

열내성 Cellobiose 2-epimerase를 발현하는 대장균의 고정화담체를 이용한 락툴로오스의 생산방법

박아름, 구봉성, 김진숙, 김은정, 이현철*
(주)포바이오키아 기술개발연구소

Received: September 12, 2016 / Revised: October 5, 2016 / Accepted: October 6, 2016

Lactulose Production Using Immobilized Cells Including Thermostable Cellobiose 2-epimerase

Ah-Reum Park, Bong-Seong Koo, Jin-Sook Kim, Eun-Jeong Kim, and Hyeon-Cheol Lee*
Research Center, ForBioKorea Co., Ltd., Seoul 08592, Republic of Korea

Lactulose, a synthetic disaccharide, has received increasing interest because of its role as a prebiotic that can increase the proliferation of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* spp. and enhance the absorption of calcium and magnesium. While the industrial production of lactulose is still mainly achieved by the chemical isomerization of lactose in alkaline media, this process has drawbacks including the need to remove catalysts and by-products, as well as high energy requirements. Recently, the use of cellobiose 2-epimerase (CE) has been considered an interesting alternative for industrial lactulose production. In this study, to develop a process for enzymatic lactulose production using CE, we screened improved mutant enzymes (CS-H^RCE) from a library generated by an error-prone PCR technique. The thermostability of one mutant was enhanced, conferring stability up to 75 °C, and its lactulose conversion yield was increased by 1.3-fold compared with that of wild-type CE. Using a recombinant *Escherichia coli* strain harboring a CS35 H^RCE-expressing plasmid, we prepared cell beads immobilized on a Ca-alginate substrate and optimized their reaction conditions. In a batch reaction with 200 g/l lactose solution and the immobilized cell beads, lactose was converted into lactulose with a conversion yield of 43% in 2 h. In a repeated 38-plex batch reaction, the immobilized cell beads were relatively stable, and 80% of the original enzyme activity was retained after 4 cycles. In conclusion, we developed a reasonable method for lactulose production by immobilizing cells expressing thermostable CE. Further development is required to apply this approach at an industrial scale.

Keywords: Lactulose, cellobiose 2-epimerase, immobilization, thermostability

서 론

락툴로오스(lactulose)는 갈락토스(galactose)와 과당(fructose)으로 구성된 합성 이당류로 유당(lactose)의 포도당(glucose) 부분이 이성질화되어 과당(fructose)으로 대체된 것으로, 천연에는 거의 존재하지 않으며 유제품의 처리, 보존 중에 2차적으로 생성되는 것으로 알려져 있다[3]. 최근 락툴로오스는 비피더스(*Bifidus*)균의 증식을 촉진하는 작용이 있기 때문에 유아용 분유 등에 첨가되거나 probiotics 제품, 일반

장개선의약품, 삼투성 변비약 등 다양한 분야에서 사용되고 있다[1]. 락툴로오스는 소화되지 않는 당으로 섭취시 대장까지 분해되지 않은 형태로 이동하여 당분해세균(saccharolytic bacteria)에 의해 젖산을 생성하여 장내 pH를 저하시킴으로써 장운동을 자극하며 삼투효과를 높여 연동운동을 촉진하므로 배변을 촉진하거나[18, 19], 또 장내 암모니아 생성균의 증식을 억제해 암모니아의 체내흡수를 억제하는 기능을 나타내는 것으로 알려져 있다[1].

락툴로오스의 산업적 생산은 여전히 화학적 이성화법에 의해 이루어지고 있지만 환경과 복잡한 정제 공정으로 인해 효소기반의 락툴로오스 합성이 대두되고 있다[2, 4, 16, 24]. 주로 락툴로오스의 효소기반의 합성은 β -galactosidase를 이용한 합성방법이 연구되어 왔으나[7, 20, 21], 최근 다양한 균

*Corresponding author

Tel: +82-2-2061-8033, Fax: +82-2-2061-8034
E-mail: hclee@forbio.co.kr

© 2016, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

주로부터 Cellobiose 2-epimerase (CE: EC 5.1.3.11)가 분리되면서 유당로부터의 락툴로오스 전환 공정에 활용하는 방법이 연구되고 있다[8, 10, 23]. CE는 반추위 혐기성 미생물인 *Ruminococcus albus*에서 처음 동정되었으며[22], 이 효소는 β -1,4-mannobiose, cellobiose와 유당(lactose)을 포함한 β -1,4-linked oligosaccharide의 환원 말단의 포도당(glucose) 부분을 과당(fructose)을 거쳐 만노스(mannose)로 전환시키는 활성을 가지고 있기 때문에, 유당[galactose-glucose]의 경우 락툴로오스[galactose-fructose]를 거쳐 epilactose[galactose-mannose]로 전환시킬 수 있다. 락툴로오스는 CE에 의한 유당의 이성화반응에서 epilactose로 전환되기 전 단계의 중간체로서 반응조건과 기질과 결합하는 효소내 잔기의 결합력약화에 따라 생산될 수 있다. 대부분의 non-anomeric hydroxyl기에 configuration을 전환시키는 일반적인 epimerase는 인산기 혹은 핵산이인산기를 가진 기질에 주로 작용하지만, CE의 경우 환원말단에 위치한 당의 C-2 위치를 이성화한다. 기질과 효소간 상호작용은 *R. albus*에서 유래한 CE (RaCE) [5]와 *Rhodothermus marinus*에서 유래한 CE (RmCE) [6]의 3차원 입체 구조의 분석을 통해 알려졌다. CE의 기본적인 형태는 12개의 α -helices가 원통형으로 배열된 (α/α)₆ barrel 구조를 이루고 있으며, 활성부위(active site)는 3개의 histidine으로 이루어진 histidine center가 barrel 내부에 위치하고 있는 것으로 알려져 있다[5].

락툴로오스가 미생물 CE의 촉매반응을 통해 생산이 시도되고 있지만, 효소의 산업적 적용을 위해서는 고농도 유당기질에서 중간체인 락툴로오스의 생산성을 증대시킬 필요가 있다. 따라서 사용되는 효소의 열안정성과 효소반응의 특이성을 조절하여 생산에 적합하도록 개선되어야 한다. 이를 위한 접근방법으로, 고온에서의 락툴로오스 전환반응은 기질의 용해도 상승효과 외에도 고온에서 가속화된 반응속도로 인해 부분적으로 CE의 특이성을 상실하게 되어 최종산물인 epilactose보다 중간산물인 락툴로오스를 더 용이하게 생성될 수 있다는 가설을 세울 수 있다. 즉, CE에 의한 락툴로오스 생산은 유당의 포도당부위가 완전히 만노스로 전환되지 않은 중간체 형태인 과당단계에서 효소로부터 탈리가 일어나야만 효율적인 락툴로오스의 생산이 가능하기 때문에, 효소반응의 특성상 고온조건에서 효소의 반응속도가 빨라지면서 불완전한 효소반응이 유발되어 중간체인 락툴로오스의 생성을 촉진시킬 수 있다. 특히 고온조건에서 효소에 의한 전환반응을 일으켜야 하므로 효소의 열내성을 증진시킬 필요가 있으며 반응의 안정성을 위하여 효소 혹은 세포 고정화를 통해 단일 효소전환반응보다 락툴로오스 생산의 경제성을 높일 수 있다. 효소 또는 미생물을 고정화하는 방법은 결합법, 가교법, 포괄법 등 여러 고정화 방법이 사용되고 있으며 적용 산물에 따라 다양하다[13, 14, 17]. 고정화 방법은

생물촉매를 이용한 전환반응에서 안정성을 높이고 반복적인 운전을 통해 경제성을 높일 수 있는 유용한 방법이며, 고정화된 담체는 Packed-Bed Reactor (PBR)나 회분식 교반 반응기등에서도 활용할 수 있다.

본 연구에서는 고농도의 유당을 활용할 수 있는 열내성 CE를 선별하기 위해 고온조건에서 열처리된 조효소의 활성비교 스크리닝법을 통해 선별하였고, 선별된 효소를 발현할 수 있는 세포를 이용하여 포괄법으로 효소를 포함한 재조합 균주 담체를 제조하였고, 최적조건에서 회분식 반응을 통해 락툴로오스 생산에 관한 시험과 안정성에 관하여 시험을 수행하였다.

재료 및 방법

배지 및 시약

본 연구에 사용한 일반 시약과 기질 및 미생물 배지는 Sigma-Aldrich (USA)와 Difco Laboratories (USA)에서 구입하여 사용하였다. 유전자 실험을 위한 제한효소 및 DNA ligase 등은 New England Biolabs (UK)에서 구입하였으며, 각종 PCR 및 서열분석용 프라이머는 마크로젠(Korea)에서 합성하여 사용하였다.

유전자와 발현벡터 및 형질전환 대장균 배양조건

본 연구에서 사용된 cellobiose 2-epimerase (CE)의 유전자를 *Bacillus coagulans* (accession no. WP_046721782), *Stenotrophomonas maltophilia* (accession no. OBU71563), *Dictyoglomus turgidum* (accession no. WP_012583022), *Spirochaeta thermophilia* (accession no. AEJ60369), *Ruminococcus albus* (accession no. AB301953), *Rhodothermus marinus* (accession no. ACY49317), *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* (accession no. ABP65941)에서 분리하여 사용하였다.

각 CE의 대장균 내 발현을 위한 플라스미드 벡터는 pET-28a (+) (Novagen, Germany) 플라스미드를 사용하였으며, 유전자 클로닝 및 발현을 위한 숙주로는 *E. coli* BL21을 사용하였다. 재조합 *E. coli* BL21을 LBK (1% bacto-tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, 30 μ g/ml kanamycin) 액체 배지에 접종하여 37 $^{\circ}$ C, 250 rpm에서 O.D₆₀₀ = 0.6까지 진탕 배양 후 0.5 mM IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside)를 첨가하여 16 $^{\circ}$ C, 150 rpm에서 16시간 동안 CE를 발현시켰다.

Error-prone PCR에 의한 돌연변이 library 제조

CsCE의 유전자 염기서열 중 *ScaI*과 *EcoRI*으로 절단되는 H4-12 α -helix 구간에 대하여 돌연변이 library를 제작하기

위해 *ScaI*과 *EcoRI* 부위가 양말단에 삽입된 프라이머를 이용하여 GeneMorph II Random mutagenesis Kit (Agilent Technologies, USA)를 이용하여 무작위 돌연변이를 유발하였다. 무작위 돌연변이에 사용된 프라이머 서열은 5'-AGT ACT ATG AAG CAT CCG GGG A-3' (*ScaI*-mut-F)와 5'-CTC GAA TTC GTC AAC CCT TTT TAT TAT C-3' (*EcoRI*-mut-R)였으며, PCR 반응 조건은 95°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분의 주기로 30번을 반복하였다. PCR 후 얻어진 변형된 절편을 *ScaI*과 *EcoRI*으로 절단하고, 같은 제한효소로 절단한 주형의 pET28a-CsCE에 절단된 PCR 절편을 삽입한 후 *E. coli* BL21에 형질전환하여 돌연변이 library를 제작하였다.

열처리조건

재조합 *E. coli* BL21을 4°C에서 6000 × g으로 20분동안 원심분리기를 이용하여 회수한 뒤, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) 완충액을 이용하여 균을 현탁시키고 초음파분쇄기를 이용하여 균을 파쇄시켰다. 파쇄시킨 현탁액을 4°C에서 13,000 × g으로 20분 동안 원심분리 하여 상등액만 취하였다. 회수된 상등액을 65°C와 75°C 항온수조에서 40분 동안 정치시킨 뒤, 4°C에서 13,000 × g으로 20분 동안 원심분리하여 변성된 단백질을 제거한 후 상등액을 회수하였다.

담체 제조

CS-H^RCE를 발현시킨 *E. coli* BL21의 배양액을 5000 × g에서 20분간 원심분리 한 뒤, 상등액을 제거하고 wet cell weight (wcw)를 측정해서 각각 5, 10, 15, 20, 25% (w/v)의 비율로 세포를 0.01 M calcium acetate 용액에 현탁시켰다. 각 비율로 혼합시킨 용액과 3% sodium alginate를 55:45 (v:v) 비율로 혼합한 용액을 170 mM calcium acetate 용액이 담긴 비커에 혼합용액을 한 방울씩 떨어뜨려 바늘의 크기를 조절하여 지름 2.0, 2.8, 5.0 mm의 담체를 제조하였다. 제조된 담체는 4°C에서 12시간 경화시키고 반응 실험에 사용하기 전 멸균 증류수로 1-2회 세척한 뒤 사용하였다.

효소반응 및 담체를 이용한 락툴로오스 회분식 반응

CE 효소 반응은 기질농도에 대한 전환율 실험을 제외하고 50 mM PIPES (pH 7.5)에 용해된 20 g/l의 유당을 이용하여 65°C에서 1시간동안 반응시켜 분석하였다. 같은 조건에서 기질농도에 대한 전환율 실험에서는 기질의 농도를 20-200 g/l 범위에서 변화시켜 전환율을 측정하였다.

담체를 이용한 회분식 반응은 CS-H^RCE 효소를 함유한 재조합 균주를 이용하여 제조된 15%의 세포 고정화 담체를 50 mM PIPES (pH 7.5)에 20-300 g/l의 유당을 용해시킨 기질용액과 부피비로 1:1로 혼합하여 70°C에서 1-4시간 동

안 반응시켰다. 담체를 이용한 반복식 회분식 반응은 70°C에서 기질용액 200 g/l를 4시간 동안 배양 후 반응액을 회수하고 담체의 재사용을 위해 멸균증류수로 세척하고 다시 동일 조건에서 반응시키는 방법으로 6회 반복 실험을 진행하였다.

당분석방법

Alliance 2690 HPLC system과 Waters 2410 refractive index detector (Waters, USA)를 이용하여 유당과 락툴로오스, epilactose의 정량분석을 수행하였다. 분석에 사용된 컬럼은 HILICpak VG-50 4E column (Shodex, Japan)을 사용하였고, 42°C에서 전개용매(75% acetonitrile과 20% methanol, 5% 물)를 1 ml/min의 유속으로 20분 동안 흘려 분석하였다.

결과 및 고찰

미생물 유래 CE의 열내성 및 락툴로오스 전환수율비교

미생물 유래의 CE의 열내성과 효소활성을 비교하여 락툴로오스 전환에 유리한 효소를 선별하기 위하여 *B. coagulans* (Bc), *S. maltophilia* (Sm), *D. turgidum* (Dt), *S. thermophila* (St), *R. albus* (Ra), *R. marinus* (Rm), *C. saccharolyticus* (Cs) 균주로부터 분리된 유전자를 발현시킨 재조합 균주를 파쇄한 후 수득한 조효소액을 이용하여 락툴로오스 전환율을 비교하였다(Fig. 1). 대부분의 CE가 원통형으로 배열된 (α/α)₆ barrel 구조[5, 6]를 가지고 있기 때문에 65°C까지도 락툴로오스 전환율이 최대로 나타났다(Fig. 1A). 그러나 낮은 온도에서는 오히려 반응의 특이성이 높아 중간산물인 락툴로오스 보다는 최종산물인 epilactose 쪽으로 전환되는 경향을 보였다. 시험한 균주가운데 SmCE와 RmCE가 가장 열내성이 높게 나타났으나 가장 락툴로오스 전환율이 높은 CsCE의 경우 70°C에서 활성이 급격히 감소하는 경향을 나타내었다. 기질에 대한 영향에서는 모든 시험한 효소의 경우에서 기질의 농도가 증가할수록 서서히 감소하는 경향을 나타내었으며, 다른 효소들에 비해 CsCE가 비교적 높은 전환율을 보이며 감소하였다(Fig. 1B). 이 결과는 CsCE가 다른 효소에 비해 기질의 결합이 다른 효소에 비해 약하기 때문으로 사료되며, 이에 따라 최적의 락툴로오스 전환을 위한 효소의 개량을 위해 CsCE를 모효소로 선정하여 열내성 돌연변이 효소를 선별하고자 하였다.

Error-prone PCR 기술을 이용한 효소의 개량

CsCE의 경우 12개의 helix가 촘촘히 barrel을 형성하고 있으며 helix를 강화하는 잔기로 치환될 경우 더 높은 열내성을 나타내는 경우가 알려져 있다(Fig. S1A) [11, 12]. 즉 열내성의 향상을 위해서 특정한 부위의 돌연변이 보다는 전체

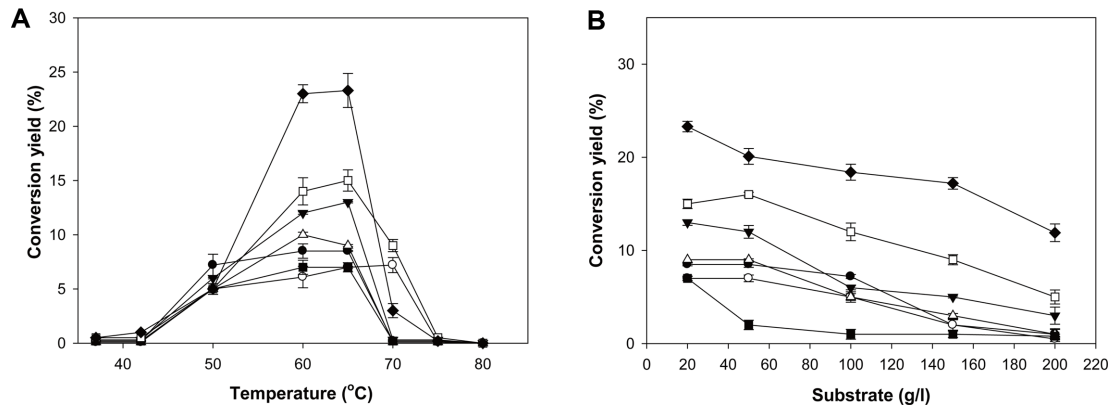


Fig. 1. Conversion of lactose into lactulose using CEs from various strains (A) Conversion yield of lactulose as a function of temperature. Each 50 μ g of crude enzyme was incubated with 20 g/l substrate solution at the range of 25–85 $^{\circ}$ C for 1 h. (B). Conversion yield of lactulose as a function of lactose concentration. Each 50 μ g of crude enzyme was incubated with 20–200 g/l substrate solution at 65 $^{\circ}$ C for 1 h. ●, *B. coagulans* (BcCE); ○, *S. maltophilia* (SmCE); ▼, *D. turgidum* (DtCE); △, *S. thermophila* (StCE); ■, *R. albus* (RaCE); □, *R. marinus* (RmCE); ◆, *C. saccharolyticus* (CsCE). Values are means \pm s.d. of triplicate experiments performed at the same time.

구조가 열 내성을 가질 수 있는 단단한 구조가 되어야 한다는 것을 의미한다. 따라서 부분적인 변정보다는 전체적인 범위에서 1–2개 정도의 아미노산의 돌연변이가 효소의 활성을 유지하면서 열내성을 증진시킬 수 있는 가능성이 높다.

열내성 돌연변이 유발을 위해 CsCE의 helix 4부터 12까지의 구간에 대해 error-prone PCR을 통해 돌연변이를 유발시켜 Fig. S1B에서 보는 바와 같이 다양한 위치에 돌연변이를 포함한 효소를 선별하였다. 이와 같이 1개 이상 아미노산의 돌연변이가 확인된 균주에 대하여 조효소액을 추출하여 65 $^{\circ}$ C와 75 $^{\circ}$ C에서 각각 40분간 열처리한 단백질의 열안정성과 이에 따른 락툴로오스 전환율을 확인하였다(Fig. 2). 모효소의 경우 65 $^{\circ}$ C에서 75 $^{\circ}$ C로 온도를 올렸을 때 거의 단백질

band가 확인되지 않았다. 이 현상은 열처리 후 변성이 일어날 경우 변성단백질응집으로 인해 상등액회수 단계에서 침전으로 제거되어 일어났을 것으로 사료된다. 이에 비해, L239H 돌연변이는 열안정성이 증가하여 75 $^{\circ}$ C 처리 후에도 효소 band가 확인되었다(Fig. 2). 그러나 락툴로오스 전환율은 모효소에 비해 70% 수준으로 감소되었다. E174D 돌연변이는 열내성은 증가하지 않아 단백질의 분해가 확인되었고 전환율도 전혀 나타나지 않았다. K201R, L330S는 201번 lysine과 330번 leucine이 각각 arginine, serine으로 바뀌었으며 열안정성은 증가하였으나 전환효율이 모효소의 60% 정도로 감소하였다. Q322L, E362D 돌연변이는 322 glutamine이 leucine으로, 362 glutamic acid가 aspartic acid로 바뀌었으

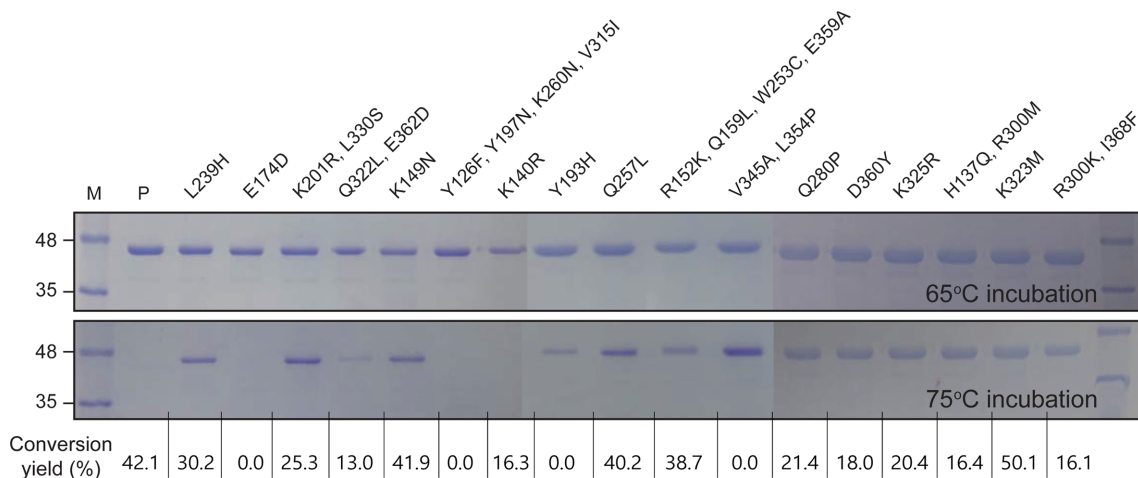


Fig. 2. Comparison of thermostability and conversion yield using CE mutants generated by error-prone PCR. SDS-PAGE analysis of heat-treated CE mutants at 65 $^{\circ}$ C and 75 $^{\circ}$ C. Conversion yield of lactulose using crude enzyme of CE mutants (20 g/l lactose at 65 $^{\circ}$ C for 1 h). See Supplementary Fig. S4 for uncropped versions of the SDS-PAGE images.

며, 열 안정성은 조금 증가했지만 전환효율은 모효소의 30% 수준이었다. K149N 돌연변이는 열내성은 증가하였고 전환효율도 모효소의 90% 수준을 유지하였다. Y126F, Y197N, K260N, V315I 돌연변이는 4군데의 아미노산이 바뀌면서 열내성도 나타나지 않았고 전환율도 0%로 전혀 효소활성이 나타나지 않았다. K140R 돌연변이는 열내성은 증가하지 않고 전환율 또한 60% 수준으로 감소하였다. Y193H 돌연변이는 전환효율이 0%로 활성을 보이지 않았다. Q257L 돌연변이는 모효소와 비슷한 수준(95%)의 전환활성을 보이면서 열내성이 동시에 증가하였다. 152 arginine, 159 glutamine, 253 tryptophan, 359 glutamic acid가 각각 lysine, leucine, cysteine, alanine으로 바뀐 돌연변이도 모효소와 비슷한 전환율을 유지하면서 열내성이 증가된 것을 확인하였다. 두 군데의 아미노산이 바뀐 돌연변이(345 valine이 alanine으로, 354 leucine이 proline으로)는 열내성은 증가하여 band가 확인 되었지만 전환율은 0%로 활성은 확인 되지 않았다. 선별된 돌연변이중 유일하게 323 lysine이 methionine으로 전환된 K323M 돌연변이는 열내성 증가와 함께 기존 모효소에 비해 전환율도 기존 전환율 대비 15% 가량 상승된 전환율(50.1%)을 보였다. 나머지 돌연변이는 모두 열내성은 증가하였으나 모효소에 비해 60% 수준으로 전환율이 감소하였다. 이중 열내성만 향상된 균주 K149N 돌연변이를 CS-H^R로 명명하고, 열내성과 전환율이 향상된 K323M 돌연변이를 CS-H^{RC}로 명명하여 이후 시험에 사용하였다.

선별된 효소의 활성

열내성이 향상된 CS-H^R와 열내성과 전환율이 향상된 CS-H^{RC}를 이용하여 농도에 따른 전환율을 비교하였을 때 두 균주 모두 농도에 따라 감소되는 양상은 유사하게 나타났으며, CS-H^{RC}의 경우 농도 전반에 걸쳐 전환율이 모균주에

비해 향상되었음을 확인하였다(Fig. 3A).

온도에 대한 경향성을 확인하기 위해 37°C부터 85°C까지 20 µg 조효소액을 이용하여 유당 20 g/l를 1시간 동안 온도별로 반응시킨 후 전환율을 비교한 결과 CS-H^R은 내열성만을 보여준 반면, CS-H^{RC}는 전환율과 내열성을 잘 유지하고 있는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3B). 두가지 돌연변이를 함께 적용한 돌연변이 효소는 CS-H^{RC}와 유사한 특성을 보였으나 다소 열안정성이 CS-H^{RC}보다 낮아(data not shown) 최종선별균주로 CS-H^{RC}를 선정하였으며, 70°C를 최적온도조건으로 선정하여 이후 실험에 적용하였다. CS-H^{RC} 담체를 제조하기 전에 조효소액의 단백질 농도를 결정하기 위하여 효소량을 점차로 증가시켜 반응이 포화될 수 있도록 시험하였다. 70°C에서 20 g/l의 유당과 1시간 반응시켰을 경우 조효소액 250 µg를 사용하였을 때 최대 전환율을 나타내었다. 그 이상의 농도에서는 전환율이 크게 변하지 않음을 알 수 있었으며, 모효소는 56 ± 5.1%, CS-H^{RC}는 60 ± 3.7%의 전환율을 보였다(Fig. S2)

담체제작 및 담체를 이용한 락툴로오스 전환

락툴로오스전환을 위한 담체를 제조하기 위하여 CS-H^{RC}를 포함하고 있는 균주를 이용하여 담체제조에 사용하였다. 각각 다른 세포량을 이용하여 지름 5 mm 담체를 제조하였다. 5% (wet cell weight(wcw))에서 25% (wcw)까지 각각 다른 세포 함량을 이용하여 제조된 담체를 70°C에서 20 g/l 유당과 시간별로 희분식으로 반응시켜 함량비에 따른 차이를 비교하였다. 각각의 담체반응물의 전환율을 확인한 결과 담체간 차이는 크지 않았으나 그 가운데 15% (wcw)의 세포로부터 제조된 담체가 가장 높은 전환율을 보였다(Fig. 4A).

담체의 크기에 따른 락툴로오스의 전환수율에 대한 영향을 알아 보기 위해 15%의 세포로부터 담체의 지름을 각각 2.0,

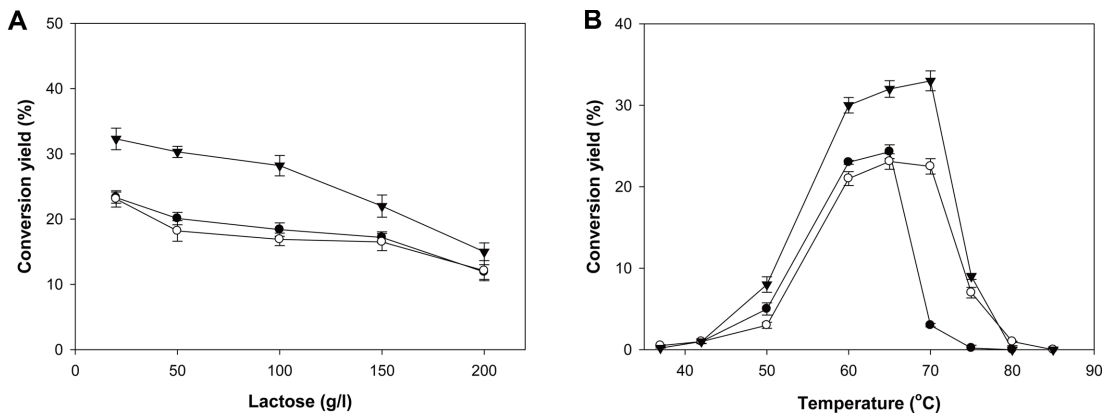


Fig. 3. Effect of lactose concentration and temperature on conversion yield of lactulose using crude enzyme prepared from CS-parent (●), CS-H^R mutant (○) and CS-H^{RC} (▼). (A) Effect of lactose concentration. Each 50 mg of crude enzyme was incubated with 20–200 g/l substrate solution at 65°C for 1 h. (B) Effect of reaction temperature. Each 50 mg of crude enzyme was incubated with 20 g/l substrate solution at the range of 25–85°C for 1 h. Values are means ± s.d. of triplicate experiments performed at the same time.

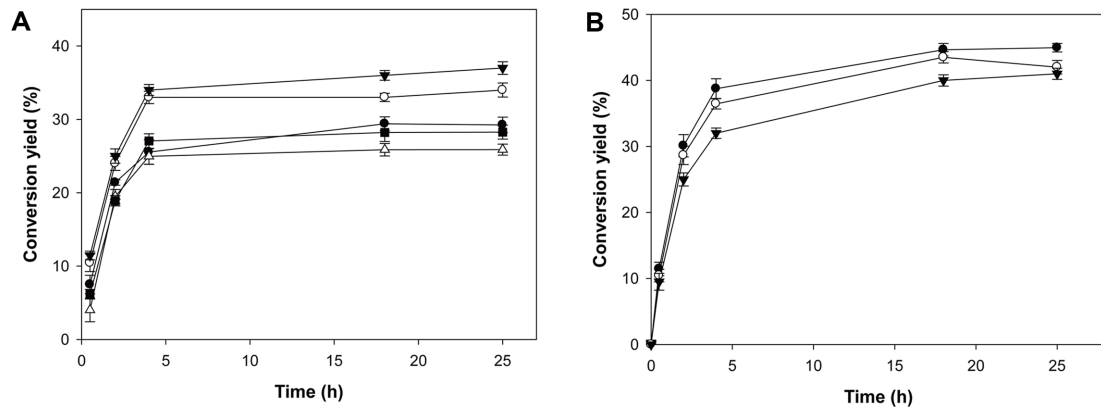


Fig. 4. Optimization of preparing cell bead. (A) Effect of cell quantity on conversion yield. Cells were quantified by measuring wet cell weight (wcw) after cell harvest. The immobilized cell bead was incubated with 20 g/l of substrate solution at 70 °C. Wet cell weight (%): ●, 5; ○, 10; ▼, 15; △, 20; ■, 25. (B) Effect of bead size on conversion yield. The different sized immobilized cell bead (15%) was incubated with 20 g/l of substrate solution at 70 °C. Bead size (mm): ●, 2.0; ○, 2.8; ▼, 5.0. Values are means \pm s.d. of triplicate experiments performed at the same time.

2.8, 5.0 mm의 세가지 크기로 제작하였다. 그 결과, 2.0 mm와 2.8 mm의 담체를 비교하여 보았을 때 락툴로스 생산 속도는 크게 차이를 보이지 않았으나 담체 직경이 작은 경우 (2.0 mm), 5.0 mm 담체보다 상대적으로 다소 빠른 변환속도를 보였다(Fig. 4B).

유당으로부터 락툴로오스의 전환 연구에서 중요한 목표 중 하나는 유당의 용해도가 허용되는 수준의 농도에서 최대한 전환 수율을 가지는 조건을 확립하는 것이다. 알려진 바에 따르면 유당의 용해도를 살펴보면 온도가 올라감에 따라 용해도가 증가하며, 선별효소의 최적반응온도인 70°C에서 445 g/l까지 녹을 수 있다(Fig. S3). 유당의 용해도 곡선에 따라 현재 선별된 효소를 함유한 균주를 이용하여 제조된 고정화 담체를 70°C 조건에서 20 g/l부터 최대 300 g/l 유당과 반응시켜 각각에 대한 전환율을 측정하였다(Table 1). 그 결과 유당 200 g/l 조건까지 40% 이상의 전환율을 보였으나 그 이상의 농도에서는 전환율이 40% 이하로 감소하였다. 유당 반응농도와 전환율간에 최적화가 필요하지만 정제과정시 냉각법에 의한 결정화법으로 유당과 락툴로오스의 혼합액을 정제할 경우 효율적인 분리를 위해 최소 40% 이상의 락툴로오스의 전환율이 필요하다[15]. 따라서 고농도의 기질을 사용하는 것이 일반적으로 유리하지만 정제시 결정단계를 고려하여 40% 이상의 전환율을 유지할 수 있는 유당의 최적 반응 농도를 200 g/l로 결정하였다. 고농도에서 시간에 따른 락툴로오스 전환 시험을 위하여 결정된 조건을 토대로 최적 온도 70°C, 유당농도 200 g/l 조건에서 15% 세포 이용하여 포괄법으로 담체를 만들어 회분식으로 교반하면서 4시간 동안 반응시켰다. 유당은 서서히 감소하여 락툴로오스와 epilactose로 전환되었으며, 이때 락툴로오스로의 최종 전환

Table 1. Effect of lactose concentration on conversion yield of lactulose using immobilized cell bead (CS-H^RC^E).

Lactulose (g/l) ^a	Conversion yield (%)
20	45 \pm 2.1
60	44 \pm 1.3
100	43 \pm 1.1
200	41 \pm 1.4
300	35 \pm 1.9

^aThe immobilized cell bead (15% (w/v)) was incubated with 20–300 g/l of substrate solution at 70 °C for 1 h.

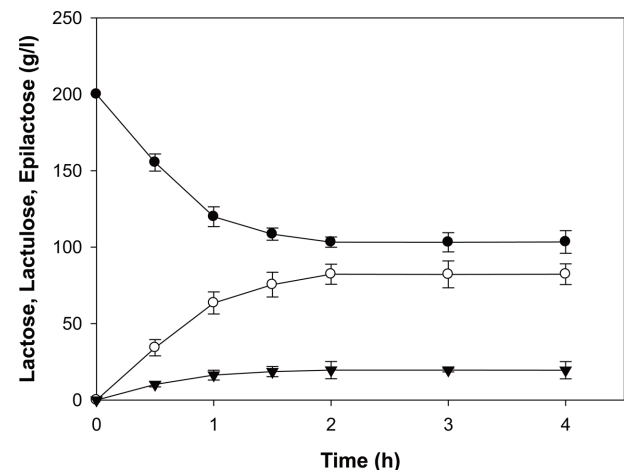


Fig. 5. Conversion of lactose into lactulose in batch process using immobilized cell bead (CS-H^RC^E). The immobilized cell bead (15%) was incubated with 200 g/l of substrate solution at 70 °C for 4 h. ●, lactose; ○, lactulose; ▼, epilactose. Values are means \pm s.d. of triplicate experiments performed at the same time.

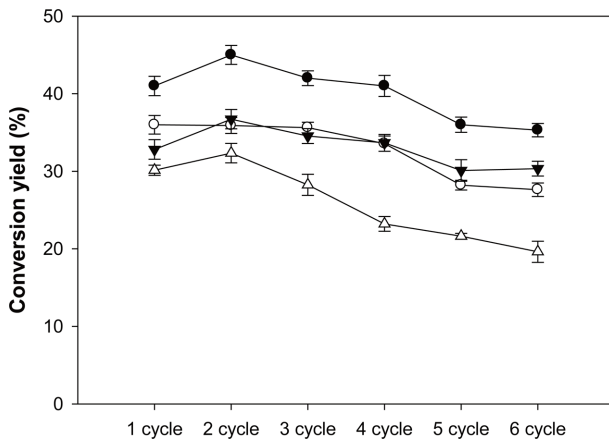


Fig. 6. Conversion of lactose into lactulose using immobilized cell bead (CS-H^{RC}E) in repeated-batch process. After reacting with 20-300 g/l of lactose at 70 °C for 4 h, beads were washed with reaction buffer and adjusted to next batch. Lactose (g/l): ●, 20 g/l; ○, 100 g/l; ▼, 200 g/l; △, 300 g/l. Values are means \pm s.d. of triplicate experiments performed at the same time.

율은 약 2시간 이후에 평형에 도달하여 $48.6 \pm 3.39\%$ 로 나타났다(Fig. 5). Epilactose 역시 $9.81 \pm 2.83\%$ 전환되어 2시간 이후 평형에 도달하였을 때, 최종 평균 혼합액의 비는 42 : 48 : 10 (유당 : 락툴로오스 : epilactose)로 분석되었다.

담체의 반복사용을 위해 4시간 간격으로 기질을 순환하여 반복회분식 반응을 수행한 결과 반복횟수가 증가할수록 전환수율이 낮아졌으나 4회 반복실험까지는 최대전환율대비 80% 이상을 유지하면서 서서히 감소하였다(Fig. 6). 전반적으로 기질농도에 따라 다소 차이를 보였으나 200 g/l 이하에서는 비교적 덜 영향을 받는 것으로 나타났다.

현재까지 다양한 균주로부터 정제된 CE에서도 비교적 높은 전환수율 또는 열안정성을 보여준 사례가 있으며 이에 대한 특성을 보고한 바가 있다[9, 10, 17]. 그러나 높은 전환수율과 열안정성을 동시에 가지는 효소에 대한 보고는 많지 않다. 본 연구에서는 열에 대한 내성 및 전환율이 개선된 효소를 선별하여 발현시킨 대장균을 포괄법으로 고정화시켜 고온에서 락툴로오스를 전환하는 연구를 수행하였다. 효소정제과정이 필요없는 간단한 처리를 통해 효소고정화보다 경제적인 세포의 고정화로 담체를 제조하여 고온반응조건에서 CE를 제외한 나머지 효소들의 실패를 유도하고 락툴로오스 전환을 유도하는 실제적인 공정을 제안하였다. 특히 열내성 특성을 활용하여 조효소액을 열처리한 후 변성단백질을 제거한 경우 상당히 높은 정제순도를 나타냈다(Fig. S4). 따라서 전세포를 고정화하는 방법 이외에 세포를 열처리한 후 얻어진 효소파쇄액을 고정화하는 방법도 가능하다고 사료된다. 본 연구의 결과를 토대로 앞으로 담체의 안정성을 높이고,

담체를 이용한 최적 반응기를 구현하는 추가적인 연구와 함께 전세포 및 효소파쇄액 형태의 고정화를 통해 향후 산업화가 가능한 수준의 경제성있는 공정을 개발할 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

락툴로오스는 기존에 화학적인 이성화법을 통해 생산해왔던 기능성 당으로서 프로바이오틱스나 장내균총 개선을 위한 의약품으로 활용되어 왔다. 최근 락툴로오스 화학전환법의 단점인 촉매제거와 부산물제거 에너지손실등의 문제를 해결할 수 있는 생물촉매를 이용한 락툴로오스 전환법이 대두되었다. 본 연구에서는 유당의 낮은 용해도와 락툴로오스의 효율적전환을 위해 최적의 효소를 선별하여 무작위 돌연변이법으로 유전자를 개량하여 열내성이 75°C까지 증진되고 활성이 1.3배 향상된 효소를 선별하였다. 이 효소를 정제하여 사용하는 대신 본 연구에서는 과량 발현시킨 대장균을 Ca-alginate로 고정화하여 70°C에서 200 g/l의 유당과 회분식으로 반응시켜 43%의 전환 수율을 확인하였다. 반복회분식 실험에서 고정화된 담체는 비교적 안정적이었으며 4회 반복반응 후에도 80% 이상의 활성을 유지하고 있었다. 산업적인 방법을 개발하기 위해 고정화 담체를 이용한 반응기의 운전 최적화와 담체의 안정화를 증진시키는 추가적인 연구가 필요하지만, 본 연구에서는 열내성 특성을 이용하여 정제된 효소가 아닌 효소를 발현하는 세포자체를 고정화 시킴으로써 경제성있는 생산에 대한 방법론을 제시하였다.

Acknowledgments

This work was carried out with the support of "Cooperative Research Program for Agriculture Science & Technology Development (Project No. PJ01224201)" Rural Development Administration, Republic of Korea.

References

- Aider M, de Halleux D. 2007. Isomerization of lactose and lactulose production: review. *Trends in Food Sci. Technol.* **18**: 356-364.
- Aissa AA, Aider M. 2014. Electro-catalytic isomerization of lactose into lactulose: The impact of the electric current, temperature and reactor configuration. *Int. Dairy J.* **34**: 213-219.
- Claeys WL, Ludikhuyze LR, Hendrickx ME. 2001. Formation kinetics of hydroxymethylfurfural, lactulose and furosine in milk heated under isothermal and non-isothermal conditions. *J. Dairy Res.* **68**: 287-301.
- de la Fuente MA, Juárez M, de Rafael D, Villamiel M, Olano An. 1999. Isomerization of lactose catalyzed by alkaline-substi-

- tuted sepiolites. *Food Chem.* **66**: 301-306.
5. Fujiwara T, Saburi W, Inoue S, Mori H, Matsui H, Tanaka I, et al. 2013. Crystal structure of Ruminococcus albus cellobiose 2-epimerase: structural insights into epimerization of unmodified sugar. *FEBS Lett.* **587**: 840-846.
 6. Fujiwara T, Saburi W, Matsui H, Mori H, Yao M. 2014. Structural insights into the epimerization of beta-1,4-linked oligosaccharides catalyzed by cellobiose 2-epimerase, the sole enzyme epimerizing non-anomeric hydroxyl groups of unmodified sugars. *J. Biol. Chem.* **289**: 3405-3415.
 7. Hua X, Yang R, Shen Q, Ye F, Zhang W, Zhao W. 2013. Production of 1-lactulose and lactulose using commercial β -galactosidase from Kluyveromyces lactis in the presence of fructose. *Food Chem.* **137**: 1-7.
 8. Kim Y-S, Kim J-E, Oh D-K. 2013. Borate enhances the production of lactulose from lactose by cellobiose 2-epimerase from Caldicellulosiruptor saccharolyticus. *Bioresour. Technol.* **128**: 809-812.
 9. Kim Y-S, Park C-S, Oh D-K. 2006. Lactulose production from lactose and fructose by a thermostable β -galactosidase from Sulfolobus solfataricus. *Enzyme Microb. Technol.* **39**: 903-908.
 10. Kim YS, Oh DK. 2012. Lactulose production from lactose as a single substrate by a thermostable cellobiose 2-epimerase from Caldicellulosiruptor saccharolyticus. *Bioresour. Technol.* **104**: 668-672.
 11. Kumar P, Islam A, Ahmad F, Satyanarayana T. 2010. Characterization of a neutral and thermostable glucoamylase from the thermophilic mold Thermomucor indicae-seudaticae: activity, stability, and structural correlation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **160**: 879-890.
 12. Liu HL, Wang WC. 2003. Protein engineering to improve the thermostability of glucoamylase from Aspergillus awamori based on molecular dynamics simulations. *Protein. Eng.* **16**: 19-25.
 13. Mateo C, Palomo JM, Fernandez-Lorente G, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R. 2007. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb. Technol.* **40**: 1451-1463.
 14. Mayer J, Kranz B, Fischer L. 2010. Continuous production of lactulose by immobilized thermostable β -glycosidase from Pyrococcus furiosus. *J. Biotechnol.* **145**: 387-393.
 15. Panesar PS, Kumari S. 2011. Lactulose: production, purification and potential applications. *Biotechnol. Adv.* **29**: 940-948.
 16. Paseephol T, Small DM, Sherkat F. 2008. Lactulose production from milk concentration permeate using calcium carbonate-based catalysts. *Food Chem.* **111**: 283-290.
 17. Sato H, Saburi W, Ojima T, Taguchi H, Mori H, Matsui H. 2012. Immobilization of a thermostable cellobiose 2-epimerase from Rhodothermus marinus JCM9785 and continuous production of epilactose. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **76**: 1584-1587.
 18. Schuster-Wolff-Bühning R, Fischer L, Hinrichs J. 2010. Production and physiological action of the disaccharide lactulose. *Int. Dairy J.* **20**: 731-741.
 19. Seki N, Saito H. 2012. Lactose as a source for lactulose and other functional lactose derivatives. *Int. Dairy J.* **22**: 110-115.
 20. Song YS, Lee HU, Park C, Kim SW. 2013. Batch and continuous synthesis of lactulose from whey lactose by immobilized β -galactosidase. *Food Chem.* **136**: 689-694.
 21. Song YS, Suh YJ, Park C, Kim SW. 2013. Improvement of lactulose synthesis through optimization of reaction conditions with immobilized β -galactosidase. *Korean J. Chem. Eng.* **30**: 160-165.
 22. Tyler T, Leatherwood J. 1967. Epimerization of disaccharides by enzyme preparations from Ruminococcus albus. *Archiv. Biochem. Biophys.* **119**: 363-367.
 23. Wang M, Yang R, Hua X, Shen Q, Zhang W, Zhao W. 2015. Lactulose production from lactose by recombinant cellobiose 2-epimerase in permeabilised Escherichia coli cells. *International J. Food Sci. Technol.* **50**: 1625-1631.
 24. Zokaee F, Kaghazchi T, Zare A, Soleimani M. 2002. Isomerization of lactose to lactulose—study and comparison of three catalytic systems. *Process Biochem.* **37**: 629-635.