pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 35, No. 1, pp. 83~92 (2020)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2020.35.1.83

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

쌀가루로부터 이소말토올리고당 제조를 위한 효소반응 최적 조건

박지인 · 신지영 · 양지영*
부경대학교 식품공학과

Optimum Conditions of Enzymatic Reactions for Production of Isomaltooligosaccharides from Rice Flour

Ji-in Park, Jiyoung Shin, Ji-young Yang*
Department of Food Science and Technology, Pukyoung National University, Busan, Korea

(Received December 20, 2019/Revised January 14, 2020/Accepted February 7, 2020)

ABSTRACT - This study investigated the optimal conditions of enzymatic reaction for production of isomaltooligosaccharides (IMO) using rice flour. To manufacture IMO, commercial enzymes (Termamyl 2X, Maltogenase L, Promozyme D2, Fungamyl 800L and Transglucosidase L) were used. The sugar composition and amount of IMO were examined by HPLC with charged aerosol detector (HPLC-CAD) in each manufacturing process. Liquefaction reaction was performed according to different Termamyl 2X concentrations (0.025%, 0.05%, 0.075%, 0.1%) and reaction times (1 h, 2 h). As a result, the reducing sugar content was the highest at 138.26 g/L when 0.075% Termamyl 2X was added for 2 hours. In order to optimize simultaneous saccharification and transglucosylation, experiments on enzyme selection, enzyme concentration and enzyme reaction time were conducted. Reaction with 0.0015% Maltogenase L, 0.05-0.1% Promozyme D2 and 0.1% Tansglucosidase L was effective in decreasing glucose content and increasing content of IMO with a high degree of polymerization. A change in sugar content was observed every 6 hours to determine the optimal reaction time, and the highest IMO was produced after 36 hours of reaction (75.36 g/L). The IMO prepared under optimal conditions showed isomaltose, 35.11 g/L; panose, 11.97 g/L; isomaltotriose, 19.95 g/L; isomaltotetraose, 7.46 g/L; isomaltopentaose, 1.05 g/L at 18 brix and the ratio of IMO in the total sugar was 56.37%.

Key words : Isomaltooligosaccharides, Rice flour, Enzymatic reaction, HPLC

쌀은 벼과에 속하는 식물로 밀, 보리와 함께 세계적으로 중요한 농산물이다. 쌀은 탄수화물, 단백질, 지방, 식이섬유, 미네랄 등의 영양성분이 함유되어 있으며 한국인의 주요 에너지원으로 이용되고 있다. 하지만 국민소득 향상 및 생활 습관의 변화로 식생활이 서구화되기 시작하면서 쌀 소비량은 감소하기 시작하였고, 1986년 1인 기준 쌀 소비량은 127.7 kg이었지만, 2018년 1인당 쌀 소비량은 연간 61.0 kg으로 1986년 소비량의 절반 수준으로 감소하였다[1]. 또한 햅쌀의 수요가 높기 때문에 묵은 쌀의 재고 처리가 어려우며 그 재고량이 적정 수준을 넘고 있어 문제로 대두되고 있다. 국내 제조업 부문 쌀 소비량은 가공 산업의 75% 이상이 주정(24.8%), 떡류(22.8%), 도시락 및 식사용 조리식품(19.5%), 탁주 및 약주(8.0%)를 제조하는 데 편중되어 있으며[1], 그 중 도시락용 쌀 수요가 증가하고 있지만 주로 햅쌀을 사용하기 때문에 비축하고 있는 쌀을 소비할 수 있는 새로운 쌀 수요 창출이 요구되며, 다양한 쌀 가공식품의 개발이 필요한 실정이다. 또한 당류 제조업에 사용되는 쌀의 소비량은 계속해서 감소하고 있고, 대부분 물엿의 원료로 사용되고 있다. 그러나 건강에 대한 소비자들의 관심이 높아지고 있어 물엿보다는 올리고당의 소비가 증가하고 있기 때문에 쌀을 이용한 기능성 올리고당 제품의 개발이 필요하다.

이소말토올리고당(isomaltooligosaccharides)은 포도당 분자가 α-1,6 결합을 하고 있는 분지올리고당으로, 대표적으로 isomaltose, isomaltotriose, isomaltotetraose 등이 있다. 화학적으로는, 이소말토올리고당은 오직 α-1,6 결합만으로 구성된 글루코실 당류이지만 시장에서 판매되는 이소말토올리고당은 panose, isopanose와 같은 하나 이상의 α-1,6 결합을 갖는 모든 글루코실 당류를 포함한다[2]. 이소말토

*Correspondence to: Ji-young Yang, Department of Food Science and Technology, Pukyong National University, Busan 48513, Korea
Tel: +82-51-629-5828, Fax: +82-51-629-5824
E-mail: jyyang@pknu.ac.kr

올리고당에 대한 다양한 생리학적 기능성들이 연구되었는데, 장내 효소에 의해 서서히 분해되기 때문에 혈당지수를 낮추며[3], 장내 유익균들을 증식시켜 정장작용을 촉진시키고, 면역기능을 향상시키며 일부 미네랄의 생체 이용률을 높이고, 중성지방의 신진대사를 촉진하고[4], 혈중 콜레스테롤을 개선하는 등[5]의 효과가 있다고 보고되었다. 또한 이소말토올리고당은 열 안정성, 저점도, 높은 보습성 등의 특징으로 식품에 광범위하게 응용이 가능하고 효모에 의해 발효되지 않아 제과제빵이나 주류 등에 감미료로 사용이 가능하다[6]. 이에 따라 기능성 식품소재로 주목받고 있으며, 설탕 대체 천연감미료 시장이 지속적으로 성장하고 있는 추세이기 때문에 그 소비도 계속 늘어나고 있다.

이소말토올리고당을 생산하는 공정은 일반적으로 α-amylase를 통한 전분의 액화, β-amylase에 의한 액화된 전분의 당화, 그리고 당화된 당액(맥아당이나 말토올리고당)에 transglucosylase를 이용한 전이의 3단계 과정을 거친다. 그러나 시간 단축 및 효율성을 높이기 위해 다양한 연구가 보고되고 있다. 당화·전이반응을 동시에 진행하는 연구가 활발히 이루어지고 있으며[7,8,9,10], 이러한 공정은 당화반응과 전이반응을 순차적으로 진행했을 때 보다 이소말토올리고당의 수율을 더욱 증가시키고 glucose의 함량은 감소되었다는 연구 결과가 있다[7]. 유전자 변형으로 생산된 효소를 가지고 이소말토올리고당의 수율을 높일 수 있었지만 미생물학적 안전성 확보 문제와 경제적인 문제로 인하여 산업적인 응용은 어렵다. 또한 제조과정 중의 이소말토올리고당 및 말토올리고당의 함량 변화를 자세히 다룬 연구 결과가 많지 않다. 따라서 쉽게 접근할 수 있는 효소를 이용한 이소말토올리고당 제조법의 최적화 연구가 필요하다.

본 연구에서는 쌀을 원료로 하여 이소말토올리고당을 제조하기 위해 액화반응, 당화·전이 반응의 최적 조건을 조사하였다. 이를 위하여 효소 종류, 효소 농도, 반응 시간에 변화를 주어 이소말토올리고당을 생산하였으며, 조건별로 당 조성 및 함량을 분석하여 가장 효율적인 효소 반응 조건을 탐색하였다.

Materials and Methods

재료

실험에 사용된 쌀가루는 시중에서 판매되고 있는 쌀 함량 100%의 국산 쌀가루를 사용하였다. 쌀가루의 입자 크기는 180-250 μm이었다. 액화에 사용된 효소는 α-amylase인 Termamyl 2X (Novozymes, Copenhagen, Denmark)를 사용하였다. 당화에 사용된 효소는 β-amylase인 Maltogenase L (Novozymes)와 α-1,6 글루코시드결합을 가수분해하는 pullulanase인 Promozyme D2 (Novozymes), α-amylase인 Fungamyl 800L (Novozymes)을 사용하였다. 당 전이에 사용된 효소는 Transglucosidase L (Amano, Nagoya, Japan)을 사용하였다. 효소는 건조 기질 대비량(v/w)으로 첨가해 주었으며, 실험에 사용된 상업용 효소의 최적 활성 조건 및 유래는 Table 1과 같았다.

쌀가루의 액화 반응

쌀가루와 증류수를 1대 4의 비율로 혼합하여 분산시킨 후, 칼슘 이온이 70 ppm이 되도록 $CaCO_3$를 첨가하고, 1 N HCl를 사용하여 pH 6.0-6.4 로 조정하였다. 쌀가루 슬러리가 담긴 샘플병을 항온수조에 넣고 진탕하다가 60°C가 되면 Termamyl 2X를 첨가하여 급격한 호화를 방지하였다. Termamyl 2X을 기질 대비 0.025%, 0.05%, 0.075%, 0.1%씩 농도별로 첨가하고 95°C가 되는 순간부터 1시간마다 액화액을 채취하였고, -80°C에서 냉동보관 하여 이후에 환원당 측정에 사용하였다.

이소말토올리고당(IMO)의 제조

IMO의 제조를 위하여 당화 및 전이효소를 동시에 첨가하였다. 액화액의 온도를 55℃로 냉각시킨 후 당화효소와 전이효소의 공통조건으로 pH와 온도를 조절하였다.

최적의 효소를 탐색하기 위해 Pan 등[11]의 방법을 응용하여, 다음의 3가지 실험군을 설정하였다. 첫 번째 실험군은 액화액을 제조한 후 Transglucosidase L을 0.1%(v/w) 첨가한 것이고(T+TG), 두 번째 실험군은 액화액을 제조한 후 Maltogenase L, Promozyme D2, Transglucosidase L을 각각 0.1%(v/w) 첨가한 것이고(MP+TG), 세 번째 실험군

Table 1. Optimal condition of each enzyme for liquefaction, saccharification and transglucosylation reaction

Enzyme	Optimal conditions		Company	Manufacture Origin
	Temp. (°C)	pH		
Termamyl 2X	90-100	6.0-6.4	Novozymes	*Bacillus licheniformis*
Maltogenase L	55-65	4.5-5.5	Novozymes	*Bacillus subtilisamyloliquefaciens*
Promozyme D2	55-60	4.2-5.4	Novozymes	*Bacillus acidopullulyticus*
Fungamyl 800 L	53-58	5.0-6.0	Novozymes	*Aspergillus niger*
Transglucosidase L	55-60	5.0-5.5	Amano	*Aspergillus niger*

Table 2. Condition of enzyme concentration added to liquefying slurry

Sample	Enzyme concentration (%)		
	Maltogenase L	Promozyme D2	Transglucosidase L
M 0.0015	0.0015	0.15	0.1
M 0.015	0.015	0.15	0.1
P 0.0015	0.15	0.0015	0.1
P 0.015	0.15	0.015	0.1
TG 0.01	0.15	0.15	0.001
TG 0.1	0.15	0.15	0.01
MAX	0.15	0.15	0.1

은 액화액을 제조한 후 Fungamyl 800L, Transglucosidase L을 각각 0.1%(v/w) 첨가한 것이다(F+TG). 각 실험군들을 24시간 반응시켜 생성된 IMO의 함량을 조사하였다.

최적 효소농도를 설정하기 위해 Maltogenase L, Promozyme D2, Transglucosidase L의 농도를 다르게 하여 7가지 실험군을 설정하였으며, 그 조건은 Table 2와 같았다. 각 효소의 역할을 알아보기 위하여 3개 중 2개의 효소는 상업적 정량을 첨가하였고, 나머지 하나의 효소는 정량의 10배 및 100배로 희석하여 첨가하였다. 또한 3가지 효소 모두 정량을 첨가한 실험군(MAX)을 두어 비교할 수 있게 하였다. 이들을 60°C에서 1, 4.5, 9, 18 및 36시간 동안 반응시켰고, IMO 함량을 분석하였다.

최적 효소반응 시간을 설정하기위해 액화액에 0.0015% Maltogenase L, 0.075% Promozyme D2, 0.1% Transglucosidase L을 첨가하여 60°C에서 72시간 동안 반응시켰으며, 6시간마다 당화액을 채취하여 IMO 함량을 측정하였다.

환원당 측정

환원당은 DNS (3,5-dinitrosalicylic acid) 방법[12]으로 측정하였다. 시험관에 액화액 1 mL와 DNS시약 3 mL를 넣고 95°C에서 5분간 반응 시킨 후 증류수를 첨가하여 냉각시켰다. 희석한 시료를 microplate reader (Epoch2, Biotek, Winooski, VT, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선을 작성하기 위해 맥아당을 표준물질로 하여 회귀방정식을 구하였으며, 이를 이용해 시료의 환원당 함량을 계산하였다.

HPLC-CAD를 이용한 올리고당 분석

정량분석에 사용되는 표준물질 중 glucose, maltose, isomaltose, panose, isomaltotriose는 Sigma (Saint Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, maltotriose, maltotetraose, maltopentaose, maltohexaose, maltoheptaose, maltooctaose, maltononaose는 Elicityl Oligotech (Crolles, France)에서 구입하였으며, isomaltotetraose, isomaltopentaose는 Toronto Research Chemicals (North York, Cananda)에서 구입하였으며, isomaltohexaose는 Carbosynth (Berkshire, UK)에서 구입하였다. 검량선 작성을 위한 표준용액의 조제를 위해 각 표준물질을 10,000 mg/L 용액으로 제조하였고, 이들을 동량으로 혼합 및 희석하여 사용하였다. 표준용액 및 쌀 당화액은 0.45 μm syringe filter (Advantec, Toyo, Japan)를 이용하여 여과한 후 최종시료로 사용하였다. 말토올리고당과 이소말토올리고당의 정량분석을 위한 기기는 HPLC (UltiMate 3000, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA., USA)가 사용되었고, 검출기로는 Charged Aerosol Detector (Corona Veo RS, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham. MA, USA)가 사용되었다. 컬럼은 HILICpak VG-50 4E (Shodex, Tokyo, Japan)을 사용했으며, 분석 조건은 Table 3과 같았다.

Table 3. The operating conditions of HPLC for analysis of oligosaccharides

Flow	0.7 mL/min		
Column	HILICpak VG-50 4E 250 mm × 4.6 mm, 5°C		
Column oven temperature	40°C		
Injection volume	5 μL		
Sampler temperature	10°C		
Mobile Phase	Multi gradient		
	min	Water	Acetonitrile
	0.00	20	80
	50.00	34	66
	60.00	40	60
	60.10	20	80
	65.00	20	80
Detector	Charged Aerosol Detector Evaporator temperature : 40°C Data collection rate : 5 Hz		
Retention time	65 minutes		

통계처리

통계처리는 Minitab (R17, University Park, PA, USA) 프로그램을 이용하였고, one way ANOVA 분석을 통해 95% 신뢰구간에서 유의적인 차이를 확인하였다.

Results and Discussion

쌀가루의 액화반응 최적 조건

환원당의 함량은 Termamyl 2X의 농도가 높아질수록 증가하는 경향을 보였고, 1시간 액화했을 때보다 2시간 액

화 했을 때 환원당의 함량이 더 높았다(Fig. 1). 효소의 농도를 높이는 것보다 시간을 1시간 더 길게 하는 것이 효율적이라고 판단하였다. 가장 높은 환원당 함량을 나타내는 조건은 0.075%(v/w)를 첨가하여 2시간 동안 반응할 때이며, 138.26 g/L의 함량을 나타내었다. 그리고 2시간 반응했을 때 효소의 농도가 0.075% 이상에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다. Niu의 연구에서 액화 전분의 dextrose equivalent(DE)가 높으면, 전이반응에서 단위시간당 전환되는 이소말토올리고당의 수율이 증가한다고 보고하였다[9]. 환원당 함량이 높을수록 전분의 가수분해가 많이 이루어졌다고 판단하였으므로, Termamyl 2X를 기질대비 0.075% 첨가하여 2시간 동안 반응하는 것을 액화의 최적 조건으로 설정하였다.

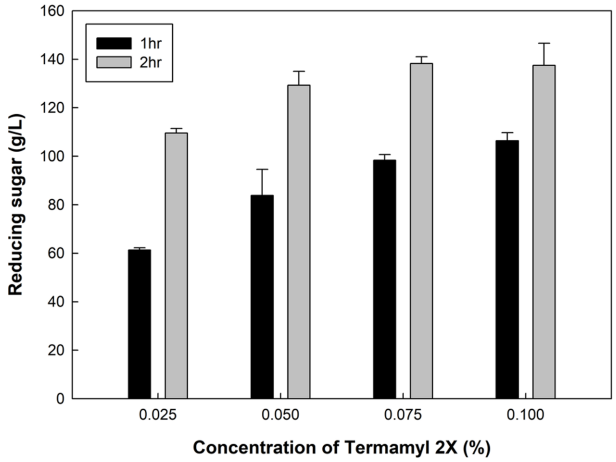

Fig. 1. Changes of reducing sugar contents in the liquefying slurry.

HPLC-CAD를 이용한 말토올리고당 및 이소말토올리고당의 동시분석

CAD는 발색단이 없거나 자외선을 흡수하지 않는 화합물을 검출할 수 있기 때문에 적용범위가 넓고, 광학적 성질이나 이온화성에 크게 의존하지 않으며, 감도(ELSD의 약 10배)와 재현성이 뛰어나고 기울기용리 적합성 등의 장점이 있다고 보고되었다[13].

효소반응을 통한 IMO의 제조 시에는 포도당 및 말토올리고당이 잔존하게 된다. 따라서 말토올리고당과 IMO이 동시에 분석될 필요가 있으며, CAD 검출기를 이용한 당류의 동시분석을 시도하였다.

분석을 위해 glucose, maltose, maltotriose, maltotetraose, maltopentaose, maltohexaose, isomaltose, panose, isomaltotriose, isomaltotetraose, isomaltopentaose, isomaltohexaose 총 12종의 표준물질을 사용하였고, 각 물질의 분리가 효율적으로 이루어질 수 있도록 분석조건을 설정하였다. 동시분석한 당류의 피크를 나타내는 크로마토그램을 Fig. 2에 나타내었다. HPLC에서 isocratic 조건으로 분석 시 말토올리고당 등의 당류와 IMO의 분리가 용이하지 않아 정확한 IMO의 함량을 계산하는 것에 어려움이 있다. 그래서 이동상을 gradient 조건으로 흘려주어 피크의 분리능을 높여 분석이 효율적이게 하였다. HPLC-ELSD를 이용하여 말토올리고당과 IMO를 동시분석한 크로마토그램을 확인하였을 때, 당류의 검출 순서가 본 실험의 결과와 일치하였다[14].

당화효소의 선정

IMO을 제조하기 위한 최적 당화효소를 선정하기 위하여 서로 다른 당화효소를 사용하여 당화·전이반응을 진행

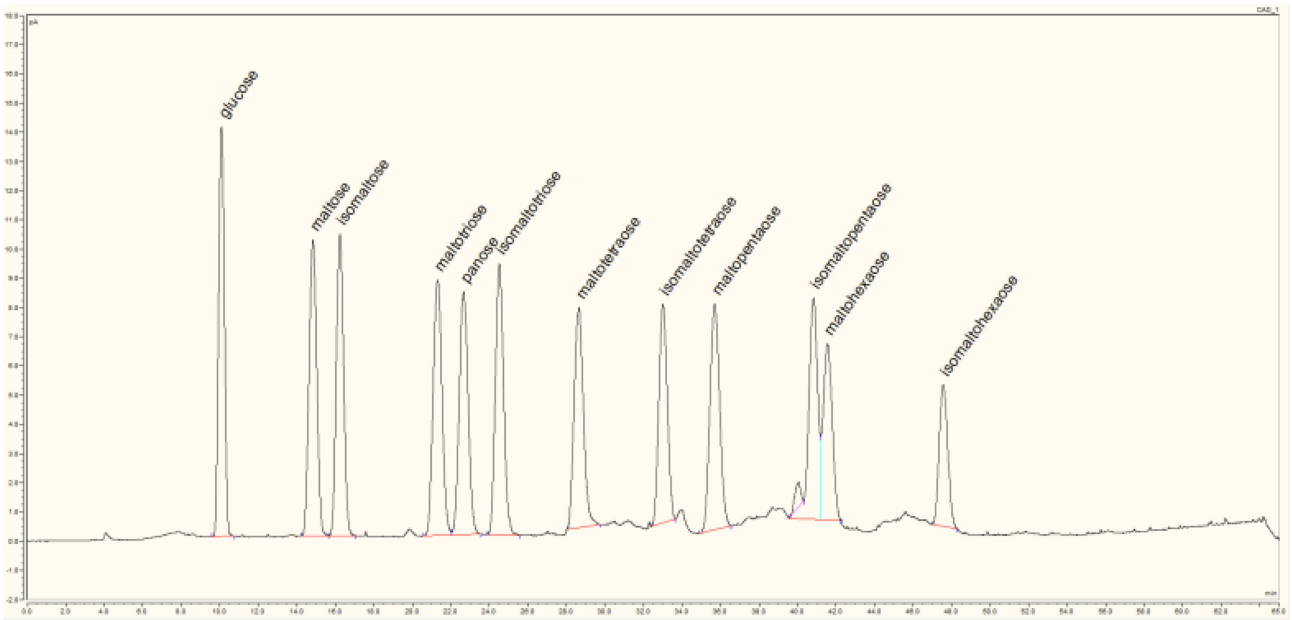

Fig. 2. HPLC chromatogram of 800 ppm concentrations of standard compounds of maltooligosaccharides and isomaltooligosaccharides.

Table 4. Contents of oligosaccharides in liquefied slurry adding 0.1% Transglucosidase L for the processs of transglucosylation without saccharification(T+TG)

Sugar contents (g/L)	Reaction time (hour)		
	0	12	24
Glucose	13.55±0.99[a]	31.01±0.53[b]	38.89±0.91[c]
Maltose	29.80±0.52[a]	13.58±1.22[b]	9.47±1.73[c]
Maltotriose	28.10±0.52[a]	7.27±0.10[b]	5.06±1.80[c]
Maltotetraose	15.90±0.55[a]	2.85±0.25[b]	1.10±0.60[c]
Maltopentaose	27.96±0.02[a]	4.96±0.32[b]	5.77±0.07[c]
Maltohexaose	19.87±0.93[a]	3.23±2.00[b]	0.93±0.93[c]
Isomaltose	0.41±0.10[a]	23.10±0.74[b]	28.89±0.66[b]
Panose	1.81±0.04[a]	21.02±2.04[b]	10.17±1.14[c]
Isomaltotriose	0.00[a]	11.08±0.06[b]	15.61±0.53[c]
Isomaltotetraose	0.00[a]	1.92±0.14[b]	4.94±0.53[c]
Isoamaltopentaose	0.00[a]	0.00[a]	0.12±0.03[b]
Total IMO[1)]	2.22±0.14[a]	57.11±1.37[b]	59.73±1.76[c]
Total sugar	137.42±3.65[a]	120.00±1.79[b]	120.95±7.80[b]

[1)]IMO: Isomaltooligosaccharides.

Table 5. Contents of oligosaccharides in the processs for simultaneous saccharification and transglucosylation using 0.1% Maltogenase L, 0.1% Promozyme D2 and 0.1% Transglucosidase L(MP+TG)

Sugar contents (g/L)	Reaction time (hour)		
	0	12	24
Glucose	13.11±0.11[a]	39.88±0.21[b]	47.01±0.12[c]
Maltose	30.95±0.22[a]	22.84±0.61[b]	15.26±0.98[c]
Maltotriose	27.72±0.60[a]	5.88±0.28[b]	3.89±2.11[b]
Maltotetraose	17.51±0.94[a]	0.15±0.15[b]	0.45±0.40[b]
Maltopentaose	20.18±0.51[a]	5.08±0.21[b]	1.09±0.11[c]
Maltohexaose	17.04±1.07[a]	0.00[b]	0.00[b]
Isomaltose	0.30±0.07[a]	27.24±0.21[b]	34.70±0.15[c]
Panose	1.74±0.14[a]	35.47±2.11[b]	18.97±0.84[c]
Isomaltotriose	0.00[a]	10.40±0.07[b]	17.23±0.12[c]
Isomaltotetraose	0.00[a]	1.14±0.12[b]	4.03±0.64[c]
Isoamaltopentaose	0.00[a]	0.00[a]	0.10±0.03[b]
Total IMO[1)]	2.04±0.07[a]	74.25±1.96[b]	75.02±0.44[b]
Total sugar	128.55±3.16[a]	148.08±1.22[b]	142.73±4.15[b]

[1)]IMO: Isomaltooligosaccharides.

하였다(T+TG, MP+TG, F+TG). 효소 첨가 후 0, 12 및 24 시간에 당화액을 채취하여 말토올리고당 및 IMO의 함량을 분석하였다(Table 4, Table 5, Table 6). 실험 결과에 나타난 총 당 함량에는 당 전이 반응으로 생성되는 중간 산물(α-1,6 결합과 α-1,4 결합이 섞여있는 올리고당)이나 nigerose, kojibiose, isopanose는 포함되지 않았기 때문에 실제 총 당 함량과 일치하지는 않았다.

Table 6. Contents of oligosaccharides in the processs for simultaneous saccharification and transglucosylation using 0.1% Fungamyl 800L and 0.1% Transglucosidase L(F+TG)

Sugar contents (g/L)	Reaction time (hour)		
	0	12	24
Glucose	14.09±0.56[a]	38.06±2.35[b]	43.59±1.57[c]
Maltose	33.68±0.60[a]	18.39±0.38[b]	8.71±3.66[b]
Maltotriose	34.39±0.23[a]	5.06±0.55[b]	3.57±1.79[b]
Maltotetraose	20.40±0.05[a]	0.00[b]	0.00[b]
Maltopentaose	15.59±0.63[a]	6.95±0.56[b]	5.18±0.87[c]
Maltohexaose	14.19±0.02[a]	0.02±0.02[b]	0.00[b]
Isomaltose	0.31±0.05[a]	25.29±0.99[b]	29.92±0.67[c]
Panose	1.64±0.02[a]	30.04±3.33[b]	12.81±1.37[c]
Isomaltotriose	0.00[a]	9.85±0.61[b]	15.12±0.14[c]
Isomaltotetraose	0.00[a]	1.04±0.21[b]	3.30±0.36[c]
Isoamaltopentaose	0.00[a]	0.00[a]	0.05±0.01[b]
Total IMO[1)]	1.95±0.08[a]	66.23±5.14[b]	61.19±1.54[b]
Total sugar	134.28±1.52[a]	134.71±7.91[a]	122.24±4.55[b]

[1)]IMO: Isomaltooligosaccharides.

T+TG 반응의 결과에서, Transglucosidase L의 작용에 의해 glucose가 다량 생산되어 24시간에 38.89 g/L까지 증가하였고, maltotriose, maltotetraose, maltopentaose도 분해되어 Transglucosidase L이 말토올리고당도 기질로 이용할 수 있다는 것을 확인할 수 있었다[15)].

24시간 동안 당화·전이 반응을 했을 때 MP+TG에서 총 IMO의 함량이 75.02 g/L로 가장 높았고, 특히 isomaltose는 24시간일 때 34.70 g/L이고, panose는 12시간일 때 35.47 g/L로 가장 많이 측정되었다. Maltogenase L과 Promozyme D2는 maltose를 많이 생산하는데, 이때 isomaltose와 panose도 많이 생산되었다. Transglucosidase L의 특성을 조사한 연구에서 Transglucosedase L은 기질이 maltose일 때 주요 생산물로서 panose, glucose, isomaltose를 생성한다고 보고하였는데 본 연구의 결과와 일치한 것으로 판단되었다[15)].

F+TG에서는 isomaltose와 panose의 생성속도가 MP+TG보다 느린 것으로 보이고, 12시간에 총 IMO가 66.23 g/L로 가장 높았다가, 24시간에는 panose의 감소와 함께 61.19 g/L로 감소하였다. 따라서 IMO 제조를 위한 최적 효소는 Maltogenase L, Promozyme D2, Transglucosidase L의 조합으로 선정되었다.

당화효소와 전이효소의 농도에 따른 IMO의 생산

IMO 제조를 위한 최적 효소농도를 설정하기 위해 7가지의 실험군을 1, 4.5, 9, 18 및 36시간 동안 반응시켜 당 함량을 분석하였다(Table 7, Table 8, Table 9, Table 10, Table 11).

IMO의 형성을 시간의 흐름에 따라 보면 isomaltose → isomaltotriose → isomaltotetraose → isomaltopentaose의 순으로 생산되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 Transglucosidase L의 작용으로 가수분해된 glucosyl기가 당 분자의 비환원성 말단에 α-1,6 결합으로 전이된다는 연구결과와 일치하였다[15]. 따라서 사슬이 짧은 것부터 순차적으로 생성되기 때문에 α-1,6 결합으로 이루어진 긴 사

Table 7. Contents of oligosaccharides in the processs for simultaneous saccharification and transglucosylation at different enzyme concentration for 1 h

Sugar contents (g/L)	1 h						
	M0.0015[1)]	M 0.015	P 0.0015	P 0.015	TG 0.001	TG 0.01	MAX
Glucose	17.80±0.04^{a}	17.93±0.01^{b}	20.22±0.04^{d}	19.50±0.09^{e}	17.52±0.07^{f}	18.02±0.07^{b}	20.36±0.10^{c}
Maltose	25.38±0.35^{a}	28.67±0.15^{b}	42.15±0.06^{d}	41.60±0.28^{c}	44.74±0.01^{e}	45.17±0.48^{e}	41.68±0.02^{c}
Maltotriose	21.19±0.01^{a}	23.88±0.09^{b}	26.28±0.01^{c}	26.28±0.21^{c}	33.34±0.03^{d}	31.84±0.71^{e}	26.73±0.65^{c}
Maltotetraose	15.30±0.44^{ab}	14.95±0.75^{bc}	11.59±0.01^{e}	12.15±0.03^{de}	15.83±0.07^{a}	14.55±0.17^{c}	12.37±0.34^{d}
Maltopentaose	26.92±0.11^{a}	21.22±0.10^{b}	10.47±0.04^{d}	10.99±0.65^{d}	13.61±0.50^{e}	13.01±0.21^{e}	11.72±0.54^{c}
Maltohexaose	16.87±0.32^{a}	14.73±0.41^{b}	7.68±0.54^{d}	9.84±0.40^{c}	9.97±0.36^{c}	9.22±0.76^{c}	9.38±1.22^{c}
Maltoheptaose	6.06±0.06^{a}	5.91±0.02^{b}	4.35±0.06^{d}	4.58±0.04^{e}	5.48±0.06^{f}	4.31±0.04^{d}	5.17±0.07^{e}
Maltooctaose	4.06±0.06^{a}	5.08±0.05^{b}	2.80±0.02^{c}	3.30±0.04^{d}	1.68±0.03^{e}	2.80±0.02^{c}	2.85±0.01^{c}
Maltononaose	8.05±0.03^{a}	7.70±0.11^{b}	2.74±0.06^{d}	1.55±0.01^{e}	2.76±0.05^{d}	2.32±0.02^{f}	3.57±0.02^{c}
Isomaltose	4.54±0.41^{a}	4.02±0.09^{b}	3.48±0.04^{c}	3.67±0.04^{c}	0.00^{d}	0.56±0.02^{e}	4.15±0.06^{b}
Panose	12.05±0.19^{a}	12.37±0.28^{b}	13.22±0.10^{d}	12.83±0.03^{e}	0.37±0.01^{f}	2.33±0.10^{g}	14.19±0.01^{c}
Isomaltotriose	0.22±0.01^{a}	0.12±0.02^{b}	0.00^{d}	0.05±0.04^{c}	0.00^{d}	0.00^{d}	0.06±0.01^{c}
Isomaltotetraose	0.00^{a}	0.00^{a}	0.00^{a}	0.00^{a}	0.00^{a}	0.00^{a}	0.00^{a}
Isomaltopentaose	0.00^{a}	0.00^{a}	0.00^{a}	0.00^{a}	0.00^{a}	0.00^{a}	0.00^{a}
Total IMO	16.81±0.61^{a}	16.51±0.39^{a}	16.70±0.06^{a}	16.55±0.12^{a}	0.37±0.01^{c}	2.89±0.08^{d}	18.40±0.08^{b}
Total sugar	158.44±1.94^{a}	156.58±0.16^{b}	144.98±0.66^{de}	146.35±0.96^{d}	145.31±0.76^{de}	144.12±0.67^{e}	152.23±0.82^{c}

[1)]Refer to Table 2.

Table 8. Contents of oligosaccharides in the processs for simultaneous saccharification and transglucosylation at different enzyme concentration for 4.5 h

Sugar contents (g/L)	4.5 h						
	M0.0015[1)]	M 0.015	P 0.0015	P 0.015	TG 0.001	TG 0.01	MAX
Glucose	23.01±0.20^{a}	24.33±0.36^{b}	28.92±0.14^{d}	29.15±0.26^{d}	22.30±0.04^{e}	23.43±0.02^{f}	30.19±0.01^{c}
Maltose	21.30±0.04^{a}	26.58±0.06^{b}	34.33±0.20^{d}	36.34±0.02^{e}	58.22±0.71^{f}	56.68±0.49^{g}	37.21±0.68^{c}
Maltotriose	12.93±0.10^{a}	15.03±0.09^{b}	8.43±0.10^{d}	9.54±0.30^{e}	29.60±0.13^{f}	27.15±0.40^{g}	12.11±0.20^{c}
Maltotetraose	12.33±0.41^{a}	9.50±0.15^{b}	2.27±0.08^{d}	2.68±0.02^{cd}	10.96±0.44^{e}	10.36±0.12^{f}	2.91±0.34^{c}
Maltopentaose	16.46±0.87^{a}	12.78±0.81^{b}	7.11±0.59^{d}	7.75±0.69^{cd}	12.09±0.24^{be}	11.06±0.53^{e}	8.44±1.00^{c}
Maltohexaose	8.62±0.13^{ab}	7.72±0.66^{bc}	7.15±0.31^{d}	7.81±0.50^{bc}	8.79±0.53^{a}	8.10±0.49^{ab}	5.16±0.83^{d}
Maltoheptaose	7.02±0.07^{a}	5.17±0.04^{b}	1.53±0.04^{d}	2.48±0.01^{e}	3.75±0.01^{f}	3.43±0.04^{g}	0.92±0.03^{e}
Maltooctaose	4.14±0.23^{a}	3.46±0.18^{b}	0.04±0.01^{c}	0.27±0.03^{d}	1.41±0.07^{e}	1.58±0.07^{e}	0.21±0.01^{cd}
Maltononaose	2.93±0.06^{a}	2.05±0.01^{b}	0.21±0.02^{d}	0.00^{d}	0.93±0.05^{e}	0.84±0.08^{f}	0.25±0.01^{c}
Isomaltose	13.17±0.08^{ab}	12.91±0.10^{b}	13.43±0.02^{a}	13.46±0.04^{a}	0.44±0.05^{d}	2.10±0.09^{e}	13.98±0.44^{c}
Panose	23.45±0.20^{a}	25.54±0.72^{b}	30.74±0.45^{d}	31.67±0.04^{e}	1.41±0.05^{f}	8.04±0.29^{g}	33.46±0.25^{c}
Isomaltotriose	2.45±0.01^{a}	2.42±0.08^{a}	2.06±0.14^{c}	2.17±0.09^{bc}	0.00^{d}	0.00^{d}	2.22±0.01^{b}
Isomaltotetraose	0.04±0.00^{a}	0.00^{b}	0.00^{b}	0.00^{b}	0.00^{b}	0.00^{b}	0.00^{b}
Isomaltopentaose	0.00^{a}	0.00^{a}	0.00^{a}	0.00^{a}	0.00^{a}	0.00^{ab}	0.00^{a}
Total IMO	39.11±0.29^{a}	40.86±0.90^{b}	46.22±0.57^{e}	47.29±0.10^{d}	1.85±0.10^{f}	10.14±0.38^{g}	49.66±0.71^{c}
Total sugar	147.87±0.01^{a}	147.50±1.70^{b}	136.31±0.90^{c}	143.31±0.69^{d}	149.89±2.07^{ad}	152.77±2.23^{d}	147.00±3.31^{b}

[1)]Refer to Table 2.

Table 9. Contents of oligosaccharides in the processs for simultaneous saccharification and transglucosylation at different enzyme concentration for 9 h

Sugar contents (g/L)	9 h						
	M0.0015[1)]	M 0.015	P 0.0015	P 0.015	TG 0.001	TG 0.01	MAX
Glucose	30.19±0.76^{a}	31.87±0.95^{b}	37.17±0.26^{d}	37.47±0.62^{d}	27.01±0.29^{e}	28.43±0.40^{f}	39.14±0.27^{c}
Maltose	22.04±0.11^{a}	26.65±0.10^{b}	26.63±0.26^{b}	28.78±0.22^{e}	68.07±0.94^{d}	62.37±0.17^{f}	31.72±0.09^{c}
Maltotriose	10.25±0.19^{a}	10.20±0.28^{b}	1.94±0.10^{d}	2.44±0.19^{e}	25.35±0.05^{f}	21.38±0.08^{a}	3.97±0.04^{c}
Maltotetraose	8.30±0.36^{a}	5.30±0.55^{b}	0.79±0.50^{c}	0.88±0.58^{c}	9.54±0.22^{d}	7.48±0.12^{e}	1.07±0.51^{c}
Maltopentaose	11.06±0.08^{a}	8.52±0.72^{bc}	7.54±0.35^{cd}	7.79±0.61^{cd}	10.97±1.47^{a}	10.02±1.50^{ab}	6.49±0.60^{d}
Maltohexaose	5.29±1.50^{a}	4.48±1.19^{a}	2.77±0.22^{c}	2.63±0.54^{c}	4.67±0.79^{a}	4.27±1.17^{ac}	0.60±0.47^{b}
Maltoheptaose	6.25±0.02^{a}	2.38±0.02^{b}	0.54±0.03^{d}	0.16±0.02^{e}	0.73±0.02^{f}	0.32±0.04^{g}	0.00^{c}
Maltooctaose	2.63±0.05^{a}	0.66±0.02^{b}	0.00^{c}	0.00^{c}	0.33±0.02^{d}	0.23±0.01^{e}	0.00^{c}
Maltononaose	1.27±0.03^{a}	0.44±0.01^{b}	0.00^{c}	0.00^{c}	0.00^{c}	0.00^{c}	0.00^{c}
Isomaltose	22.80±0.10^{a}	21.78±0.16^{b}	24.10±0.03^{d}	24.37±0.33^{d}	0.64±0.01^{e}	3.48±0.05^{f}	25.06±0.16^{c}
Panose	28.04±1.01^{a}	31.98±0.03^{b}	35.25±0.57^{c}	35.80±0.65^{d}	2.65±0.13^{e}	13.84±0.31^{f}	40.77±0.20^{e}
Isomaltotriose	8.63±0.19^{a}	7.55±0.19^{b}	7.18±0.09^{c}	7.17±0.14^{c}	0.00^{d}	0.00^{d}	7.32±0.18^{bc}
Isomaltotetraose	1.12±0.02^{a}	0.68±0.02^{b}	0.51±0.02^{c}	0.52±0.03^{c}	0.00^{d}	0.00^{d}	0.51±0.03^{c}
Isomaltopentaose	0.00^{a}	0.00^{a}	0.00^{a}	0.00^{a}	0.00^{a}	0.00^{a}	0.00^{a}
Total IMO	60.60±0.94^{a}	62.00±0.30^{b}	67.04±0.61^{d}	67.86±0.43^{d}	3.29±0.14^{e}	17.32±0.36^{f}	73.66±0.22^{c}
Total sugar	157.88±0.39^{a}	152.50±0.89^{b}	144.41±1.54^{c}	148.01±1.49^{d}	149.95±3.35^{bd}	151.83±2.70^{b}	156.65±1.13^{a}

[1)]Refer to Table 2.

Table 10. Contents of oligosaccharides in the processs for simultaneous saccharification and transglucosylation at different enzyme concentration for 18 h

Sugar contents (g/L)	18 h						
	M0.0015[1)]	M 0.015	P 0.0015	P 0.015	TG 0.001	TG 0.01	MAX
Glucose	33.98±1.03^{a}	36.00±0.88^{b}	39.91±0.84^{d}	41.09±0.57^{cd}	28.63±0.24^{e}	31.94±0.65^{f}	41.85±0.60^{c}
Maltose	15.94±2.10^{ab}	17.48±2.28^{a}	14.38±1.37^{b}	16.44±1.13^{ab}	67.81±1.13^{c}	60.64±0.34^{d}	17.14±1.55^{a}
Maltotriose	3.72±0.41^{a}	2.95±0.26^{b}	0.46±0.03^{c}	0.68±0.04^{c}	13.65±0.63^{d}	10.10±0.24^{e}	0.80±0.03^{c}
Maltotetraose	3.95±0.06^{a}	2.16±0.03^{b}	0.10±0.10^{c}	0.10±0.10^{c}	5.05±0.05^{d}	3.16±0.06^{e}	0.24±0.24^{c}
Maltopentaose	4.63±0.26^{a}	2.71±0.02^{b}	5.40±0.10^{d}	5.67±0.49^{d}	6.42±0.04^{e}	6.30±0.08^{e}	1.37±0.06^{c}
Maltohexaose	0.50±0.03^{a}	0.42±0.07^{ab}	0.32±0.05^{ab}	0.29±0.04^{ab}	0.26±0.26^{b}	0.23±0.23^{bc}	0.00^{c}
Maltoheptaose	0.62±0.04^{a}	0.00^{b}	0.00^{b}	0.00^{b}	0.00^{b}	0.00^{b}	0.00^{b}
Maltooctaose	0.00^{a}	0.00^{a}	0.00^{a}	0.00^{a}	0.00^{a}	0.00^{a}	0.00^{a}
Maltononaose	0.00^{a}	0.00^{a}	0.00^{a}	0.00^{a}	0.00^{a}	0.00^{a}	0.00^{a}
Isomaltose	29.70±0.65^{a}	30.41±0.49^{bc}	30.05±0.19^{ac}	31.04±0.29^{b}	0.59±0.17^{e}	6.25±0.05^{f}	32.50±0.36^{d}
Panose	20.54±1.36^{a}	23.53±0.61^{b}	19.00±0.16^{d}	21.10±0.34^{a}	4.06±0.30^{e}	20.97±0.05^{a}	24.62±0.02^{c}
Isomaltotriose	15.53±0.39^{a}	14.56±0.04^{b}	12.76±0.06^{d}	13.38±0.20^{e}	0.00^{f}	0.11±0.01^{f}	13.93±0.08^{c}
Isomaltotetraose	3.88±0.32^{a}	3.28±0.10^{b}	2.25±0.15^{c}	2.30±0.18^{c}	0.00^{d}	0.00^{d}	2.53±0.14^{c}
Isomaltopentaose	0.00^{a}	0.00^{a}	0.00^{a}	0.00^{a}	0.00^{a}	0.00^{a}	0.00^{a}
Total IMO	69.65±2.72^{ab}	71.68±1.23^{ac}	64.07±0.06^{d}	67.82±0.62^{a}	4.65±0.47^{e}	27.33±0.10^{f}	73.58±0.29^{c}
Total sugar	132.99±6.66^{ab}	133.38±4.78^{ac}	124.65±2.54^{d}	132.09±2.98^{ab}	126.50±2.64^{b}	139.69±1.42^{c}	134.92±2.19^{ac}

[1)]Refer to Table 2.

슬의 IMO을 생성하려면 반응 시간이 길어야 할 것으로 사료된다. 반면, Plongbunjong 등[16]은 쌀 전분 슬러리에 α-amylase(Amano, Japan)와 Transglucosidase L를 동시에 첨가하여 60°C에서 6시간 동안 반응하였을 때 isomaltohexaose의 비율이 26.7%로 가장 높았다고 보고하였으며, 이는 본 연구결과와 상이한 결과를 나타냈다.

Transglucosidase L은 시간 의존적일 뿐만 아니라 농도 의존적이었다. Transglucosidase L의 농도가 높을수록 반응 속도가 빨라지면서 같은 시간 동안에 훨씬 더 많은 IMO가 생산되었다. 팽화 쌀가루로 당화·전이반응을 동시에 진행하여 이소말토올리고당을 제조한 연구에서는 Tranglucosidase L을 본 연구의 5배인 0.5%를 첨가하여 1

Table 11. Contents of oligosaccharides in the processs for simultaneous saccharification and transglucosylation at different enzyme concentration for 36 h

Sugar contents (g/L)	36 h						
	M 0.0015[1)]	M 0.015	P 0.0015	P 0.015	TG 0.001	TG 0.01	MAX
Glucose	44.47±0.05[a]	45.73±0.20[b]	47.42±0.47[d]	47.54±0.23[d]	33.32±0.98[e]	38.98±0.93[f]	49.54±0.52[c]
Maltose	11.20±0.27[a]	11.49±0.04[a]	9.90±0.16[a]	10.89±0.05[a]	75.56±3.19[b]	56.38±2.65[c]	10.98±0.47[a]
Maltotriose	1.05±0.04[a]	0.62±0.14[b]	0.07±0.09[c]	0.20±0.10[c]	4.59±0.20[d]	2.51±0.39[e]	0.09±0.10[c]
Maltotetraose	0.00[a]	0.00[a]	0.00[a]	0.00[a]	1.87±0.14[b]	0.53±0.23[c]	0.00[a]
Maltopentaose	0.66±0.28[a]	0.36±0.18[ab]	4.25±0.27[c]	2.99±0.38[de]	3.39±0.22[d]	2.69±0.04[e]	0.20±0.10[b]
Maltohexaose	0.00[a]	0.00[a]	0.00[a]	0.00[a]	0.00[a]	0.00[a]	0.00[a]
Maltoheptaose	0.00[a]	0.00[a]	0.00[a]	0.00[a]	0.00[a]	0.00[a]	0.00[a]
Maltooctaose	0.00[a]	0.00[a]	0.00[a]	0.00[a]	0.00[a]	0.00[a]	0.00[a]
Maltononaose	0.00[a]	0.00[a]	0.00[a]	0.00[a]	0.00[a]	0.00[a]	0.00[a]
Isomaltose	35.30±0.95[ab]	36.72±1.04[ac]	34.25±0.87[b]	35.35±0.85[ab]	1.57±0.10[d]	11.95±0.66[e]	37.39±1.38[c]
Panose	11.22±0.23[a]	11.78±0.34[b]	8.71±0.20[c]	10.60±0.32[d]	7.06±0.35[e]	32.26±0.05[f]	11.09±0.17[a]
Isomaltotriose	20.62±0.51[a]	19.95±0.43[b]	16.34±0.12[d]	17.55±0.50[e]	0.00[f]	0.79±0.06[g]	18.60±0.54[c]
Isomaltotetraose	8.25±0.53[a]	7.48±0.57[b]	4.82±0.26[d]	5.13±0.18[d]	0.00[e]	0.00[e]	5.76±0.37[c]
Isomaltopentaose	1.28±0.13[a]	0.88±0.05[b]	0.27±0.06[d]	0.25±0.07[d]	0.00[e]	0.00[e]	0.40±0.02[c]
Total IMO	76.67±1.77[a]	76.81±1.64[a]	64.39±0.89[c]	68.88±1.70[d]	8.63±0.32[e]	44.99±0.59[f]	73.23±2.07[b]
Total sugar	134.05±1.78[a]	135.00±1.79[a]	126.03±1.29[b]	130.50±1.99[ab]	127.36±4.21[b]	146.06±3.70[c]	133.98±2.98[a]

[1)]Refer to Table 2.

시간만에 총 이소말토올리고당을 56.40 g/L 생산하였다고 보고하였다[8]. 따라서 IMO 생성의 주요 요인인 Transglucosidase L의 농도는 최대치인 0.1%로 고정하는 것이 바람직하다고 판단되었다.

Promozyme D2의 농도는 18시간 이상의 장시간 반응 시 총 IMO 함량에 유의적인 차이를 주면서 수율을 높이는 것으로 보였다. Niu 등[9]은 pullulanase가 이소말토올리고당의 α-1,6 결합은 가수분해하지 않으면서, 첨가량이 많아질수록 이소말토올리고당의 수율을 증가시킨다고 보고하였다. 본 연구에서는 36시간에서 P 0.0015, P 0.015, MAX의 총 IMO 함량이 각각 64.39 g/L, 68.88 g/L, 73.23 g/L으로, 낮은 농도인 0.015% 이하의 농도보다는 높은 농도로 첨가 했을 때 효과가 있다고 판단되었다. 경제적 측면을 고려하여 Promozyme D2의 농도는 0.05-0.1% 범위로 설정하였다.

Table 4의 0시간이나 Table 7에서 알 수 있듯이, 가장 빠른 속도로 생산되는 IMO는 panose였다. 이것은 Transglucosidase L이 maltose를 acceptor로 하여 panose를 우선적으로 생산하려는 경향이 있는 것으로 보여졌다. Table 7~Table 9에서와 같이 Maltogenase L의 농도가 높을수록 panose의 함량도 높아지는 것을 확인할 수 있었고 9시간에 최고함량에 도달하였다. 그러나 반대로 Maltogenase L의 농도가 낮아진다면, maltose의 생산이 줄어들기 때문에 panose의 생산도 줄어들지만 Transglucosidase L이 isomaltose를 acceptor로 이용하여 isomaltotriose로의 전환이 될 수 있는 여분의 활성이 생기기 때문에, 중합도가 높은 IMO의 형성이 더 빨리 이루어지는 것으로 추측되었다. 즉, Maltogenase L과 Transglucosidase L이 동시에 작용하기 때문에 Maltogenase L의 높은 농도는 대부분 panose의 생산으로 이어져, 오히려 사슬이 긴 IMO 생산에 방해가 된다고 판단하였다. Table 7~Table 11에서 볼 수 있듯이 isomaltotriose, isomaltotetraose, isomaltopentaose는 Maltogenase L의 농도가 낮았던 실험군인 M 0.0015에서 더 빠르게 생산되었다. Ahn 등[15]은 Transglucosidase L의 기질이 말토올리고당일 경우는 maltose가 기질이었을 때와는 달리 panose를 거치지 않고도 isomaltose나 isomaltotriose가 생성 될 수 있음을 보고하였으며, 이는 본 연구의 실험 내용과 유사하였다. 따라서 panose를 주요 생산물로 하면서 반응시간을 짧게 하고자하면 Maltogenase L의 농도를 높게 잡는 것이 좋고, 반응시간을 길게 하여 중합도가 높은 IMO를 생산하고자하면 Maltogenase L의 농도는 낮아도 된다고 사료되었다. 그러나 Maltogenase L를 아예 사용하지 않으면 isomaltose와 panose의 생성 속도가 느려지기 때문에(Table 4, Table 5 비교) Maltogenase L의 농도는 0.0015%로 설정하였다. 이는 Maltogenase L의 농도를 감소시킴으로써 glucose의 함량을 줄일 뿐 아니라 효소 비용도 절감시킬 수 있는 방법이 될 수 있을 것으로 사료된다.

당화효소와 전이효소의 최적 반응시간

쌀가루 액화액에 0.0015% Maltogenase L, 0.075% Promozyme D2, 0.1% Transglucosidase L을 첨가하여 72

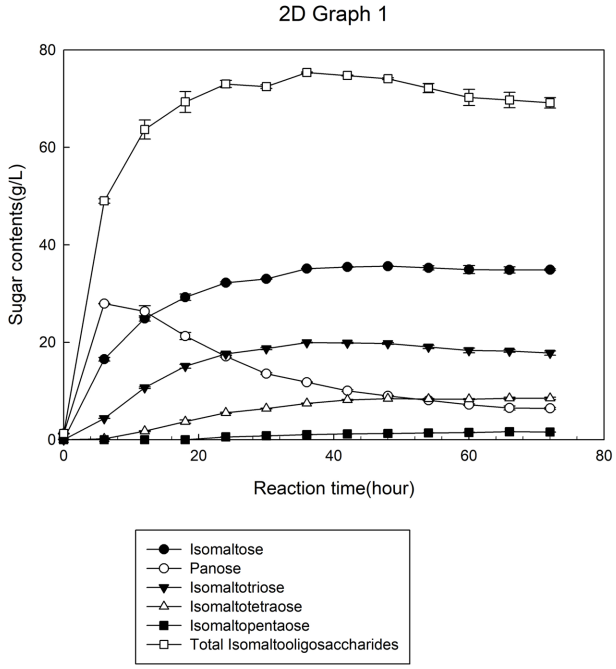

Fig. 3. Changes in isomaltooligosaccharides contents by enzyme reaction time.
(0.0015% Maltogenase L, 0.075% Promozyme D2 and 0.1% Transglucosidase L were added for production of isomaltooligosaccharides.)

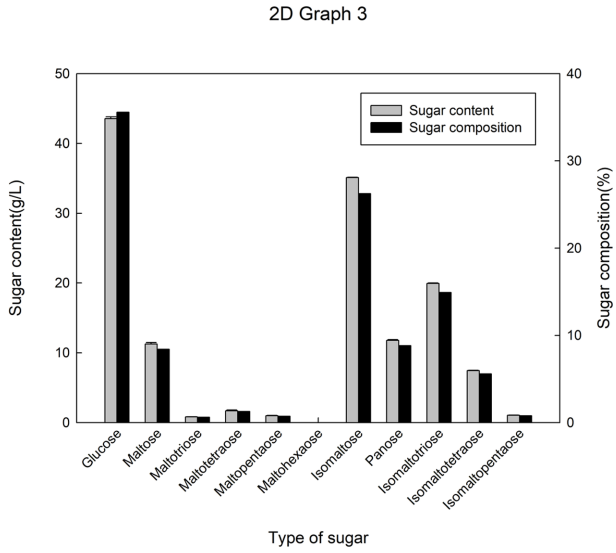

Fig. 4. Sugar contents and composition of isomaltooligosaccharides manufactured by enzyme reaction with 0.0015% Maltogenase L, 0.075% Promozyme D2 and 0.1% Transglucosidase L for 36 h.

시간동안 반응시켰고, 6시간마다 당화액을 채취하여 IMO의 함량을 분석하였다(Fig. 3). Isomaltose는 48시간까지 35.63 g/L로 증가하다가 점차 감소하였다. 그리고 panose는 6시간에 27.95 g/L 까지 증가했다가 이후로 계속해서 감소하였다. Isomaltotriose, isomaltotetraose, isomaltopentaose는 각각 최고 19.95 g/L, 8.50 g/L, 1.64 g/L 까지 생산되었고 isomaltohexaose는 72시간에도 검출되지 않았다. 총 IMO 함량은 36시간에 75.36 g/L가 되고 그 이후로는 유의적인 차이가 없거나, 감소하는 경향을 나타내기 때문에 최적 효소반응 조건은 36시간으로 설정하였다. 36시간 효소 반응한 당액의 구성당 및 함량은 Fig. 4과 같았다. 총 당 중 IMO의 비율은 약 56.37%였다. 전이반응으로 만들어지는 생성물 중 모든 당 분자가 α-1,6 결합이 아니더라도 하나 이상의 α-1,6 결합을 가지고 있으면 중합도가 같은 분자들을 BDP3 (branched degree of polymerization), BDP4, BDP5 등으로 통칭하여 총 IMO 함량에 포함시키는 연구들이 있으며[2,7,17], 본 연구에서도 그러한 당류를 포함시킨다면 IMO의 조성(%)이 더 높게 측정될 것이라 판단되었다.

Acknowledgement

본 결과물은 농림축산식품부의 재원으로 농림식품기술기획평가원 기술사업화지원사업의 지원을 받아 연구되었음(817039-3).

국문요약

쌀 소비 촉진과 쌀가공품의 다양화를 위해 쌀가루를 이용한 이소말토올리고당 제조에 대해 연구하였다. 최적 반응 조건을 확립하기 위해서 상업용 효소인 Termamyl 2X, Maltogenase L, Promozyme D2, Fungamyl 800L, Trnasglucosidase L을 사용하였고, 당류는 HPLC-CAD를 이용하여 말토올리고당과 이소말토올리고당을 동시분석하여 제조 조건별로 당의 구성 및 함량을 확인하였다.

액화반응의 최적화 조건을 탐색하기 위해 효소의 농도(0.025%, 0.05%, 0.075%, 0.1%)와 시간(1 h, 2 h)에 변화를 주어 반응시켰으며, 가수분해 정도를 확인하기 위해 액화액의 환원당 함량을 측정하였다. 그 결과 Termamyl 2X를 0.075% 첨가하여 2시간 동안 반응하였을 때 환원당 함량이 138.26 g/L로 가장 높았다.

당화·전이반응의 최적화 조건을 확인하기 위해 효소의 종류, 효소농도, 효소반응시간을 달리하여 이소말토올리고당을 제조하였다. Maltogenase L, Promozyme D2, Transglucosidase L을 동시에 첨가하여 반응시켰을 때 isomaltose와 panose를 많이 생산하면서 총 이소말토올리고당의 함량이 가장 높게 나타났다. 그리고 효소의 첨가량을 결정하기 위해 각각 농도에 변화를 주어 시간별로 당 함량을 검토하였다. 그 결과, Maltogenase L은 0.0015%, Promozyme D2는 0.05-0.1%, Transglucosidase

L은 0.1%를 첨가하였을 때, glucose의 함량은 감소되고 중합도가 높은 이소말토올리고당의 함량은 증가하는 효과가 있었다. 최적 효소반응시간 결정을 위해 6시간마다 생성물의 변화를 관찰한 결과, 36시간에 총 이소말토올리고당이 75.36 g/L로 가장 높은 것으으로 확인되었다. 최적 조건으로 제조된 이소말토올리고당은 18 brix였고, isomaltose 35.11 g/L, panose 11.97 g/L, isomaltotriose 19.95 g/L, isomaltotetraose 7.46 g/L, isomaltopentaose 1.05 g/L 이 생성되었으며, 총당 중 이소말토올리고당의 비율은 56.37%였다.

References

1. KOSTAT, (2019, October 21). Grain consumption investigation 2018-homes·businesses sector [Document file], Retrieved from http://kostat.go.kr/portal/korea/kor_nw/1/1/index.board?bmode=read&aSeq=372958
2. Lee, H. S., Auh, J. H., Yoon, H. G., Kim, M. J., Park, J. H., Hong, S. S., Kang, M. H., Kim, T. J., Moon, T. W., Kim, J. W. and Park, K. H., Cooperative action of α-glucanotransferase and maltogenic amylase for an improved process of isomaltooligosaccharide (IMO) production. *J Agric Food Chem*, **50**, 2812-2817 (2002).
3. Sheng, G. E., Dong-lian, C. A. I. and Li-li, W. A. N., Determination of glycemic index of xylitol and isooligosaccharide. *Chinese J. Clin. Nutri*., **14**, 235–237 (2006).
4. Qiang, X., Yonglie, C., and Qianbing, W., Health benefit application of functional oligosaccharides. *Carbohyd Polym*, **77**, 435-441 (2009).
5. Yen, C. H., Tseng, Y. H., Kuo, Y. W., Lee, M. C., and Chen, H. L., Long-term supplementation of isomalto-oligosaccharides improved colonic microflora profile, bowel function, and blood cholesterol levels in constipated elderly people—a placebo- controlled, diet-controlled trial. *Nutrition*, **27**, 445-450 (2011).
6. Gourineni, V., Stewart, L. M., Icoz, D. and Zimmer, P. J., Gastrointestinal tolerance and glycemic response of isomaltooligosaccharides in healthy adults. *Nutrients*, **10**, 301 (2018).
7. Basu, A., Mutturi, S. and Prapulla, S. G., Production of isomaltooligosaccharides (IMO) using simultaneous saccharification and transglucosylation from starch and sustainablesources. *Process Biochem*, **51**, 1464-1471 (2016).
8. Lee, E. B., Kim, H. Y., Han, G. J. and Park, B. R., Preparation of isomaltooligosaccharides using puffed rice flour and evaluation of physicochemical properties. *Korean J Food Preserv*, **25**, 229-236 (2018).
9. Niu, D., Qiao, J., Li, P., Tian, K., Liu, X., Singh, S. and Lu, F., Highly efficient enzymatic preparation of isomalto-oligosaccharides from starch using an enzyme cocktail. *Electron J Biotechn*, **26**, 46-51 (2017).
10. Lin, Q., Xiao, H., Zhao, J., Li, L., Yu, F., Lin, X., and Cheng, X., Production of isomaltooligosaccharide syrup from rice starch using an one-step conversion method. *Int J Food Sci Technol*, **46**, 1194-1200 (2011).
11. Pan, Y. C., Lee, W. C., Production of high-purity isomaltooligosaccharides syrup by the enzymatic conversion of transglucosidase and fermentation of yeast cells. *Biotechnol Bioeng*, **89**, 797-804 (2005).
12. Miller, G. L., Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem*, **31**, 426-428 (1959).
13. Inagaki, S., Min, J. Z. and Toyóoka, T., Direct detection method of oligosaccharides by high-performance liquid chromatography with charged aerosol detection. *Biomed Chromatogr*, **21**, 338-342 (2007).
14. Ko, J. H., Lee, M. S., Kwak, B. M., Ahn, J., H., Park, J. S. and Kwon, J. H., Determination of isomaltooligosaccharides in yoghurts by using HPLC-ELSD. *Kor Food Sci. Anim. Resour*, **33**, 417-424 (2013).
15. Ahn, J. W., Hong, S. S., Park, K. W. and Seo, J. H., Reaction mode of transglucosidase from Aspergillus niger for production of isomaltooligosaccharide. *J Korean Food Sci Technol*, **28**, 273-278 (1996).
16. Plongbunjong, V., Graidist, P., Knudsen, K. E. B., and Wichienchot, S., Isomaltooligosaccharide synthesised from rice starch and its prebiotic properties in vitro. *Int J Food Sci Technol*, **52**, 2589-2595 (2017).
17. Chockchaisawasdee, S. and Poosaran, N., Production of isomaltooligosaccharides from banana flour. *J Sci Food Agric*, **93**, 180-186 (2013).