

두 종류 β -galactosidases의 이단 반응을 이용한 갈락토올리고당의 제조

인만진 · 김민홍 · 채희정
(주)미원 중앙연구소

Two-stage Enzymatic Conversion of Lactose to Galactooligosaccharides by Two-type β -galactosidases

Man-Jin In, Min-Hong Kim and Hee Jeong Chae
R&D Center, Miwon Co., Ltd.

Abstract

In an attempt to increase the conversion of lactose to galactooligosaccharides, two types of β -galactosidases originated from *Thermus caldophilus* and *Bacillus* sp. A4442 reacted with 60% (w/w) lactose consecutively. Concentration of galactooligosaccharides reached up to 60% at the 85% conversion of the initial lactose maintaining transgalactosylation ratio ca. 90%.

Key words: galactooligosaccharides, β -galactosidase, *Thermus caldophilus*, *Bacillus* sp. A4442

서 론

장내 유익 세균종인 비피더스균의 증식인자로 올리고당의 기능성이 부각되면서⁽¹⁾ 올리고당의 한 종류인 갈락토올리고당(galactooligosaccharides, GOS)를 제조하기 위하여 유당의 가수분해에 오랫동안 사용되어 온 β -galactosidase (EC 3.2.1.23)의 당전이 활성을 응용하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 최근 β -galactosidase의 갈락토스 전이활성을 이용하여 stevioside, cyclodextrin, lactose, amino acid 등에 갈락토스를 전이시키는 연구가 보고되었다^(2,3). 그러나 대부분의 β -galactosidase는 가수분해활성이 전이활성보다 우수하기 때문에 높은 수율로 당전이 산물을 얻기가 어려운 문제점이 있다. 유당에 갈락토스를 전이시켜 GOS를 제조하는 경우 생성되는 GOS의 양은 효소의 기원에 따라 차이가 있으나, 고품분 중 50% (w/w) 정도가 일반적이다⁽⁴⁾. 높은 함량의 GOS를 제조하기 위하여는 전이활성이 우수한 효소와 새로운 반응시스템이 필요하다. 최근에 본 연구자들은 갈락토스 전이활성이 우수한 β -galactosidase를 생산하는 미생물을 선별하여 보고한 바 있다⁽⁵⁾.

본 연구에서는 새로운 반응시스템의 일환으로 기원

이 다른 두 종류의 β -galactosidase를 사용하여 높은 함량의 GOS를 제조하는 방법에 대하여 조사하였다. 기질의 농도를 높이기 위하여 고온에서 내열성 효소로 1차 반응시키고, 갈락토스 전이활성이 우수한 효소로 2차 반응시켜 GOS의 함량을 60% (w/w) 이상으로 만드는 가능성에 대하여 연구한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 및 사용기기

내열성 β -galactosidase는 *Thermus caldophilus* 유래의 것으로 부분정제된 것을 성균관대 권석태 교수로부터 구하여 사용하였으며, 전이활성이 우수한 β -galactosidase는 (주)미원 중앙연구소에서 보관중인 *Bacillus* sp. A4442 기원의 것으로 전보와 동일한 방법⁽⁶⁾으로 발효하여 사용하였다. GOS의 제조 원료인 유당은 시판하는 시약등급의 것을 사용하였다.

생성된 GOS의 분석은 HPLC를 이용하여 전보와 동일한 방법⁽⁷⁾으로 실시하였다.

효소활성, 전환율 및 전이율 측정

효소의 활성 측정은 ONPG (*o*-nitrophenol β -D-galactopyranoside)를 기질로하는 Miller의 방법⁽⁸⁾에 준하였으며, 효소에 따라 70°C 혹은 50°C에서 수행하였다. 전환율과 전이율은 전보와 동일한 방법⁽⁷⁾으로 계산

Corresponding author: Man-Jin In, R&D Center, Miwon Co., Ltd., 125-8, Pyokyo-ri, Majang-myun, Ichon, Kyongki-do 467-810, Korea

Table 1. Relative sugar compositions in reaction products according to enzyme origins

	Enzymes originated from		
	<i>Thermus caldophilus</i>	<i>Bacillus</i> sp. A4442	<i>Thermus caldophilus</i> + <i>Bacillus</i> sp. A4442
Glucose	17.81	21.30	22.34
Galactose	2.40	2.52	2.48
Lactose	54.31	24.40	14.91
Other disaccharides	trace	14.84	14.91
Galactooligosaccharides	25.48	36.94	45.99
Total galactooligosaccharides	25.48	51.78	60.27
Conversion(%) ¹⁾	47.5	75.6	85.1
Transgalactosylation ratio(%) ²⁾	86.5	88.2	88.9

¹⁾Conversion (%)=(Lactose_{initial}-Lactose_{final})/Lactose_{final}

²⁾Transgalactosylation ratio=(Glucose_{final}-Galactose_{final})/Glucose_{final}

하였다.

결과 및 고찰

유당을 50 mM 인산 완충액(pH 6.0)에 60% (w/w)로 용해한 후 유당 1 g 당 2 unit의 비율로 내열성 효소를 첨가하여 70°C에서 유당의 농도가 40% (w/w)정도로 감소할 때까지 반응시키고, 온도를 50°C로 조정하여 *Bacillus* sp. A4442 기원의 효소를 동일하게 가하여 2차로 반응시켰다. 대조구로는 60% (w/w) 농도로 70°C에서 내열성 효소만을 사용하여, 또한 40% (w/w) 농도로 50°C에서 *Bacillus* sp. A4442 기원의 효소만을 동일한 조건으로 첨가하여 각각 반응시켰다.

그 결과 내열성 β -galactosidase만으로 유당을 GOS로 전환시킨 경우 특이적으로 3당류의 생성이 현저하게 많았으며 전이 2당류와 4당류의 생성은 미미하였다. 유당은 약 20 g정도가 실온의 물 100 mL에 녹을 만큼 다른 2당류에 비하여 용해도가 떨어지므로 고온에서 40% (w/w)로 기질을 제조한 후 온도가 40°C 이하로 낮아지면 쉽게 결정으로 석출한다. 그러나 내열성 효소만으로 반응도중 유당의 농도가 40% (w/w)정도 되었을 때 반응액의 온도를 4°C로 낮추어도 유당이 결정으로 석출되지 않았다. 이는 고온성 효소의 1차 반응으로 생성된 올리고당, 포도당 등이 용액중 유당의 안정화에 기여하기 때문인 것으로 추정된다.

두종류의 효소를 순차적으로 반응시킨 결과 GOS의 함량이 높은 전이활성을 갖는 효소를 이용하여 얻을 수 있는 수준인 50%에서 60% 이상으로 향상되었으며, 3당류 이상의 함량이 증가한 것은 내열성 효소에 의하여 생성된 3당류가 *Bacillus* sp. A4442 기원의 효소에 의하여 분해되는 양이 미미하기 때문이며, 이로부터 두 효소에 의하여 생성되는 올리고당의 화학적

구조가 서로 상이할 것으로 예상할 수 있다. 전이 2당류는 주로 2차 반응에서 생성되었다(Table 1).

내열성 효소를 이용한 2단 반응은 1차로 고온에서 반응이 진행되므로 기질의 농도를 60% (w/w) 이상으로 높일수 있으며, 1차 반응 후 기질에서 유당이 석출되지 않으므로 취급이 용이하고, 전환 후 농축량이 작으므로 유틸리티 절감의 장점이 있다. 무엇보다도 GOS의 함량이 60% 이상이므로 제품 품질 수준이 향상되는 잇점이 있다.

요 약

갈락토올리고당의 함량을 증가시키기 위하여 *Thermus caldophilus*와 *Bacillus* sp. 유래의 두 종류 β -galactosidase를 유당에 순차적으로 반응시킨 결과 고형분 중 갈락토올리고당의 함량이 60% 이상까지 증가하였다. 먼저 내열성 효소로 고온에서 반응이 진행되므로 유당의 농도를 높일 수 있는 장점이 있다.

감사의 글

내열성 효소를 공급해주신 성균관대 권석태 교수님께 감사드립니다.

문 헌

- Masumoto, K., Kobayashi, Y., Tamura, N., Watanabe, T. and Kan, T.: Production of galactooligosaccharides with β -galactosidase. *Denpun Kagaku*, **36**, 123 (1989)
- Kitahata, S., Ishikawa, H., Miyata, T. and Tanaka, O.: Production of rufusoside derivatives by transgalactosylation of various β -galactosidases. *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 2923 (1989)
- Kitahata, S., Fujita, K., Takagi, Y., Hara, K., Hashimoto,

- H., Tanimoto, T. and Koizumi, K.: Galactosylation at side chains of branched cyclodextrins by various β -galactosidases. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 242 (1992)
4. Mozaffar, Z., Nakanishi, K. and Matsuno, R.: Formation of oligosaccharides during hydrolysis of lactose in milk using β -galactosidase from *Bacillus circulans*. *J. Food Sci.*, **50**, 1602 (1985)
5. Cantacuzene, D. and Attal, S.: Enzymatic synthesis of galactopyranosyl-L-serine derivatives using galactosidases. *Carbohydr. Res.*, **211**, 327 (1991)
6. Prenosil, J. E., Stuker, E. and Bourne, J. R.: Formation of oligosaccharides during enzymatic lactose: Part 1: State of art. *Biotechnol. Bioeng.*, **30**, 1019 (1987)
7. 인만진, 김민홍, 정진 : 갈락토스 전이활성이 높은 β -galactosidase 생산균의 분리 및 효소생산과 관련된 몇가지 특징. *한국농화학회지*, **38**, 502 (1995)
8. 인만진, 최경호, 양성준, 김민홍, 한금수, 양지원, 정진 : 변이주 *Bacillus* sp. A4442에 의한 갈락토스 전이활성이 높은 β -galactosidase의 생산. *한국농화학회지*, **38**, 507 (1995)
9. Miller, J. H.: Experiments in molecular genetics. In *Assay of β -galactosidase*, Cold Spring Harbor Laboratories, NY, p.352 (1972)

(1996년 8월 22일 접수)