

## β-Galactosidase에 의한 Ascorbic Acid의 효소적 배당화

홍재식\* · 장소영 · 김영희<sup>1</sup> · 김명곤<sup>2</sup> · 김영수

전북대학교 식품공학과, <sup>1</sup>한국인삼연초연구원, <sup>2</sup>이리농공전문대학

**초 록 :** Ascorbic acid(AsA)의 산화 안정성 증진을 목적으로 효소적 배당화를 시도하였다. 본 실험에서 사용한 6종의 β-galactosidase에 대한 당 전이 생성물의 수율을 분석 비교한 결과 *Asp. oryzae*에서 분리한 β-galactosidase의 당 전이활성이 가장 높았으며, 당 공여체인 lactose와 당 수용체인 AsA 함유용액에서 당 전이 수율은 약 30% 수준이었다. 당 전이 생성물은 Dowex 1×8(Cl-형) 수지에 의한 ion exchange chromatography와 Toyopearl 40S gel chromatography에 의해 분리한 다음 동결건조하였다. *Asp. oryzae* 유래의 β-galactosidase 존재 하에서 AsA와 lactose의 반응액에서 분리한 생성물은 UV, IR, CI-MS, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR 등을 이용한 기기분석, 산 및 β-galactosidase에 의한 가수분해 특성을 조사한 결과 AsA에 galactose 1분자가 결합된 6-O-β-D-galactopyranosyl-L-ascorbic acid로 판명되었다.(1998년 10월 26일 접수, 1998년 12월 9일 수리)

### 서 론

보통 vitamin C라고도 하는 ascorbic acid(AsA)는 사람에게 항피혈병 인자로서 작용한다는 것이 밝혀진 이후로 발암과 암 증식 억제 효과, 인플루엔자에도 유효하며,<sup>1,2)</sup> 이외에도 항산화 효과, collagen 합성 촉진효과, 철 이온 흡수 촉진 효과, 멜라닌 색소 생성 억제 효과, 카테콜 아민 합성 촉진 효과 등이 보고되고 있다.<sup>3,4)</sup> 이와 같이 AsA는 여러 가지 생리적 활성을 지니고 있으나 수용액 상태에서 불안정하여 쉽게 산화되어 분해되며 가열하거나 금속 염의 존재 하에서 분해가 촉진되는 것으로 알려져 있다.<sup>5,6)</sup> 따라서 이러한 단점을 개선하기 위하여 화학적 방법에 의한 안정한 유도체를 제조하는 방법이 연구되어 왔는데 그 유도체의 대표적인 예로서 AsA-2-sulfate, AsA-2-phosphate, AsA의 고급 지방산 에스테르 등을 들 수 있다.<sup>7,8)</sup> 그러나 화학적 방법에 의해 제조된 유도체들은 비교적 가격이 비싸기 때문에 경제성 면에서 불리한 점이 있고 제조된 유도체들을 생체내 투여했을 때의 안전성이나 생리적 활성이 확실하게 구명되지 않은 형편이다.<sup>9)</sup>

한편 효소가 지니고 있는 당 전이 반응을 이용하여 배당체를 제조함으로써 AsA의 열 또는 산화에 대한 안정성이나 생리적 활성을 증대시키기 위한 연구가 시도되었는데 Miyake와 Suzuki<sup>10)</sup>는 *Aspergillus niger*의 소맥 코오지 배양액에서 분리한 α-glucosidase가 maltose와 AsA로부터 ascorbic acid-α-glucoside(AsA-α-glc)를 생성하는 것을 발견한 바 있고 그 후로 다른 *Aspergillus*속 및 *Penicillium*속의 곰팡이, *Candida*속의 효모 등에 존재하는 α-glucosidase에 의해서도 AsA의 배당체가 생성된다는 것이 발견되었으며, 기기분석에 의한 생성물의 구조동정 결과 ascorbic acid의 6번째 탄소에 glucose가 α-형으로 결합된 AsA-6-α-glucoside

(AsA-6-α-glc)임이 밝혀졌다.<sup>11)</sup> 그 후 동물조직이나 버에 존재하는 α-glucosidase와 *Bacillus stearothermophilus*가 생성하는 cyclodextrin glucanotransferase의 존재 하에서 maltos 또는 cyclodextrin과 AsA를 반응시키면 AsA-2-α-glc가 생성된다는 것이 발견된 바 있다.<sup>12-14)</sup> 특히 AsA-2-α-glc는 비환원성이면서 열, Cu<sup>2+</sup>이온, ascorbate oxidase에 의해서도 잘 분해되지 않고 안정성이 현저히 개선되며, 포유동물에 투여하면 α-glucosidase에 의해 AsA를 유리하여 혈중 농도가 증가함과 동시에 AsA와 마찬가지로 항피혈병 및 콜라겐 합성 촉진 인자로서 작용하기 때문에 의약품, 식품, 동물사료 분야에서 널리 활용될 것으로 기대되고 있다.<sup>14,15)</sup> 이와 같이 각종 미생물이나 포유동물 조직에 존재하는 α-glucosidase에 의한 AsA의 당 전이반응 및 반응 생성물의 이화학적 특성에 대해서는 많이 연구되었으나 β-galactosidase에 의한 AsA의 당 전이반응에 관한 연구는 거의 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 AsA의 안정성 증진을 목적으로 구입이 용이하고 가격이 비교적 저렴한 β-galactosidase를 사용하여 효소적 방법에 의해 AsA의 배당체를 제조하고 각종 기기분석을 통하여 반응생성물의 구조를 동정한 바 그 결과를 보고코자 한다.

### 재료 및 방법

#### 사용효소 및 시약

*Asp. niger*, *Asp. oryzae*, *Saccharomyces fragilis*, *Escherichia coli* 및 Bovin liver에서 유래하는 β-galactosidase는 Sigma제를 사용하였고 *Penicillium*에서 유래하는 lactase는 일본 K 화성 제품을 분양받아 사용하였다. AsA, sodium ascorbate(AsANa), iso-ascorbic acid(iso-AsA), p-nitrophenyl-β-galactoside(PNP-β-galactoside), o-nitrophenyl-β-galactoside(ONP-

찾는말 : 비타민 C, β-galactosidase, 효소적 배당화  
\*연락처

β-galactoside), lactose 및 Dowex 1×8(100~200 mesh) 이온교환수지는 Sigma제를 사용하였고, Toyopearl 40S gel은 일본 Tosoh제를 사용하였으며, 기타 시약은 시판 특급을 사용하였다.

효소활성 측정

β-Galactosidase 활성은 Kitahata 등의 방법<sup>16)</sup>에 준하여 측정하였다. 즉 10 mM PNP-β-galactoside 용액 400 μl, 0.1 M 초산완충용액(pH 5.3) 400 μl, 각 효소액 100 μl를 가한 후 40°C에서 10분 동안 반응시켰다. 반응액에 0.2 M sodium carbonate 용액 2100 μl를 가하여 반응을 종료시킨 후 분광광도계로 400 nm에서 흡광도를 측정하였으며, β-galactosidase 활성은 분당 1.0 μmole의 p-nitrophenol을 생성하는 효소량을 1 unit로 하였다.

반응액의 조제 및 분석

0.1 M 초산 완충용액(pH 5.3) 10 ml에 AsANa 0.49 g (0.25 M)과 lactose 0.86 g(0.25 M) 및 각 효소 375 unit를 가하여 용해시킨 다음 빛이 차단된 37°C의 수욕조상에서 교반하면서 반응시키면서 경시적으로 시료를 취하여 HPLC에 의해 배당체의 생성량을 분석하였다. 이 때 칼럼은 Lichrosorb NH<sub>2</sub> (4.6 mm×25 cm)을 사용하였고, 용매는 acetonitrile과 35% 1.05 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(65:35, v/v) 혼합액을 사용하였다. 반응생성물은 UV detector를 사용하여 245 nm에서 검출하였으며, flow rate는 분당 1.0 ml로 하였다. 반응생성물의 수율은 효소 반응 후 HPLC 분석에서 검출된 AsA와 반응생성물의 peak area의 합에서 반응 생성물의 peak area가 차지하는 비율(%)을 당 전이율(transgalactosylation ratio)로 표시하였다.

반응 생성물의 분리 및 구조동정

AsANa 19.6 g(0.25 M)과 lactose 34.2 g(0.25 M)을 함유하는 0.1 M 초산 완충용액 400 ml에 *Asp. oryzae* 유래의 β-galactosidase 3,000 mg(15,000 units)을 가한 후 37°C에서 2시간 반응시킨 다음 비등수욕조에서 10분간 가열하여 효소를 불활성화시켰다. 반응생성물은 이온교환수지 및 gel chromatography에 의해 분리하였다. 즉 Dowex 1×8 (Cl<sup>-</sup>형) 수지 500 ml를 칼럼(5×50 cm)에 충전한 후 0.01 M ammonium formate 용액으로 평형화시킨 다음 반응액을 주입하여 흡착시키고 충분히 세척하여 미반응의 당류를 제거하였다. 이어서 0.1 M ammonium formate 용액으로 반응생성물을 용출시켰으며 용출액은 10 ml씩 분취하였다. 각 분획은 HPLC로 분석하여 반응생성물을 함유하는 분획만을 합하여 약 50 ml로 감압 농축하였다. 농축액은 Toyopearl 40S gel 500 ml를 충전한 칼럼(3×50 cm)에서 증류수로 반응생성물을 10 ml씩 분취하면서 보다 더 분리하였다. 분리액은 동결건조하여 백색 분말상 결정을 얻었으며 HPLC에 의한 분석결과 생성물의 순도는 98.5%이었다.

사용기기

HPLC는 Waters제 U6K Rheodyne injector와 486 detector

및 Model 510 pump를 사용하였다. 반응생성물의 구조동정을 위한 ultraviolet absorption spectra는 Beckman제 model DU-70 spectrophotometer를 사용하여 측정하였다. Infrared absorption spectra는 Perkin Elmer IR spectrophotometer model 1600을 사용하여 KBr tablet로 하여 분석하였다. <sup>1</sup>H-NMR(400 MHz) 및 <sup>13</sup>C-NMR(100 MHz) spectra는 Bruker model ARX 400을 사용하였고, 용매는 D<sub>2</sub>O, 내부표준물질은 sodium trimethylsilyl propionate-2,2,3,3-d<sub>4</sub>(DSS)를 사용하였다. 분자량은 Finnigan제 MS 모델 GCQ를 사용하여 Positive CI mode로 분석하였다.

결과 및 고찰

당 전이 활성이 강한 효소의 screening

β-galactosidase는 lactose를 가수분해하는 효소로 널리 알려져 있지만 기질 농도가 높거나 당 수용체(acceptor)가 존재하면 축합에 의한 올리고당을 생성하거나 분해된 β-galactosyl기를 수용체에 결합시키게 되며 이와 같은 당 전이 활성은 효소를 생산하는 미생물의 종류에 따라 다른 것으로 알려져 있다.<sup>17)</sup> 본 실험에서 AsANa와 lactose의 혼합액에 시판 β-galactosidase를 각각 반응시킨 다음 생성된 당 전이 생성물의 수율을 분석 비교한 결과는 Fig. 1과 같다. 실험에 사용한 6종의 β-galactosidase 중 당 전이 활성이 가장 강한 것은 *Asp. oryzae*에서 유래하는 β-galactosidase이었으며 *Asp. niger*에서 유래하는 β-galactosidase도 비교적 활성이 강한 편이었으나 *Saccharomyces fragilis*, Bovin liver 및 *Escherichia coli*에서 유래하는 β-galactosidase는 당 전이 활성이 낮았다.

한편 AsANa와 lactose를 함유하는 용액에 당 전이활성이

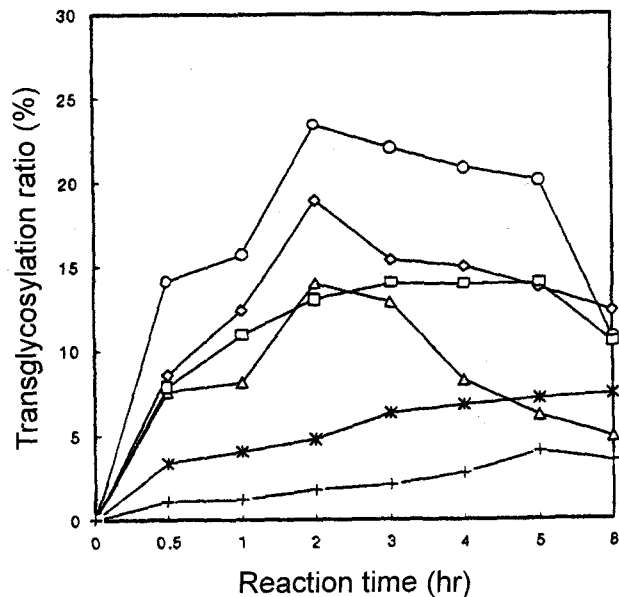


Fig. 1. Time course of ascorbic acid β-galactoside formation by various β-galactosidases. ○—○: *Asp. oryzae*, ◇—◇: *Asp. niger*, △—△: *Sacc. fragilis*, □—□: *Penicillium sp.*, \*—\*: Bovine liver, +—+: *E. coli*

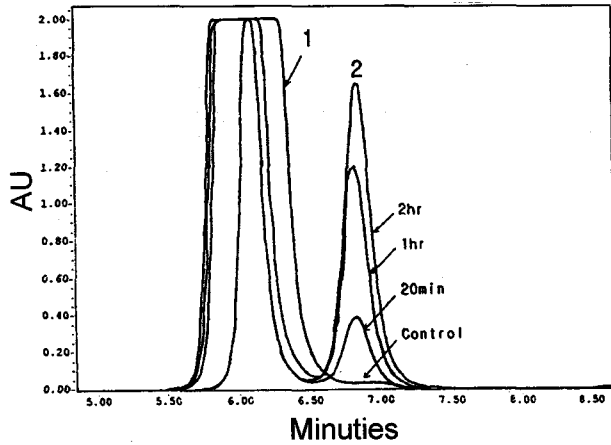


Fig. 2. HPLC chromatograms of reaction mixture of AsA and lactose with *Asp. oryzae*  $\beta$ -galactosidase. 1: AsA, 2: Transglycosylation product

강한 것으로 나타난 *Asp. oryzae* 유래의  $\beta$ -galactosidase를 첨가하여 반응시키면서 반응시간 경과에 따른 당 전이 생성물의 HPLC chromatogram 변화는 Fig. 2와 같다. 당 전이 생성물은 반응시간 경과에 따라 급격히 증가하기 시작하여 2~3시간 경과시에 최대치에 도달한 다음 그 이후는 당 전이 생성물의 생성량이 둔화되거나 오히려 감소되는 경향을 보였다. 이와 같은 감소는 반응이 진행됨에 따라 당 전이 활성보다는 가수분해 활성이 우세해지고 가수분해되어 생성되는 단당류가 효소에 대해 경쟁적 저해제로 작용하기 때문으로 판단된다.<sup>18,19)</sup>

당 전이 생성물의 분리 및 구조동정

AsANa와 lactose를 함유하는 0.1 M 초산 완충용액 400 ml에 *Asp. oryzae* 유래의  $\beta$ -galactosidase 15,000 units를 가한 후 37°C에서 2시간 반응시킨 다음 반응생성물을 이온교환수지 및 gel chromatography에 의해 분리하고 동결건조하여 백색 분말상 결정을 얻었으며 HPLC에 의한 분석결과 생성물의 순도는 98.5%이었다.

한편 분리된 당 전이 생성물과 AsA를 증류수에 용해시켜 UV absorption profile을 비교한 결과 AsA의 최대흡수파장( $\lambda_{max}$ )이 254 nm인데 비하여 당 전이생성물의  $\lambda_{max}$ 는 262 nm로 장파장 쪽으로 8 nm 정도 이동하는 bathochromic shift를 나타내었다. 또한 당 전이 생성물을 pH가 다른 완충용액에 용해시켜 UV absorption profile을 비교한 결과 Fig 3에서 보는 바와 같이 pH 5~7범위에서는  $\lambda_{max}$ 가 265 nm이었으나 pH 2 부근에서는 238 nm로서 단파장 쪽으로 약 27 nm 이동하는 hyperchromic 효과를 나타내었다. Yamamoto 등<sup>15)</sup>은 벼에서 분리한  $\alpha$ -glucosidase를 이용하여 제조한 AsA-2- $\alpha$ -glc의 경우 pH 7.0에서의  $\lambda_{max}$ 는 260 nm이나 pH 2.0에서는 238 nm이었다고 보고하였고, Muto 등<sup>12)</sup>은 AsA-6- $\alpha$ -glc의 경우 pH 7.0에서의  $\lambda_{max}$ 는 265 nm이나 pH 2.0에서는 243 nm이었다고 보고하였다.

당 전이 생성물의 IR(KBr) 측정결과 AsA와 마찬가지로 3250  $cm^{-1}$  부근에서 OH기에 의한 흡수와, 1700  $cm^{-1}$ 에서

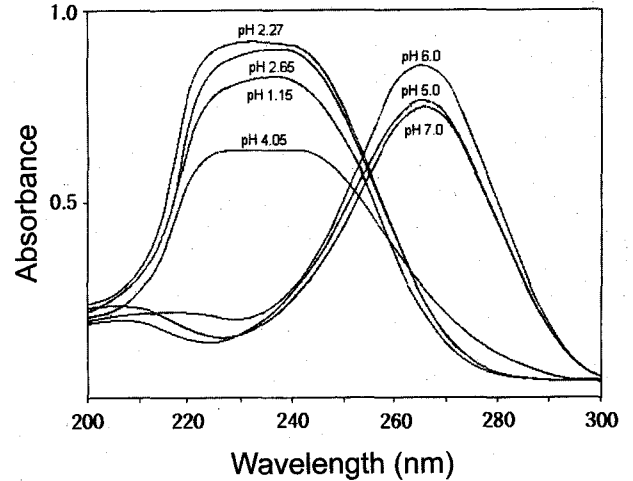


Fig. 3. UV absorption spectra of AsA- $\beta$ -galactoside at various pH value.

$\Delta^2$  stretching bond에 기인하는 흡수대가 관찰되었고,<sup>15)</sup> positive CI-MS 분석결과  $m/z$  339[M+1]<sup>+</sup>으로서 분자량이 388임을 알 수 있었다. <sup>1</sup>H-NMR(D<sub>2</sub>O,  $\delta$ )에서 3.50(1H, dd, J=9.7, 9.5 Hz), 3.66(1H, dd, J=9.5, 3.4 Hz), 3.75(2H, d, J=6.4 Hz), 3.78(2H, d, J=3.70 Hz), 3.86(1H, dd, J=9.5, 9.5 Hz), 4.02(1H, dt, J=9.7, 3.0 Hz), 4.08(1H, td, J=6.4, 1.5 Hz), 4.91(1H, d, J=1.5 Hz) 및 5.52(1H, d, J=3.4 Hz)에서 proton signal이 관찰되었다. 특히 4.47 ppm에서의 signal (1H, d, J=7.78 Hz)은 galactose 분자에 기인하는 anomeric proton signal로서 coupling constant가 J=7.78 Hz인 것으로 볼 때 AsA에 galactose가  $\beta$ -configuration으로 결합되어 있다는 것을 알 수 있다. 또한 <sup>13</sup>C-NMR에서 180.3 ppm(C-1), 116.0 ppm(C-2), 178.2 ppm(C-3), 81.1 ppm(C-4), 78.1 ppm(C-5) 및 73.6 ppm(C-6)에서 AsA 분자에 기인하는 signal 이외에도 106.2 ppm(C-1'), 71.6 ppm(C-2'), 73.6 ppm(C-3'), 70.6 ppm(C-4'), 75.5 ppm(C-5') 및 63.9 ppm(C-6')에서 galactose 분자에 기인하는 signal이 관찰되었다. 특히 AsA에서는 6번째 탄소의 signal이  $\delta$  65.1에서 관측되었으나 당

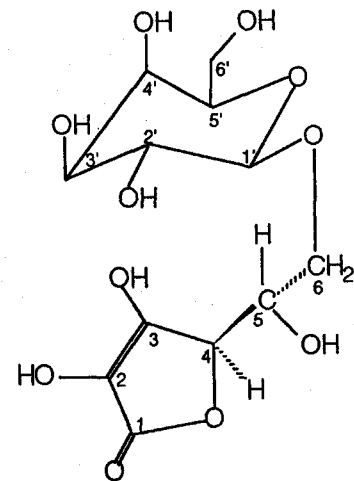


Fig. 4. Proposed structure of AsA- $\beta$ -galactoside.

Table 1. Substrate specificity of *Asp. oryzae* β-galactosidase in the formation of AsA-6-β-galactoside.

	Substrates					
	Lactose	ONP-β-galactose	PNP-β-galactose	Melibiose	Galactose	Maltose
Transglycosylation ratio (%)*	21.8	25.5	15.7	0	0	0

\*The ratio of transglycosylation was expressed as a percentage of peak area by HPLC analysis.

Table 2. Acceptor specificity of *Asp. oryzae* β-galactosidase in the formation of AsA-6-β-galactoside.

	Acceptors		
	Ascorbic acid	Na-Ascorbic acid	iso-Ascorbic acid
relative ratio (%)	84.9	100	90.4

전이 생성물에서는 AsA 분자의 6번째 탄소의 signal은 δ 73.6으로 저자장 쪽으로 8.5 ppm 정도 이동되어 나타났다. 이상의 결과를 종합해 볼 때 AsA와 lactose 혼합액에 *Asp. oryzae*에서 유래하는 β-galactosidase를 반응시켜 얻어진 생성물의 구조는 Fig. 4에서와 같이 AsA에 galactose 1분자가 β-결합의 형태로 결합된 6-O-β-D-galactopyranosyl-ascorbic acid로 동정되었다.

공여체 (donor) 및 수용체 (acceptor)의 영향

당 공여체의 영향을 비교하기 위하여 몇 가지 당류를 사용하여 비교한 결과는 Table 1과 같다. galactose와 glucose가 α-1,6의 형태로 결합되어 있는 melibiose나 단당류인 galactose 또는 glucose 2분자로 구성된 maltose를 당 공여체로 사용했을 때는 반응이 진행되지 않은 반면 PNP-β-galactose와 ONP-β-galactose는 당 공여체로 작용하였으며 특히 ONP-β-galactose를 사용했을 때는 lactose 보다는 당 전이 수율이 높았다. 또한 당 수용체로서 AsA, AsANa, iso-AsA의 영향을 비교한 결과 AsA와 iso-AsA는 AsANa 보다 약간 저조하였지만 85% 이상의 수율로 거의 대등한 당 전이 생성물이 생성됨을 알 수 있었다(Table 2).

참고문헌

1. Cameron, E. and L. Pauling (1978) Supplemental ascorbate in the supportive treatment cancer: Reevaluation of prolongation of survival times in terminal human cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **75**, 4538-4542.
2. 村田晃(1990) ヒタミンとかせ, がんの豫防. 月刊 フトケミカル. **3**, 33-37.
3. Burns, J. J., J. M. Rivers and L. J. Machlin(eds) (1987) Third conference on vitamin C. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **498**, 1-533.
4. Frei, B., L. England and B. N. Ames (1989) Ascorbate in an outstanding antioxidant in human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **58**, 6377-6381.
5. Eckert-Maksic, M., P. Bischof and Z. B. Maksic (1985) Vitamin C and its radicals; Tautomerism, electronic structure

- and properties. *Croat. Chem. Acta.* **58**, 407-426.
6. Yamamoto, I., N. Muto, E. Nagata, T. Nakamura and Y. I. Suzuki (1990) Formation of a stable L-ascorbic acid α-glucoside by mammalian α-glucosidase-catalyzed transglycosylation. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1035**, 44-50.
7. Tolbert, B. M., M. Downing, R. W. Carlson, K. Knight and E. M. Baker (1975) Chemistry and metabolism of ascorbic acid and ascorbate sulfate. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **258**, 48-49.
8. Radford, T., J. G. Sweeny and G. A. Iacobucci (1979) Ascorbic acid derivatives. Structure determinations by carbon-13 nuclear magnetic resonance. *J. Org. Chem.* **44**(4), 658-659.
9. Lu, P. W., D. W. Lillard, Jr. P. A. Seib, K. J. Kramer and Y. T. Liang (1984) Synthesis of the 2-methyl ether of L-ascorbic acid: Stability, vitamin activity, and carbon-13 nuclear magnetic resonance spectrum compared to those of the 1- and 3-methyl ethers. *J. Agric. Food Chem.* **32**(1), 21-28.
10. Miyake, T. and Y. Suzuki (1971) Enzymatic formation of new L-ascorbic acid glucoside. *Vitamin (Japanese).* **43**(5), 205-209.
11. 鈴木幸雄, 内田 綱 (1991) 生理活性物質の配糖化とその有用性, 科學と工業. **65**, 265-274.
12. Muto, N., S. Suga, K. Fujii, K. Goto and I. Yamamoto (1990) Formation of a stable ascorbic acid 2-glucoside by specific transglucosylation with rice seed α-glucosidase. *Agric. Biol. Chem.* **54**(7), 1697-1703.
13. Muto, N., Y. Ban, M Akiba and I. Yamamoto (1991) Evidence for the *in vivo* formation of ascorbic acid 2-O-α-glucoside in guinea pigs and rats. *Biochem. Pharm.* **42**(3), 625-631.
14. Yamamoto, I., N. Muto, K. Murakami, S. Suga and H. Yamaguchi (1990) L-Ascorbic acid α-glucoside formed by regioselective transglucosylation with rat intestinal and rice seed α-glucosidase: Its improved stability and structure determination. *Chem. Pharm. Bull.* **38**(11), 3020-3023.
15. Aga, A., M. Yoneyama, S. Sasaki and I. Yamamoto (1991) Synthesis of 2-O-α-D-glucopyranosyl-L-Ascorbic acid by cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus*. *Agric. Biol. Chem.* **55**(7), 1751-1756.
16. Kitahata, S., H. Ishikawa, T. Miyata and O. Tanaka (1989) Production of rufusoside by transgalactosylation of various β-galactosidases. *Agric. Biol. Chem.* **53**(11), 2923-2928.
17. 中村道徳, 貝沼圭二 (1986) 生物化學試驗法 19. 澱粉 關聯糖質試驗法, 學會出版センター. 東京, pp. 266-268.
18. Chiba, S. and T. Shimomura (1979) Transglucosylation of α-glucosidase. *J. Jap. Soc. Starch Sci.* **26**(2), 59-67.
19. Chiba, S. (1988) Studies on the transglucosylation and substrate specificity of α-glucosidase. *J. Jap. Soc. Starch Sci.* **35**(1), 69-77.

---

**Enzymatic Transgalactosylation of Ascorbic Acid by  $\beta$ -Galactosidase**

Jai-Sik Hong\*, So-Young Jang, Young-Hoi Kim<sup>1</sup>, Myung-Kon Kim<sup>2</sup> and Young-Soo Kim(\**Dept. of Food Science and Technology, Chonbuk National University, Chonju, Chonbuk 561-756, Korea; <sup>1</sup>Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Yuseong-Ku, Taejon 305-345, Korea; <sup>2</sup>Iri Nat'l College of Agriculture and Technology, Iksan 570-752, Korea*)

**Abstract** : The enzymatic transgalactosylation of L-ascorbic acid was investigated to synthesize a chemically stable form of L-ascorbic acid by using commercially available  $\beta$ -galactosidases. Among various enzymes examined, *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase was found to be formed the derivative of ascorbic acid in a high yield from ascorbic acid and lactose. The reaction product was isolated by ion exchange chromatography on a Dowex 1 $\times$ 8 (Cl<sup>-</sup> form) resin and Toyopearl HW-40S gel chromatography. The product was identified as 6-O- $\beta$ -D-galactopyranosyl-L-ascorbic acid on the basis of various experimental results, viz., UV, IR, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, and mass spectral data.

---

**Key words** : Ascorbic acid, vitamin C,  $\beta$ -galactosidase, transgalactosylation

\*Corresponding author