

셀룰라제를 이용한 갈락토올리고당의 생산 특성

신 현 재 · †양 지 원
한국과학기술원 화학공학과 및 생물공정연구센터

Characteristics of Galactooligosaccharide Production Using Cellulases

Hyun-Jae Shin and Ji-Won Yang[†]

Department of Chemical Engineering, BioProcess Engineering Research Center,
KAIST, Taejon 305-701, Korea

ABSTRACT

Galactooligosaccharide (GOS) is a kind of functional oligosaccharides that can be used as a food ingredient and a cosmetic additive. In this paper, characteristics of GOS synthesis by cellulase, using lactose as a substrate, were investigated. *Penicillium funiculosum* cellulase was found to be the most efficient for GOS production among six cellulases tested. The optimum pH and temperature for GOS production were 5.0 and 50°C, respectively. There was an optimum ratio of lactose concentration to enzyme loading; the value was 10 (w/w). The reaction pattern of *P. funiculosum* cellulase is consistent with that of microbial β -galactosidase which shows transgalactosylation activity. Amounts of GOS produced from 20% (w/v) lactose after 6 h incubation at 50°C, were 23% (w/w) based on total saccharide in the reaction medium. The GOS % increased with initial lactose concentration in the range of 5 to 20%. The products mainly consisted of a trisaccharide and tetrasaccharide from HPLC and TLC analysis. Among enzymes involved in transgalactosylation reaction, high molecular weight fractions over 50,000 Da, presumably β -glucosidase, were considered to be responsible for GOS production. Using this cellulase, a direct synthesis of galactosyl glucoside including GOS could be readily achieved with lactose as a galactosyl donor.

서 론

최근 기능성올리고당(functional oligosaccharide)의 수요가 급격히 증가하면서 다양한 올리고당이 생산, 판매되고 있다. 대표적인 기능성올리고당으로서 일반식이 Gal-(Glc)_n-Glc로 표시되는 갈락토올리고당(galactooligosaccharide, 이하 GOS)도 그 수요가 늘어날 전망이다. GOS의 기능성은 Bifidobacteria로 대표되는 장내 유용세균의 증식을 촉진시키

으로서 발생하며, 임상실험으로 장 및 간기능개선, 혈압의 강하, 항암작용, 골다공증의 예방 등 많은 효과가 보고되어 있다. 반면 섭취시 발생하는 부작용으로는 일시적인 더부룩함 정도로서 매우 안전한 물질로 간주된다(1, 2). 현재 GOS를 생산하는 방법은 크게 효소 전환법에 의한 생산과 발효에 의한 생산으로 나눌 수 있는데 효소법에 의한 생산은 빠른 반응속도, 높은 생산성, 반응물의 분리정제의 용이성 등에서 발효에 의한 방법보다 우수하다(3). 현재까지 GOS의 생산에 사용되는 효소는 여러 기원을 가진 β -galactosidase이며 이 효소에서 올리고당을 생

† Corresponding Author

성하는 데 관여하는 활성은 역가수분해 활성 혹은 당전이 활성이다. 그러나 몇가지 예외를 제외하고 대부분의 β -galactosidase는 당전이활성보다는 가수분해활성이 강하여 효율적인 올리고당의 생산에 이용하기 어려웠다(4-7). 따라서 기존의 β -galactosidase를 대체할 수 있는 효소원으로서 높은 당전이 활성을 보이는 효소를 이용한 올리고당의 생산을 고려할 수 있다. 가능성이 있는 효소로는 β -glucosidase와 cellulase를 들 수 있으며 이 중 cellulase는 혼합효소의 형태로 exoglucanase, endoglucanase, β -glucosidase 등 매우 다양한 활성을 나타낸다. 관련 연구로서 최근 Karthaus 등(8)은 cellulase를 당전이효소로, β -lactosyl fluoride를 당의 donor로 사용하여 alkyl cellobioside에 lactosyl기를 전이시켜 셀로올리고당의 생산한다고 보고하였다. 또한 cellulose내의 β -1,4-glucosidic bond를 가수분해하는 *Trichoderma viride* cellulase가 유기용매내에서 당합성반응을 촉매한다는 사실도 보고되었다(9).

본 연구에서는, 대표적인 여섯가지의 cellulase를 대상으로 당전이활성을 확인하고 전이활성이 우수한 효소를 선별하여 GOS의 생성능을 확인하였다. 또한 반응조건의 변화에 따른 GOS의 생산특성 및 올리고당 생산의 증가에 미치는 영향을 관찰하였다.

재료 및 방법

시약 및 효소

유당(lactose)은 일본 TCI사에서 기타 당류는 미국의 Sigma사에서 구입하였다. o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside(ONPG)는 벨기에의 Janssen Chimical사의 것을, 이외의 생화학 실험용 시약은 Sigma사 제품을 사용하였다. 기타 다른 시약은 특급 혹은 분석용 시약을 사용하였다. 여섯가지의 cellulase의 기원은 *Trichoderma reesei*, *Penicillium funiculosum*, *Aspergillus niger*이며 이들의 활성 및 제조업체를 Table 1에 나타내었다.

올리고당의 제조

50mM acetate buffer (pH 5.0)에 녹인 10mg/mL의 단백질을 함유한 효소액 2mL를 38mL의 유당용액에 첨가하였다. 이때 유당의 농도는 실험조건에 따라 5%에서 20% (w/v)까지 변화시켰다. 반응은 teflon 마개가 달린 50mL Erlenmeyer flask에서 수행하였고 시간별로 채취한 시료는 끓는 물에서 10분간 방치하여 실활시킨 후, 얼음속에 담구었

다. 이 시료는 HPLC 분석에 앞서 0.45 μ m의 필터를 통해 부유물을 제거하였다.

분석

GOS를 비롯한 반응중에 생성되거나 미반응된 모든 당류의 분석은 HPLC를 이용하여 분석하였다. 분석은 올리고당 분석의 정확성을 기하기 위하여 두 가지의 서로 다른 HPLC 컬럼을 사용하였다. 하나는 상온하에서 Phenomenex사의 Silica-NH₂ column을 사용하였고 elution solvent는 acetonitrile과 물의 비율을 75 : 25로 하였다. 다른 하나는 Waters사의 Sugar Pak I column을 0.005M의 Ca-EDTA가 함유된 물을 elution solvent로 하여 90°C에서 분석하였다(6). 박층크로마토그래피(Thin-layer chromatography, TLC)는 Merck사의 Kieselgel 60 plate를 사용하였으며 전개용매는 n-butanol-pyridine-water를 6:2.5:1.5의 부피비로 섞어 사용하였다. 전개된 판은 anisaldehyde-sulfuric acid 시약을 도포한 후 100°C에서 15분간 가열하여 발색시켜 생성된 당을 확인하였다(10). 전기영동은 Weber와 Osborn(11)의 방법을 따라 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel을 제조하여 수행하였다. 단백질의 농도는 Sigma사의 bicinchoninic acid(BCA) kit를 사용하여 분석하였으며 기준물질로는 bovine serum albumin(BSA)가 사용되었다. 한편 β -galactosidase의 활성은 ONPG를 기질로 하여 420nm에서 흡광도로서 나타내었다. 효소활성 1단위(Unit)는 상기한 분석조건에서 분당 생산하는 1 μ mol의 o-nitrophenol의 양으로 나타내었다(12).

결과 및 고찰

셀룰라제의 당전이활성

6가지 cellulase의 두 가지 가수분해 활성을 carboxymethylcellulose(CMC)와 ONPG를 사용하여 측정하였다. Table 1를 보면 cellulase 활성과 β -galactosidase (이하 β -gal) 활성과는 연관성이 없는 것으로 보이며 β -gal 활성과 당전이 활성과는 밀접한 관계가 있음을 알 수 있다. *Trichoderma reesei* (case 1) 유래 cellulase가 가장 높은 CMC 활성을 나타내었으나 β -gal 활성 및 당전이 활성(특히 갈락토실기를 옮기는 transgalactosylation)은 거의 나타나지 않았다. 반면 *Penicillium funiculosum* 유래 cellulase의 경우에는 상대적으로 낮은 CMC 활성을 보이나 β -gal 활성과 transgalactosylation

Table 1. Enzyme activities of six cellulases tested.

Case	Cellulase ^b	CMCase activity (Units/mL-solution)	β -Galactosidase activity (Unit/mL-solution)	β -Gal./CMCase	Transgalactosylation ^c
1	<i>Trichoderma reesei</i>	1041	0.27	2.6×10^{-4}	-
2	<i>Penicillium funiculosum</i>	168	1.19	7.0×10^{-3}	+
3	<i>Aspergillus niger</i>	188	0.14	7.4×10^{-4}	-
4	<i>Trichoderma reesei</i>	202	0.63	3.1×10^{-3}	+
5	<i>Aspergillus niger</i>	154	0.18	1.2×10^{-3}	-
6	<i>Trichoderma sp.</i>	497	0.95	1.9×10^{-3}	+

^a Enzyme supplier and calculation of enzyme activity were described in Material and Method.

^b Suppliers are Novo Nordisc Ferment Ltd. (case 1), Sigma Co. (case 2), ICN Biochemical Inc. (case 3), Fluka Co. (case 4 and 5), and Daiwa Kasei KK (case 6)

^c Degree of transgalactosylation reaction was measured by TLC analysis. '+' indicates transgalactosylation activity and '-' indicates no transgalactosylation activity.

활성은 각각 매우 높은 값을 나타내었다. 동일한 효소에서 CMCase와 β -gal 활성과의 상대적인 비 (CMCase/ β -gal)를 보면 그 순서가 case 2>4>6 >5>3>1 였다.

일반적으로 cellulase는 세 가지 효소의 복합체이므로 효소의 활성을 하나의 척도로서 측정하기는 힘들다. 또한 각 효소간의 상호작용에 기인하여, 순수한 성분들로 분리되지 않는한 원하는 특정 효소의 활성만을 알아낼 수 없다. 지금까지 알려진 바에 따르면 위 결과에서 CMCase 활성은 endoglucanase에 의한 영향을 가장 많이 받으며 β -galactosidase는 β -glucosidase에 의한 영향을 가장 크게 받는다 (13, 14). 현재, cellulase관련 연구의 대부분은 산업적 중요성 등의 요인에 기인하여 *Trichoderma sp.*가 생산하는 cellulase에 대한 연구가 가장 많은 비율을 차지하였다. 반면 *P. funiculosum*이 생산하는 cellulase에 관한 연구는 매우 적어 해당 cellulase complex를 구성하는 구성 효소들과 각 효소들의 구체적인 작용 기작(reaction mechanism)에 대한 정보를 알 수 없다. 그러나 cellulase complex가 갖는 공통적이며 대표적인 성분인 exoglucanase, endoglucanase, β -glucosidase의 작용기작과 반응의 속도론적인 정보는 유사한 특성을 보이며 이것은 Lee and Fan(13, 14)에 의해 정리되었다.

Wood 등(15)에 따르면 *P. funiculosum* cellulase는 주로 exoglucanase와 glucosidase 성분으로 이루어져 있으며 이 중에서 exoglucanase 성분은 당전이 활성이 없다고 보고한 바 있다. 그러므로 또 다른 성분인 β -glucosidase가 당전이에 관여하는 것으로 추측된다. 이와 관련하여 최근 Kuriyama 등

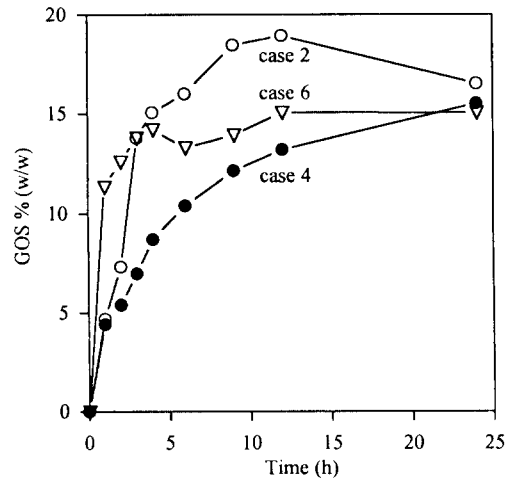


Fig. 1. Comparison of GOS production pattern of three cellulases. Reactions were carried out in 50mM acetate buffer at 40°C. Lactose concentration was 4.8% (w/v) and enzyme loading was 0.024% (w/v).

(16)이 β -glucosidase가 당전이 활성이 있다는 사실과 이 반응의 특성에 대하여 보고한 바 있다. 한편 cellulase complex에 포함되어있는 β -glucosidase는 40,000에서 75,000 사이의 분자량 분포를 가지는 것으로 알려져 있으며 cellobiose나 α -1,4-oligosaccharide를 분해하는 활성이 있다.

GOS생산을 위한 cellulase의 선별을 위하여 당전이 활성을 보이는 2, 4, 6번 cellulase의 올리고당 생산특성을 비교하였다. Fig. 1에서 보면 GOS의 초

Table 1. The effect of pH and temperature on GOS production.

Media pH	GOS%(w/w)	Monosaccharide%	Degree of conversion
5.0	14(14) ^a	29(31)	43(45)
6.0	13(14)	11(16)	24(30)
7.0	14(14)	9(6)	23(30)

Reactions were performed in wide range buffer. Reaction temperatures were 40°C (reaction time, 3.5h) and 50°C (reaction time, 3 h). Lactose concentration was 1% (w/v) and S/E (substrate to enzyme) ratio was 10.

^a: The values in parentheses refer to those of 50°C.

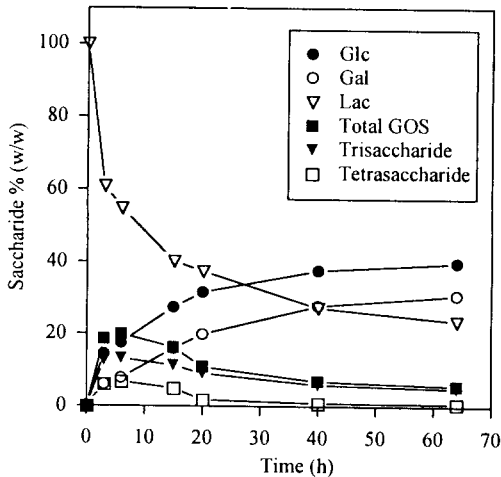


Fig. 2. Time course of GOS production by *P. funiculosum* cellulase. Reaction conditions were described in Materials and Methods. Lactose concentration was 10% (w/v) and enzyme loading was 1% (w/v). Gal:galactose; Glc:glucose; Lac:lactose; Total GOS:sum of tri- and tetrasaccharide.

기 생성속도면에서는 *T. reesei* (case 6)가 가장 빠르며 최고 생성율은 15% (w/w)였다. 반면, *P. funiculosum* cellulase의 경우는 초기반응속도는 *T. reesei*에 비하여 다소 느리나 최고생성율은 19%로 근소한 우위를 점하였다. 이 후의 실험은 *P. funiculosum* 유래 cellulase를 이용하여 수행되었다.

반응온도와 pH의 영향

Cellulase의 반응성에 미치는 반응온도와 pH의 영향을 알아보았다 (Table 2). 반응은 McIlvaine

wide range buffer (pH 5-7)에 1% (w/v) 유당농도로 수행되었으며 반응온도는 40°C와 50°C였다. 동일한 시간내에 GOS의 생성량은 pH 5.0에서 최고치를 보였으며 GOS 생산에 미치는 반응온도의 영향은 없었다. 유당의 전환율은 온도에 따라 증가하였으며 생성된 단당류 (glucose와 galactose의 합)도 증가하였다. 따라서 이후의 실험은 pH 5.0, 온도 50°C를 기준으로 수행하였다.

당전이 반응

P. funiculosum cellulase와 유당을 반응시키면 glucose와 galactose의 가수분해물 뿐만 아니라 여러 올리고당이 생성된다. HPLC 및 TLC 분석을 통하여 생성된 올리고당은 대부분 삼당과 적은 양의 사당으로 이루어져 있는 것으로 확인되었다 (data not shown).

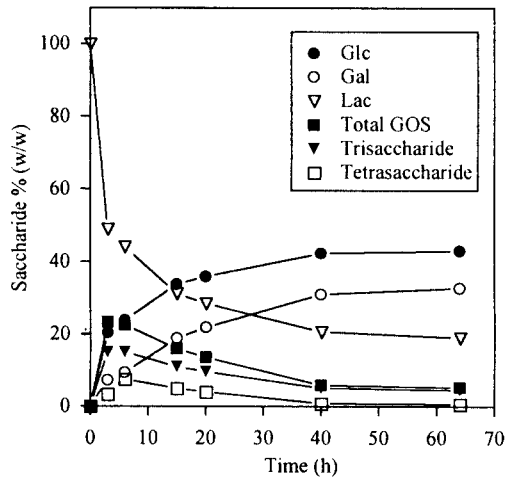
Fig. 2는 시간에 따른 GOS의 생산경향을 나타낸다. 항상 galactose의 농도가 glucose의 농도보다 낮은 것은 생산된 GOS가 주로 transgalactosyl product임을 간접적으로 시사한다. 10% 유당농도에서 반응시작 후 6시간만에 반응액에 가한 유당의 23%가 GOS로 전환되었으며 생성된 올리고당은 최고 농도점에 이른 후 줄어들며 따라서 galactose와 glucose간의 농도 차이가 줄어들음을 알 수 있다.

올리고당의 생산에 관여하는 활성은 반응기구 (reaction mechanism)의 차이로 구분하면 역가수분해 (reverse hydrolysis) 활성과 당전이 활성으로 구분할 수 있는데, 두가지 반응기구를 모두 고려할 때 초기 기질농도를 증가시키는 것이 효과적임을 알 수 있다 (17).

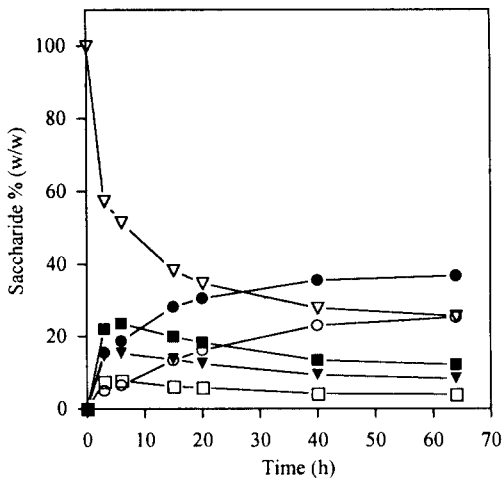
Fig. 3의 (a), (b), (c)에서 보면 *P. funiculosum* cellulase의 반응양상은 통상적인 mesophilic bacteria에서 유래된 β -galactosidase와 유사하다. 따라서 외부요인 (예, 온도 혹은 초기 유당농도)을 변화시키면 GOS 생산수율은 더욱 높아질 것으로 기대된다. 최근 Karthause 등 (8)은 *Aspergillus* sp. 유래의 cellulase로 galactosyl glucoside를 제조함에 있어서 유당의 첫번째 hydroxyl기에 불소분자가 반드시 치환되어야 한다고 하였으나 본 cellulase의 경우에는 아무 치환없이도 23% 이상의 높은 전이율을 보였다 (4, 5).

초기 기질 및 효소농도의 영향

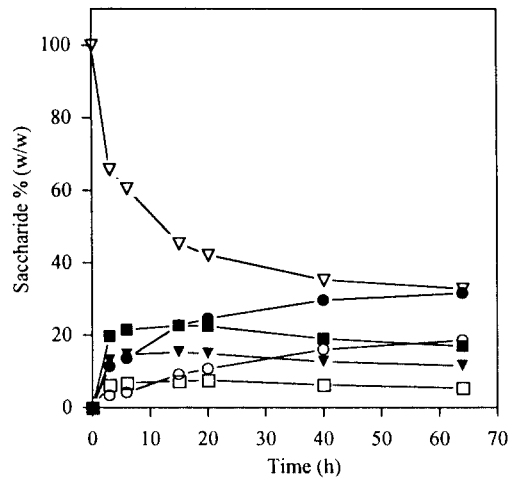
GOS의 생산에 미치는 초기 기질농도와 효소농도의 효과를 알아보았다. 기질농도와 효소농도와의



(a)



(b)



(c)

Fig. 3. The effect of substrate to enzyme ratio (S/E ratio) on GOS production by *P. furiculosum* cellulase. Lactose concentrations were 20%(w/v) and the ratios were (a) S/E=5, (b) S/E=10, (c) S/E=20(w/w).

상호작용을 고려하여 S/E ratio(substrate to enzyme ratio, w/w)를 변수로 도입하였다. Fig. 3을 보면 동일한 유당농도(20%, w/v)에서 S/E ratio가 증가함에 따라 동일한 시간내에서 유당의 전환율이 낮아짐을 알 수 있다. 생성된 올리고당의 최고 전환율은 23% (w/w)로 일정하였으며 이때 삼당과 사당의 비율은 일정하였다. 그러나 S/E ratio가 증가함에 따라 생성된 올리고당이 다시 가수분해되는 정도가 감소함을 알 수 있었다. 즉, 효율적인 올리

고당의 생산을 위해서는 기질과 효소의 비율을 조절하여 가수분해를 억제하는 방향으로 조절해야한다. 초기 기질농도만에 대한 올리고당의 생산량의 증가는 기질농도 5%~20% 범위에서 선형적이었다 (Fig. 4). 20% 유당농도는 주어진 온도에서 용해도 한계이다. 두가지 ultrafiltration membrane (MWCO 10,000과 50,000)을 이용하여 cellulase를 3가지의 분자량 범위로 분획하여 반응성을 확인하였다. MWCO가 50,000 이상인 분획에서 대부분

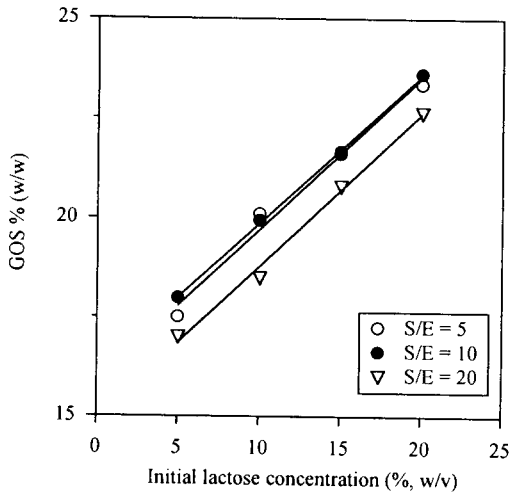


Fig. 4. The effect of initial lactose concentration on GOS production by *P. funiculosum* cellulase.

의 활성을 나타내었다(data not shown).

올리고당의 수율증대 및 생산성 향상을 위해서, 분리 정제된 효소의 사용을 고려할 수 있다. 결론적으로, 본 연구에서는 정제되지않은 *P. funiculosum* cellulase를 이용하여 S/E비를 적절히 조절함으로써 유당으로부터 GOS를 기존의 정제된 효소를 사용한 경우와 비견할만한 생산수율을 이룰 수 있었으며 이 반응성을 이용한 응용분야는 매우 다양하리라 기대된다(5).

요 약

식품 및 화장품의 첨가제로 사용되는 기능성 올리고당인 갈락토올리고당을 셀룰로스 가수분해 효소를 이용하여 생산하였다. 여섯가지의 효소 시료 가운데, *Penicillium funiculosum*에서 유래한 셀룰로스 가수분해 효소가 가장 높은 올리고당 생산 수율을 보였다. 올리고당 생산을 위한 최적온도와 pH는 각각 50℃와 5.0이었으며 유당농도와 효소농도사이의 최적비는 10(w/w) 이었다. 시간에 따른 올리고당 생산 반응의 경향성은 유당분해 효소 반응과 유사하였으며 초기 유당농도가 증가함에 따라 생성되는 올리고당의 농도가 증가하였다. 최적반응조건에서 20% (w/v)의 유당으로부터 최고 23%(w/w)의 올리고당을 얻을 수 있었다. 생성된 올리고당의 성분은 고속액체 크로마토그래프와 박층 크로마토그래프 분석을 통하여 삼당과 사당으로 이루어져 있음을 확인하였다.

감 사

본 연구는 과기처주관의 특정과제의 일부로서 수행되었으며 과기처와 (주)미원의 연구비 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. H. Tomomatsu(1994), *Food Tech.*, **Oct**, 61.
2. O. Chonan, K. Matsumoto, and M. Watanuki (1995), *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 236.
3. S. Kitahara(1990), *Denpun Kagaku*, **37**, 59.
4. Z. Mozaffar, K. Nakanishi, and R. Matsuno (1986), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **25**, 224.
5. J. E. Prenosil, E. Stuker, and J.R. Bourne (1987), *Biotech. Bioeng.*, **30**, 1019.
6. H. J. Shin and J. W. Yang(1994), *Biotech. Lett.*, **16**, 1157.
7. K. Iwasaki, M. Nakajima, and S. Nakao (1996), *Process Biochem.*, **31**, 69.
8. O. Karthaus, S. Shoda, H. Takano, K. Obata, and S. Kobayashi(1994), *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **1**, 1851.
9. S. Shoda, T. Kawasaki, K. Obata, and S. Kobayashi(1993), *Carbohydr. Res.*, **249**, 127.
10. H. J. Shin, O. J. Park, and J. W. Yang(1995), *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 593.
11. K. Weber and M. Osborn(1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406.
12. J. W. Yang, H. J. Shin, S. P. Yeom, B. D. Yun, and M. H. Kim(1994), *J. Microbiol. Biotechnol.*, **4**, 343.
13. Y. H. Lee and L. T. Fan(1980), *Adv. Biochem. Eng.* (A. Fiechter, ed), **5**, 101, Springer-Verlag, Berlin.
14. Y. H. Lee, L. T. Fan, and L. T. Fan(1980), *Adv. Biochem. Eng.* (A. Fiechter, ed), **5**, 131, Springer-Verlag, Berlin.
15. T. M. Wood, S. I. McCrane, and C. C. Macfarlane(1980), *Biochem. J.*, **189**, 51.
16. K. Kuriyama, K. Ysuchiya, and T. Murui (1995), *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 1142.
17. P. Monsan and F. Paul(1995) *FEMS Microbiol. Rev.*, **16**, 187.