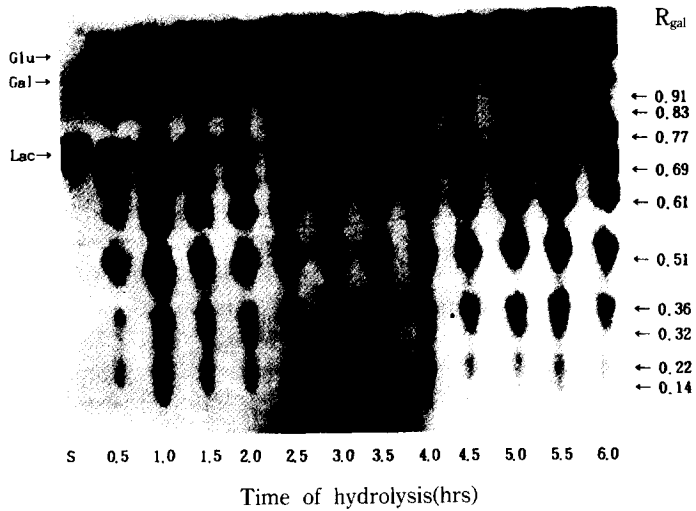


Fig. 2. Paper chromatogram of oligosaccharides formed during hydrolysis by β -galactosidase from *K. fragilis*
 Glu: glucose, Gal: Galactose, Lac: Lactose, S: Standard compound

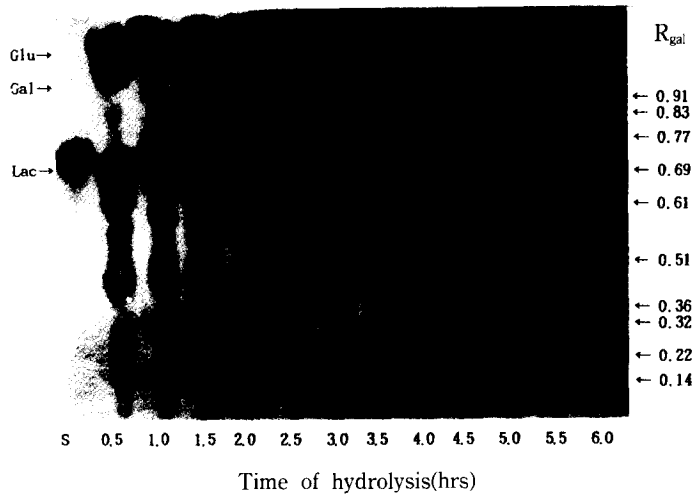


Fig. 3. Paper chromatogram of oligosaccharides formed during hydrolysis by β -galactosidase from *A. oryzae* and *K. fragilis*
 Glu: glucose, Gal: Galactose, Lac: Lactose, S: Standard compound

임을 알 수 있었다. TOS의 각 spot도 *A. oryzae*의 경우와 마찬가지로 9개가 나타났다.

Fig. 3은 lactose 수용액에 *A. oryzae* 유래의 β -galactosidase를 2시간동안 반응시킨 후 다시 *K. fragilis* 유래의 β -galactosidase를 반응시켰을 때 생성된 TOS의 paper chromatogram이다. 일반적으로 곰팡이류의 β -galactosidase는 효모류보다 반응온도가 낮고 반응시간이 빨리 일어나는 것으로 알려졌으며⁽⁹⁾, Sumylact의 경우도 Fig. 3에서 나타난 바와 같이 lactozym보다 반응이 먼저 일어나기 시작하였다.

PC에 나타난 각 spot의 종류와 농도로 보아 *A. oryzae*의 경우는 반응초기부터 강하게 oligo당이 생성되었으며 중기 이후에는 *K. fragilis*의 반응이 활발하여 반응 3.5시간대가 두 종류의 β -galactosidase 혼합사용시에는 이 시점을 최대 생성대로 생각하였다. 따라서 PC로 관찰한 TOS생성의 경시적 변화는 *A. oryzae*의 경우는 반응초기에 oligo당 생성이 강력하였으며 *K. fragilis*의 경우는 반응후기에 넓은 면적의 농도와 큰 spot의 종류가 많은 것으로 보아 서로 다른 생성원인 효소의 혼합 사용시에는 별다른 특성이 없는 것으로 추정되었다. 다만

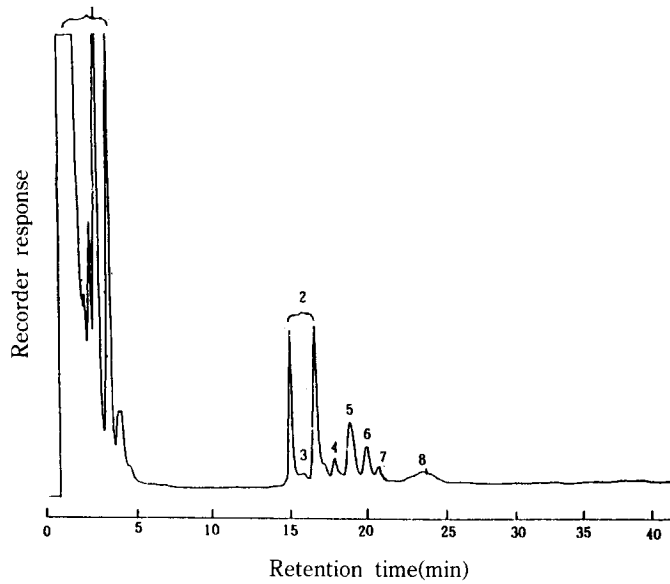


Fig. 4. Representative gas chromatogram of TMS-ethers of lactose hydrolysate by β -galactosidase from *A. oryzae* peak identification: 1-glucose and galactose, 2-lactose, 3~7-disaccharides, 8-trisaccharides

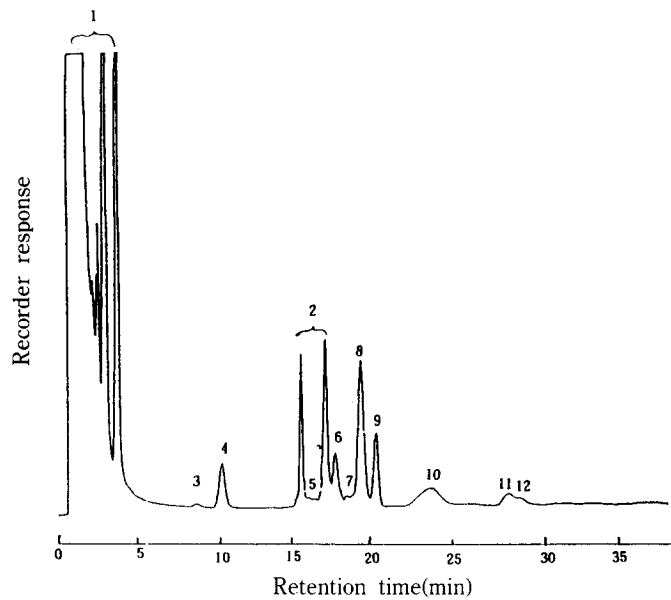


Fig. 5. Representative gas chromatogram of TMS-ethers of lactose hydrolysate by β -galactosidase from *K. fragilis* peak identification: 1-glucose and galactose, 2-lactose, 3~9-disaccharides, 10-trisaccharides, 11~12-tetrasaccharides

Mozaffar 등⁽¹⁹⁾의 보고에 의하면 *Bacillus circulans* 유래의 β -galactosidase에 의한 전이반응으로 생성되는 oligo당의 경시적 변화에서 3당류가 분해되기 시작하는 시점에서 유당보다 이동도가 높은 2당류가 나타난다고 보고하였으나, 본 실험에서는 유당보다 이동도가 높은

R_{gal} 0.91과 R_{gal} 0.83의 spot보다 3당류인 R_{gal} 0.36, R_{gal} 0.32, R_{gal} 0.22 및 R_{gal} 0.14의 spot 면적이 증가되는 것으로 보아 oligo당의 생성경향은 Mozaffar 등⁽¹⁹⁾의 보고와는 꼭 일치하지 않는 것으로 보이며 이러한 결과는 사용된 β -galactosidase의 생성원에 따른다는 Pazur 등⁽²⁰⁾

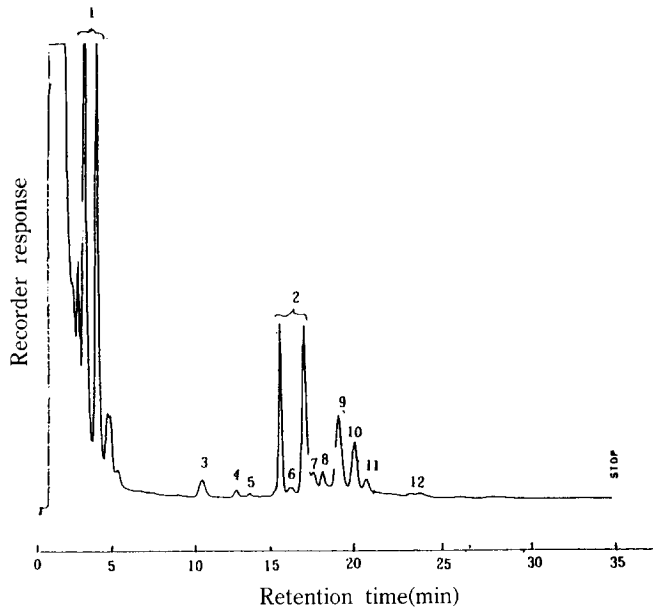


Fig. 6. Representative gas chromatogram of TMS-ethers of lactose hydrolysate by β -galactosidase from *A. oryzae* and *K. fragilis*
 peak identification: 1-glucose and galactose, 2-lactose, 3~11-disaccharides, 12-trisaccharides

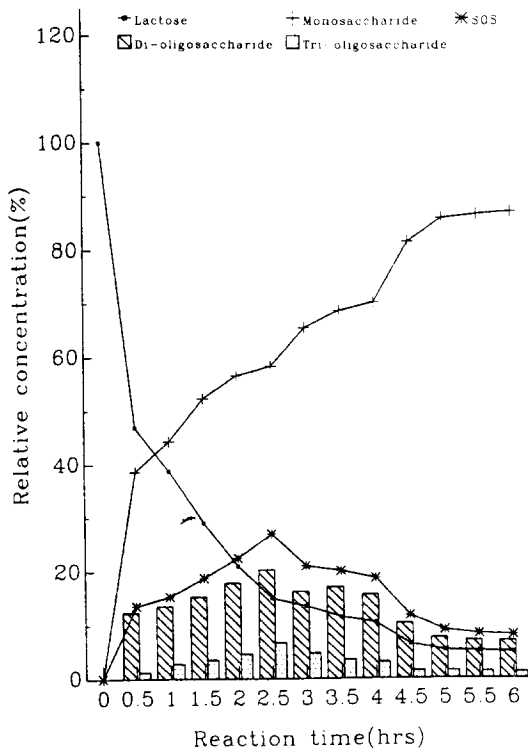


Fig. 7. Time course of lactose hydrolysis and transgalactosylated oligosaccharides (SOS) formation by β -galactosidase from *A. oryzae*
 *30% (w/v) Lactose solution, 600 LAU of Sumlyact

의 주장과 일치하는 것으로 생각된다.

Gas chromatography에 의한 TOS 생성량의 경시적 변화

분리 정제된 각 획분의 TOS는 강산성 양이온수지 (Amberlite IRA-118, H⁺)와 약염기성 음이온수지(Amberlite IRA-68, OH⁻)를 충전한 column에 의하여 탈염하여 미량의 염류도 존재하지 않음이 확인되었다. 분리 정제된 각 획분의 TOS는 Brobst와 Lott의 방법⁽¹⁶⁾ 및 Taba와 Adachi의 방법⁽¹⁷⁾에 의하여 TMS 처리하여 구성당의 종류와 생성량을 분석한 결과는 Fig. 4, 5 및 6과 같으며 각각의 figure는 *A. oryzae*와 *K. fragilis* 유래의 β -galactosidase 및 두 효소 혼합반응으로 생성된 oligo당의 gas chromatogram이다. 이들의 각 peak는 표준물질과의 retention time을 비교하였을 때 Fig. 4의 peak 1은 glucose 및 galactose, peak 2는 lactose이며, peak 3은 lactose 이외의 2당류이고 peak 4, 5, 6 및 7은 2당류이며 peak 8은 3당류로 동정되었다. Fig. 5의 peak 3~5는 lactose 이외의 2당류이며 peak 6~9는 2당류, peak 10은 3당류, peak 11~12는 4당류로 분리 동정되었다. 또한 Fig. 6의 peak 3~6은 lactose 이외의 2당류이며 peak 7~11은 2당류, peak 12는 3당류로 동정되었다. 따라서 SOS조 제액에서는 lactose를 제외한 2당류 이상의 oligo당이 6개가 동정되었고 LOS조제액에서는 lactose 이외의 2당류를 포함하여 10개의 oligo당이 동정되었으며, SLOS조 제액에서는 lactose 이외의 2당류를 포함하여 10개가 분리·동정되었다.

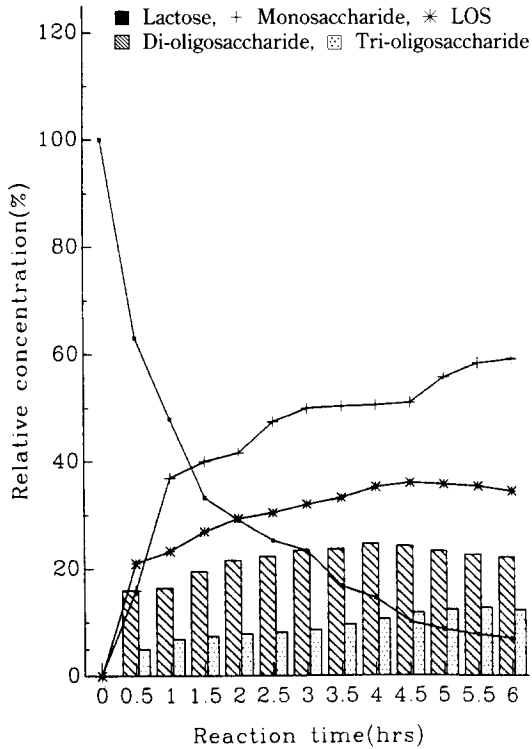


Fig. 8. Time course of lactose hydrolysis and transgalactosylated oligosaccharides (LOS) formation by B-galactosidase from *K. fragilis*
 *30% (w/v) Lactose solution, 660 LAU of Lactozym

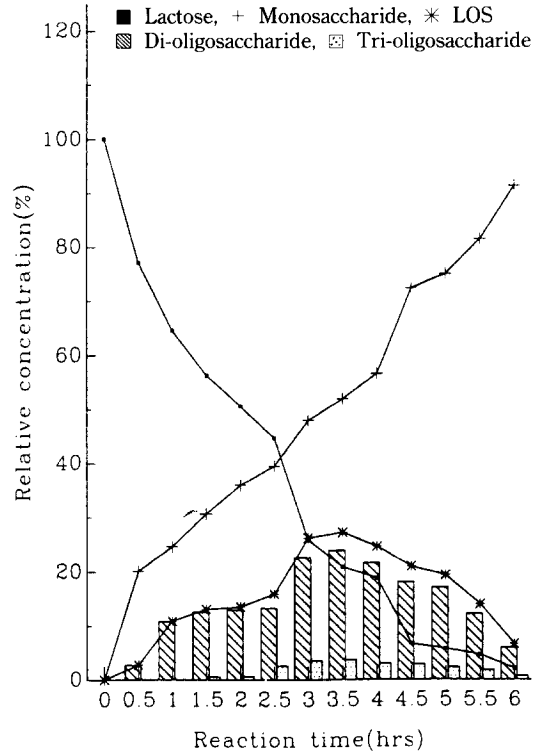


Fig. 9. Time course of lactose hydrolysis and transgalactosylated oligosaccharides (SLOS) formation by B-galactosidase from *A. oryzae* and *K. fragilis*
 *40% (w/v) Lactose solution, 660 LAU of Sumylact and 660 LAU of Lactozym

따라서 SOS 조제액에서는 5개의 2당류와 1개의 3당류가 생성되었고 LOS 조제액에서는 7개의 2당류와 1개의 3당류 및 2개의 4당류가 생성되었으며 SLOS 조제액에서는 9개의 2당류와 1개의 3당류가 생성된 점으로 보아 Sumylact 조제액에서는 단당류와 2당류가 주로 생성되며 Lactozym 조제액에서는 2당류, 3당류 및 4당류가 고루 생성되는 것으로 나타났으며 두 효소를 혼합사용한 SLOS에서는 2당류가 대부분을 차지하였으며 3당류 이상의 oligo당은 거의 생성되지 않았다. 이러한 현상은 Toba 등⁽²¹⁾의 보고와 비슷한 결과로 생각된다.

또한 Fig. 7, 8 및 9는 GC로부터 동정된 각 peak를 근거로 하여 retention time에 따른 면적비를 산출한 oligo당의 생성량에 대한 경시적 변화를 나타낸 결과이다. 이에 따른 oligo당의 최대 생성량은 *A. oryzae* 유래의 β-galactosidase는 반응 2.5시간째에 전당 중 26.9%이었고 *K. fragilis* 유래의 β-galactosidase는 반응 4.5시간째에 36.0%이었으며, 두 효소 혼합사용반응에서는 3.5시간째에 27.2%의 TOS가 생성되었다.

Fig. 7에서 보는 바와 같이 lactose 용액(30%, w/v)에서는 lactose의 잔존율이 14.95%였을 때 최대 생성물을 보였으며, 그 이후의 반응에서는 lactose의 가수분해는

계속되더라도 TOS는 증가하지 않고 오히려 단당류 쪽으로 역분해가 이루어지는 것이 추정되었다. 또한 Fig. 8에서의 TOS의 최대 생성물은 반응초기에서부터 oligo당의 전이 생성력이 강하게 나타났으며 지속적인 전이 반응이 이루어지면서 반응 4.5시간대에 최대 생성물이 나타나는 것으로 보아 전반용시간대에 걸친 oligo당 생성력이 아주 양호한 효소로 판단되었다. Fig. 9에서는 효소의 생성원과 특성상 차이가 있으나 *A. oryzae*의 β-galactosidase를 첨가한 lactose 용액(40%, w/v)에서 반응 2시간대까지 lactose의 가수분해력이 낮았으며 그에 대한 단당류의 생성과 TOS의 생성력도 비교적 낮았다. 그러나 반응 3.5시간대에서는 TOS가 전당 중 27.2%까지 생성되었으며 lactose의 분해도 가속화되어 lactose의 잔존율이 20.9%인 데 비하여 단당류의 생성은 72% 이상 유지되어 혼합반응계에서는 oligo당의 생성을 목적으로 사용하는 것은 적합치 않으며, 다만 단당류의 분해가 촉진되는 것으로 보아 분해쪽이 더 양호한 것으로 생각된다.

Oligo당의 생성량에 관해서는 Huh 등⁽¹⁸⁾이 *K. lactis* 유래의 β-galactosidase로부터 27.0%, Roberts와 Pet-

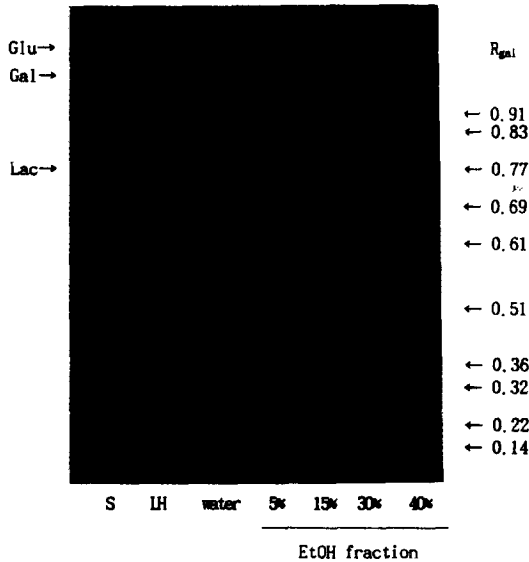


Fig. 10. Paper chromatogram of oligosaccharides eluted from a charcoal-celite layer water, 5, 15, 30 and 40% ethanol fraction

Glu: glucose, Gal: Galactose, Lac: Lactose, S: Standard compound, LH: lactose hydrolyzate

tinati⁽¹⁰⁾가 *K. fragilis*로부터 44.6%, Toba⁽²²⁾가 *K. fragilis* 및 *A. niger*로부터 30.0%와 21.0%의 TOS 최대 생성량을 보고하였다. 따라서 본 실험에서 사용한 *K. fragilis*와 *A. oryzae* 유래의 β -galactosidase는 TOS의 전이 생성력이 상당히 높은 효소로 판단되며, 그 중 *K. fragilis* 유래의 β -galactosidase(Lactozym)은 TOS생성에 유효하며 *A. oryzae* 유래의 β -galactosidase(Sumylact)는 lactose의 가수분해에 특히 유효한 것으로 생각된다.

활성탄-celite chromatography에 의한 TOS의 분리 정제

최대 생성조건 하에서 생성된 TOS는 분리·정제를 위하여 활성탄에 흡착켜 water(WT), 5%, 15%, 30% 및 40% ethanol획분을 얻었다. 각 획분을 PC로 분석한 결과가 Fig. 10이다. Fig. 10은 *A. oryzae*와 *K. fragilis* 유래의 β -galactosidase에 의하여 생성된 TOS의 chromatogram이다. WT획분에는 활성탄에 흡착되지 않은 oligo당 이외의 glucose와 galactose만이 검출되었으며 5% ethanol획분에는 약간의 2당류가 나타났으며 15% ethanol획분에는 5% ethanol획분으로 추출되지 않은 소량의 2당류와 3당류 그리고 30% ethanol획분에는 약간의 3당류와 4당류로 추정되는 oligo당의 생성이 이루어졌으며 TOS의 획분 중 30%와 40%의 ethanol획분에서 모두 9개의 oligo당이 확인되었다.

GOS의 최대 생성량과 구성당의 정량

Table 1은 최적 조건 하에서 생성된 GOS의 최대 생

Table 1. Composition of oligosaccharides in the GOS formed by β -galactosidase under the optimum condition

	Remained lactose	Mono-saccharides	GOS			Maximum formed GOS	
			TD	TT	TTT Total		
SOS	15.3	58.2	20.5	5.4	0.6	26.5	26.9
LOS	11.6	52.3	20.4	10.5	4.2	35.1	36.0
SLOS	20.9	51.9	21.0	4.1	1.9	27.0	27.2

TD: transgalactosylated disaccharides
 TT: transgalactosylated trisaccharides
 TTT: transgalactosylated tetrasaccharides

성량과 구성당의 비율을 GC로 분석한 결과이다. 최적 조건 하에서 TOS의 최대 생성량과 구성당의 비율은 Aronson⁽²³⁾ 및 Roberts와 Pettinai⁽¹⁰⁾의 보고와 같이 β -galactosidase의 기원, lactose의 농도 및 반응조건에 따라 차이가 있다는 것을 확인하게 되었으며 TOS가 생성되기 위해서 기질의 농도가 23% 이상 유지되면 분해된 당류의 전이력에 의하여 glucose와 galactose는 β -galactosidase와 복합체를 형성하여 transgalactosylation은 지속적으로 일어나나 최적 조건 하에서도 임계반응 시점이 짧은 것으로 보아 TOS는 쉽게 역분해가 일어나는 것으로 생각된다. 한편 Nakanishi 등(24)은 3가지의 β -galactosidase의 source로 *B. circulans*, *Streptococcus lactis* 및 *Escherichia coli*를 사용하여 각각의 GOS생성을 확인한 결과 *B. circulans*에서는 3당과 4당이 각각 11%와 4%이었으며 *S. lactis*에서는 3당이 8%이었으며 *E. coli*에서는 3당이 겨우 0.5%가 생성되었다고 보고한 점으로 보아 본 실험의 LOS에서 2당류 이외에 3당류가 10.5%, 4당류가 4.2%가 생성된 것은 *K. fragilis* 유래의 β -galactosidase가 3당류 이상의 TOS생성에 유효한 것으로 판단된다.

GOS의 열 및 pH에 대한 안정성 검토

Fig. 11과 12는 30%와 40%의 ethanol획분과 SOS 및 LOS에 대한 내열성과 내산성을 검토하기 위하여 시험한 결과이다. 내열성 시험은 100℃에서부터 160℃까지 각 시험구에 10분간 멸균 oven에 넣었다가 급냉시켜 GC로 oligo당의 잔존율(%)을 산출하였으며, 내산성 시험은 각 시험구마다 citric acid로 pH를 조정후 내열성 시험과 동일한 방법으로 GC로 분석한 oligo당의 잔존율을 산출한 결과이다. Fig. 11에서 보는 바와 같이 LOS와 SOS는 150℃ 이상에서도 열에 대하여 비교적 좋은 안정성을 보였으며, 30%와 40% ethanol획분도 130℃ 이상에서 크게 분해되지 않는 점으로 보아 내열성에 있어서는 상당히 안정하다고 볼 수 있다. 또한 Fig. 12에서 나타난 바와 같이 내산성 시험에서는 LOS와 SOS보다 30%와 40% ethanol획분이 산에 대하여 강한 내성을 보였으나 pH가 2.5 이하로 낮아짐에 따라 급속히 분해가

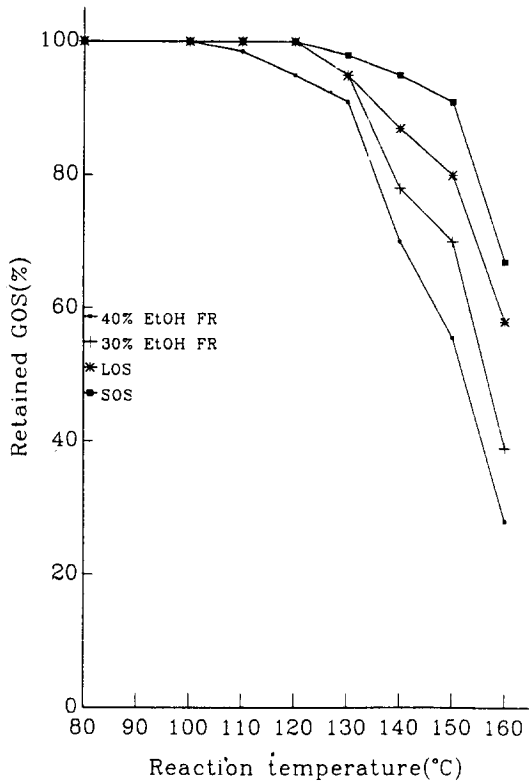


Fig. 11. Effect of temperature on the stability of various GOS

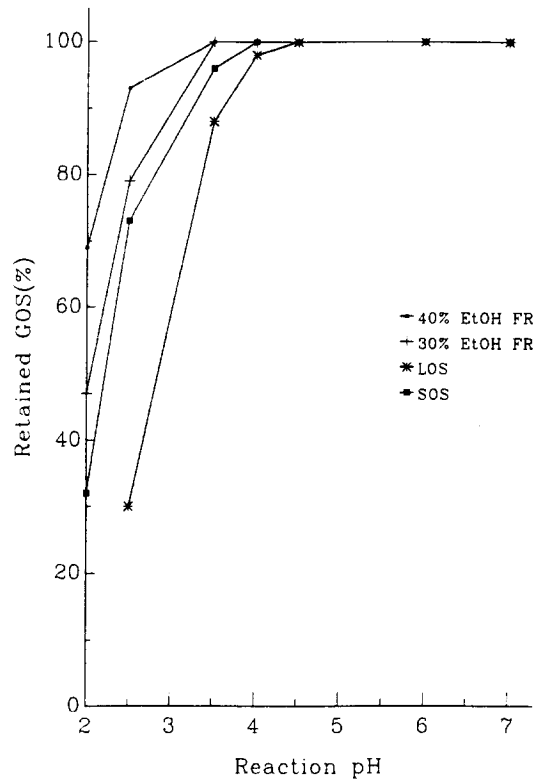


Fig. 12. Effect of pH on the stability of various GOS at 130°C for 10 min

일어나는 점으로 보아 日新製糖研究報告書⁽²⁵⁾의 열 산안정성 시험에서 pH 3.0, 120°C/15분간 유지 후 급냉한 결과 거의 oligo당의 분해가 일어나지 않았다는 小澤 등⁽²⁶⁾의 보고와 유사하였으며, 가열조건없이 pH만 조정하여 시험하였을 때는 pH 2.0까지 거의 변화가 없었다. 따라서 각 획분의 TOS와 GOS는 비교적 열과 산에 강한 특성을 보이므로써 장내 소화관에서 위산에도 크게 영향을 받지 않을 것으로 판단된다.

요 약

30%(w/v)의 lactose 용액에 *A. oryzae* 유래의 β-galactosidase를 전이반응시 최적 조건 하에서의 TOS의 최적 생산량을 산출한 결과는 26.9%이었고, *K. fragilis* 유래의 β-galactosidase를 전이 반응시켰을 때는 37.0%이었으나 40%(w/v)의 lactose 용액에서 두 효소를 혼합 사용하여 비교 반응시켰을 때는 27.2%의 수율을 보였다.

TOS의 생성경향은 단당류의 생성비로 보아 SOS에서는 초기에 lactose 가수분해력이 강하게 나타났으며 LOS에서는 반응초기에서 말기까지 지속적으로 생성되었다. 또한 SLOS에서는 반응 초기에서 중기까지 oligo당의 생성이 지속적으로 증가하다가 반응 중기 이후에는

급속히 감소되는 것으로 보아 역분해 현상이 쉽게 일어나는 것으로 관찰되었다.

열과 산에 대한 안정성에 있어서 TOS의 30% EtOH 획분과 40% EtOH 획분은 높은 내열성과 내산성을 가지며 β-galactosidase의 기원에 따른 30%(w/v) lactose 가수분해물의 열안정성과 내산성 시험에서는 LOS보다 SOS가 우수한 것으로 나타났다.

문 헌

- Wallenfels, K.: Enzymatische synthese von Oligosacchariden auf Disacchariden. *Naturwissenschaften*, **38**, 306 (1951)
- Pazur, J.H.: The mechanism of enzymatic synthesis of galactosyl oligosaccharides. *J. Biol. Chem.*, **208**, 439 (1954)
- Wallenfels, K., Malgotra, O.P. and Dabich, D.: Untersuchungen ber milchzucker spaltende enzyme. VIII. Der einfluss des kationenmilieus auf die aktivitat der β-galaktosidase von *E. coli* ML 309. *Biochem. Z.*, **331**, 459 (1960)
- Wallenfels, K. and Weil, R.: β-galactosidase. In *the Enzymes*. Boyer, P.D., Academic Press. N.Y. Vol. 7. p.617 (1972)

5. Shukla, T.D.: β -galactosidase technology: A solution to the lactose problem. *CRC Crit. Reviews. Food Sci. Technol.*, **5**, 325 (1975)
6. Zárate, S. and Lopez-Leiva, M.H.: Oligosaccharides formation during lactose enzymatic hydrolysis: A review of literature. *J. Food Prot.*, **53**, 262 (1990)
7. Huber, R.E., Kurtz, G. and Wallenfels, K.: A quantitation of the factors which affect the hydrolase and transgalactosylase activities of β -galactosidase(*E. coli*) on lactose. *Biochemistry*, **15**, 1994 (1976)
8. Wierzbicki, L.E. and Kosikowski, F.V.: Kinetics of lactose hydrolysis in acid whey by β -galactosidase from *Aspergillus niger*. *J. Dairy Sci.*, **56**, 1396 (1973)
9. Toba, T. and Adachi, S.: Hydrolysis of lactose by microbial β -galactosidase. Formation of oligosaccharides with special reference to 2-O- β -D-galactopyranosyl-D-glucose. *J. Dairy Sci.*, **61**, 33 (1978)
10. Roberts, H.R. and Pettinati, J.D.: Concentration effects in the enzymatic conversion of lactose to oligosaccharides. *J. Agric. Food Chem.*, **5**, 130 (1957)
11. Prenosil, J.E., Stuker, E. and Bourne, J.R.: Formation of oligosaccharides during enzymatic lactase: Part I. State of art. *Biotechnol. Bioeng.*, **30**, 1019 (1987)
12. Nilsson, K.: Enzymatic synthesis of oligosaccharides. *Trends Biotechnol.*, **6**, 256 (1988)
13. Deya, E., Amaya, M., Nojiri, K. and Igarashi, S.: Studies on the application of galactosyl lactose for infant formula. I. Preparation of galactosyl lactose by β -galactosidase. *Yukijirushi Nyugyo Gijyatsu Kenkyusho Hokoku.*, **78**, 19 (1982)
14. Toba, T., Yokota, A. and Adachi, S.: Oligosaccharide structures formed during the hydrolysis of lactose by *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. *Food Chem.*, **16**, 147 (1985)
15. 鈴木繁男, 中村道徳: 澱粉科學實驗法. 朝倉書店. 日本. p.203 (1979)
16. Brobst, K.M. Jr. and Lott, C.E.: Determination of some components in corn syrup by gas-liquid chromatography of the trimethylsilyl derivatives. *Cereal Chem.*, **43**, 35 (1966)
17. Toba, T. and Adachi, S.: Gas liquid chromatography of trimethyl silylated disaccharide oximes. *J. Chromatogr.*, **135**, 411 (1977)
18. Huh, K.T., Park, S.J., Kim, H.W., Choi, C.U., Moon, J.W. and Yu, J.H.: The formation of oligosaccharides during hydrolysis of lactose by *Kluyveromyces fragilis* β -galactosidase(Lactozym®). *Kor. J. Dairy Sci.*, **11**, 279 (1989)
19. Mozaffar, Z., Nakanishi, K., Matsuno, R. and Komikubo, T.: Purification and properties of β -galactosidases from *Bacillus circulans*. *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 3053 (1984)
20. Pazur, J.H., Marsh, J.M. and Tipton, C.L.: Cosubstrate specificity of the transgalactosylase of *Saccharomyces fragilis*. *J. Biol. Chem.*, **233**, 277 (1958)
21. Toba, T. and Watanabe, A.: Allolactose and 6-D- β -D-galactopyranosyl-D-galactose in commercial yoghurt. *J. Dairy Sci.*, **65**, 702 (1983)
22. Toba, T.: β -galactosidase: Its application to lactose hydrolysis and storage of yoghurt. *J. Dairy Sci.*, **66**, 17 (1985)
23. Aronson, M.: Transgalactosidation during lactose hydrolysis. *Arch. Biochem. Biophys.*, **39**, 370 (1952)
24. Nakanishi, K., Mutsuno, R., Torii, K., Yamamoto, K. and Kamikubo, T.: Properties of immobilized β -D-galactosidase from *Bacillus circulans*. *Enzyme Microbiol. Technol.*, **5**, 115 (1983)
25. 日新製糖研究報告書: カップオリコのpHと温度の影響. 1 (1991)
26. 小澤 修, 大塚耕太郎, 大木修一, 四女野隆之, 内田隆次: 4'-ガラクトシルラクトースの性質とその含有甘味シラップの製造法. 精糖技術研究会誌., **39**, 57 (1990)

(1994년 4월 11일 접수)