

대두 Arabinogalactan으로부터 갈락토올리고당의 생산과 그 특성에 관한 연구

신해헌 · 최형택* · 최동원**

연세대학교 식품생물공학과, *기전여자전문대학 식품제조과, **경민전문대학 식품영양과

Study on Production and Properties of Galactooligosaccharide from Soybean Arabinogalactan

Hae-Hun Shin, Hyeong-Taeg Choi* and Dong-Won Choi**

Dept. of Food and Biotechnology, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

*Dept. of Food Technology, Kijeon Women's Junior College, Chonju 560-701, Korea

**Dept. of Food and Nutrition, Kyungmin Junior College, Euijeongbu 480-702, Korea

Abstract

For the purpose of enzymatic production of galactooligosaccharides from soybean arabinogalactan (SAG) hydrolysis, the β -1,4-D-arabinogalactanase (β -1,4-galactanase) from *Bacillus* sp. HJ-12 was used. The soybean galactooligosaccharides (SOS) were optimally produced in SAG 1% (w/v), pH 8.0, 50°C, β -1,4-galactanase 20 unit/g SAG and 24~40 hour reaction conditions. The produced galactooligosaccharides had viscosity of 11,000 cp at 75% (w/v), 25°C. The viscosity of galactooligosaccharides was 80 fold increasing value than that of sucrose solution. Temperature dependence of viscosity of SOS was 4.6 fold higher value than sucrose solution below than 50°C. Less than 50 Brix, the viscosity of SOS was similar with sucrose solution (20~40 cp), but increasing of concentration, the difference of viscosity between SOS and sucrose solution was increased. And, SOS was very stable at pH and temperature.

Key words : galactooligosaccharide, β -1,4-D-arabinogalactanase (β -1,4-galactanase), soybean arabinogalactan (SAG).

서 론

최근 식품산업에서는 소비자들의 식생활 패턴이 고단백, 고영양 식품 섭취에서 저칼로리, 기능성 식품으로 변화됨에 따라 새로운 식품소재에 관한 많은 연구가 진행되고 있다.²⁾ 이러한 경향으로식이섬유(dietary fiber)와 올리고당(oligosaccharide)에 대한 관심이 높아지고 있다. 올리고당은 glucose, fructose 그리고 galactose와 같은 단당류가 glycosidic 결합에 의해 3~10개 결합된(D.P. = 3~10, D.P. : degree of polymerization) 당이며 20개까지도 올리고당으로 보기도 한다.³⁾

최근 수년 동안에 걸쳐 새로운 형태의 올리고당 개발이 활발히 진행되고 있으며 이들은 주로 설탕의 대용품으로 이용되고 있다. 그러나 설탕과는 생리적인 특성이 다르며 특히 인간의 건강에 매우 유익하다고 알려져 있다. 현재 올리고당은 음료수, 과자류, 카라멜, 초코렛, 쿠키, 케이크, 빵, 통조림, 아이스크림, 잼, 젤리, 푸딩, 요구르트 등의 식품에 사용되고 있다. 대부분의 올리고당은 식물체 내의 구성 성분으로 존재하지만 최근에는 박테리아가 생산하는 효소를 이용하여 sucrose, lactose, glucose 및 전분으로부터 생산하고 있다. 올리고당의 종류로는 malto 올리고당, isomalto 올리고당, fructo 올리고당, galacto 올리고당, 대두올리고당 등

이 있으며, 현재 생산되는 galacto 올리고당은 lactose에 *Kluyveromyces fragilis*, *K. lactis*, *Bacillus circulans*, *Aspergillus oryzae* 등이 생산하는 β -galactosidase를 작용시켜 transgalactosylation 작용에 의해 생산되며 주로 3당이 생산된다^{4,5)}.

이러한 관점에서 대두에 관심을 가지게 되는데, 대두는 전체성분이 건량기준으로 단백질 40%, 지방 23%, 회분 5%의 구성을 가지며 식이섬유와 올리고당으로 이용이 가능하지만 현재 대부분 폐기되는 섬유질이 32%를 차지하는 식품이다⁶⁾. 대두 중의 다당류는 주로 수용성 다당류인 arabinogalactan(AG)이며 대두중의 AG는 arabinose와 galactose가 β -1,4-D-galactopyranosyl 결합으로 구성된 다당류(hydrocolloid)이다. 이러한 AG로부터 β -1,4-D-arabinogalactanase(EC 3.2.1.89, β -1,4-galactanase)에 의한 가수분해로 갈락토올리고당을 생산할 수 있다⁷⁾.

따라서 본 저자는 대두로부터 갈락토올리고당의 생산을 위하여 호알칼리성 *Bacillus* sp. HJ-12가 생산하는 β -1,4-galactanase^{8,9)}를 이용하여 대두 arabinogalactan을 가수분해하는 조건과 그 생산물의 특성을 검토하여 새로운 식품소재로의 이용가능성에 대하여 검토하였다.

재료 및 방법

1. 사용 균주 및 기질

본 실험에서 사용한 균주는 신 등^{8,9)}의 호알칼리성 *Bacillus* sp. HJ-12를 사용하였다. 그리고, Soybean arabinogalactan(SAG)은 Morita 법¹⁰⁾을 이용하여 탈지 대두박으로부터 열수 추출하여 정제하였으며, Soybean fiber(SBF)는 제일제당사에서 제공받은 탈지 대두박을 사용하여 0.1N NaOH로 1시간 동안 처리하여 단백질을 제거한 후 증류수로 세척 및 동결건조하여 제조하였다.

2. 효소생산을 위한 균주의 배양

효소생산을 위한 배지로는 2% SAG, 0.5% yeast extract, 0.5% polypeptone, 0.5% NaCl, 0.1% K_2HPO_4 , 0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1% Na_2CO_3 (pH 8.2)를 사용하였다⁹⁾. 0.1% glucose가 포함된 기본배지에서 18시간동안 전배양한 균체를 seed로 하고, 2ℓ jar fermenter(MD-250, Marubishi Co., Japan)를 이용하여 SBF를 5% 첨가한 배지(pH 8.2) 1ℓ에서 2일간 1 vvm, 500rpm의 호기적인 조건에서 배양하였다.

3. 갈락토올리고당의 생산

위에서 생산된 β -1,4-galactanase는 일련의 정제과정⁹⁾을 거친 후에 1% SAG 용액(50mM phosphate 완충액, pH 8.0)에 첨가하여 50℃에서 24~40 시간 반응한 후 가열하여 효소를 불활성시키고 8,000 rpm에서 20분간 원심분리하였다.

원심분리한 상등액에 SAG g당 활성탄(분말형)을 1% (w/w) 첨가하여 85℃에서 1시간 반응하여 탈색공정을 거친 후 celite를 첨가한 glass filter(1G2)로 진공여과하여 활성탄을 제거하였다. 이후 여과액에 5%(w/v) Dowex AG 50W X8 (cation exchanger resin, BioRad Co.)를 첨가하여 30분간 교반하여 남아있는 활성탄과 이온물질을 제거하였다. 이를 8,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 resin을 제거하고 상등액을 Whatman No. 41를 사용하여 여과를 행하였으며, 여액을 1N NaOH로 중화하여 올리고당을 정제하였다. 생산된 올리고당은 동결건조를 통하여 건조하였다.

4. 효소활성과 환원당 및 총당의 측정

β -1,4-galactanase의 활성은 효소 작용에 의하여 생성되는 환원당의 양으로 결정^{8,9)}하였으며, 총당(total sugar)은 phenol-sulfuric 법¹¹⁾을 사용하여 측정하였으며, 이 때 표준물질은 D-galactose로 하였다.

5. 점도의 측정

점도의 측정은 Brookfield viscometer DV-I +에 small sample adaptor(SCA 18/13R)를 부착하여 항온수조로 온도를 조절한 후 측정하였다.

결과 및 고찰

1. 갈락토올리고당의 효소적 생산

효소를 이용하여 SAG로부터 갈락토올리고당을 생산하기 위하여 생산 조건에 대하여 검토하였다. 일반적으로 효소를 이용한 반응은 작용하는 효소의 종류와 양 그리고 기질의 농도에 따라 생산물의 양과 조성에 차이를 보이고 있다⁴⁾. 신 등⁹⁾의 결과에서 β -1,4-galactanase의 최적조건이 pH 8.0(50mM phosphate 완충액) 및 50℃이므로 이외의 기질의 농도와 시간, 효소의 양을 결정하기 위하여 SAG 10ml에 β -1,4-galactanase 1.8 unit를 첨가하여 기질 농도와 시간에 따라 생성되는 환원당의 양을 측정하여 Fig. 1에 나타내었다. 그 결과 SAG 농도 0.5~2%까지는 약 24~40시간

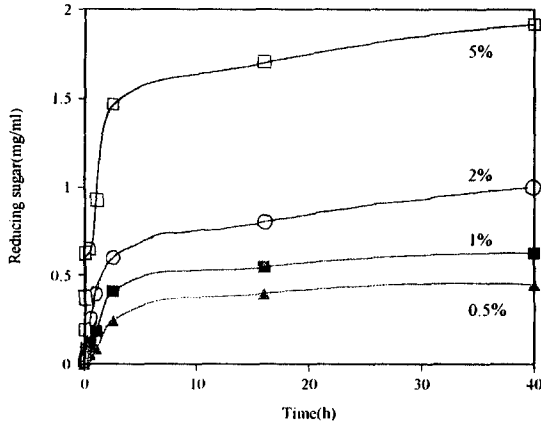


Fig. 1. Hydrolysis profiles of SAG at various concentration by β -1, 4-galactanase.

정도에 반응이 종결되었으며 5%의 경우는 계속적으로 증가되는 양상을 보였다. 이를 다시 기질 농도에 따른 가수분해도와 D.P. (총당/환원당)를 살펴본 결과 (Fig. 2) 기질 농도가 증가함에 따라 가수분해도는 감소하여 초기 기질 농도 0.5%에서는 가수분해도가 15%로 나타났지만 기질 농도가 증가함에 따라 급격히 감소하여 5%에서는 가수분해도가 6.33으로 감소하였다.

본 효소의 가수분해도는 약 15% 정도로 나타나서⁹⁾ 갈락토올리고당의 생산에서의 가수분해도는 15% 근방이 적절할 것으로 판단되어 가수분해도가 10% 이상인 SAG 1% 이하가 적당할 것으로 생각되었다. 또한 기질 농도에 따른 D.P.의 경우 기질 농도가 증가함에 따라 증가하여 기질 농도 0.5%에서는 10.1, 5%에서는 23.7

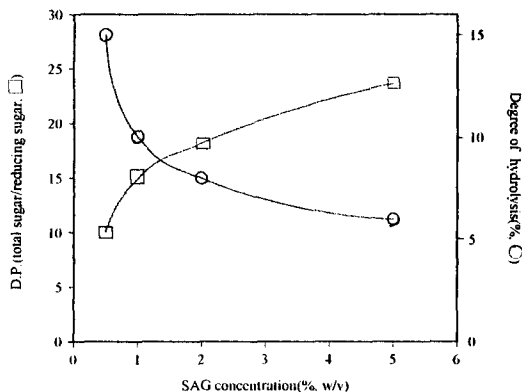


Fig. 2. Effect of SAG concentration on the degree of polymerization(D.P.) and hydrolysis degree.

로 나타났다.

올리고당의 품질 중 중요한 인자는 올리고당의 크기 (D.P) 및 그 색깔인데 본 실험에서 SAG 1%까지는 크게 문제되지 않았으나 2% 이상에서는 색깔을 많이 띄는 현상이 나타났다. 이 색깔은 활성탄을 이용하여 탈색과정을 거치면서도 잘 제거되지 않기 때문에 최종적으로 galacto 올리고당의 생산은 SAG 1%로 결정하였다. 또한 첨가되는 β -1,4-galactanase의 양은 신 등⁹⁾에서 1%의 경우 18 unit를 첨가한 것이므로 SAG 1g 당 20 unit 이상의 효소를 첨가하는 것으로 정하였다.

2. 대두 갈락토올리고당의 특성

올리고당의 특성으로는 생리적 기능 및 물리·화학적 기능으로 구분할 수 있는데 생리적 기능으로는 저칼로리(2 Kcal/g), 인슐린 분비에 영향이 없으며, 미생물 균총 특히 *Bifidus*균 증식 인자로 사용되며, 충치에 방에 효과가 있는 것으로 보고되고 있다. 물리적인 특성으로는 감미도가 설탕보다 낮으며, 흡습성이 있고, 수분활성이 설탕보다 낮아 미생물 발육을 억제하며 노화방지 및 분해, 착색이 낮은 등의 기능이 있어 기능성 식품소재로서 각광을 받고 있다⁴⁾.

본 실험에서는 이러한 기능 중에서 중요한 점도 및 안정성에 대해 검토하고자 대두 탄수화물인 SAG에 β -1, 4-galactanase를 작용시켜 효소적 가수분해에 의해 생산된 갈락토올리고당의 특성을 설탕 용액과 비교하여 그 특성을 검토하였다.

1) 점도

일반적으로 올리고당은 설탕에 비하여 점도가 높은 것으로 보고되고 있다. 설탕 용액(75%, w/v)과 생산된 갈락토올리고당(Brix 75)을 25~80℃까지 온도 변화를 주면서 점도 변화를 측정된 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 그 결과 25℃의 경우 갈락토올리고당(SOS)은 11,000 cp, 설탕용액은 140 cp의 점도를 나타내, SOS가 설탕용액보다는 80배 큰 점도를 나타내었다.

점도의 온도의존성은 일반적으로

$$\eta = A \cdot e^{\frac{B}{T}}$$

로 표현되며 이 때 B는 온도의존 함수이다. 이 식의 양변에 ln을 취하면

$$\ln \eta = \ln A + \frac{B}{T}$$

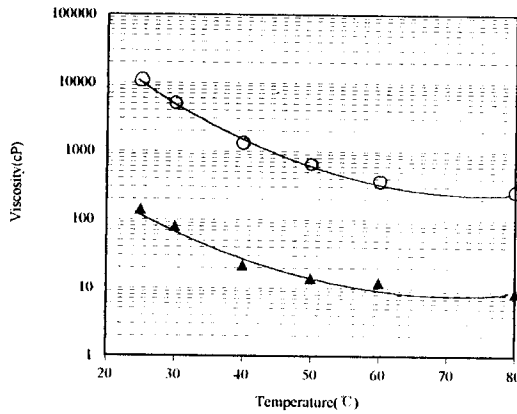


Fig. 3. Effect of temperature on oligosaccharide viscosity. ▲ : sucrose(75% w/v) ○ : SOS(Brix 75)

로 나타난다.

이 식을 이용하여 온도에 따른 점도변화를 고찰한 결과(Fig. 4) SOS는 50°C를 기준으로 두 가지 다른 직선을 나타내고 있다. 즉 50°C를 기준으로 온도에 대한 점도 변화가 차이를 보이고 있다. 이에 비해 설탕용액의 경우는 30°C 이하에서 다른 기울기(B)를 보이고 있다. B 값이 50°C 이하에서 SOS는 11,037 cp·K로 설탕의 276 cp·K에 비해서 4.6배 큰 값을 가져 온도변화에 따른 점도변화가 큰 것으로 판단되었다. 이는 SOS의 구조가 arabinose가 포함되는 side chain을 가지는 것과 올리고당 구성당의 크기가 주로 4당 이상으로 구성

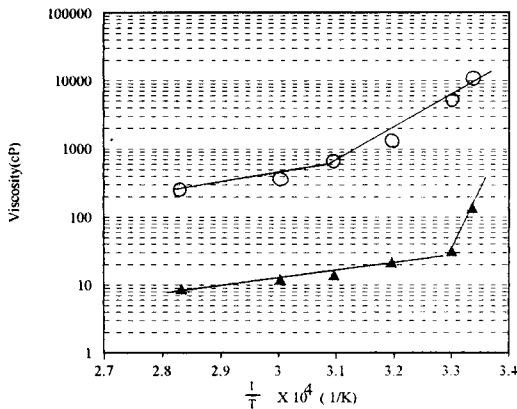


Fig. 4. Effect of temperature on viscosity by using 1/T vs viscosity plot. ▲ : sucrose(75% w/v) ○ : SOS(Brix 75)

되어 그 구조적 차이에 의한 것으로 판단되었다^{3,9)}. 또한 50°C 이상에서의 B 값은 설탕용액과 비슷한 3400 cp·K 값을 보이고 있다.

농도에 따른 점도의 영향을 관찰하기 위하여 농도를 40에서부터 75 Brix까지 변화시키면서 점도를 측정하여 Fig. 5에 나타내었다. 그 결과 Brix 50 이하에서는 SOS의 점도가 20~40 cp로 설탕용액의 20~30 cp와 유사한 점도를 보이거나 Brix 50 이상에는 올리고당의 점도가 설탕용액에 비해 증가되어 Brix 70에서는 1,280 cp로 설탕용액의 90 cp보다 15배 높은 값을 나타내고 있다.

따라서 SOS가 낮은 농도에서 설탕과 유사한 점도를 가지고 있으므로 설탕용액 대신에 올리고당을 첨가하면 그 물성적 차이 없이 올리고당의 기능을 할 수 있을 것으로 판단되었다.

2) 안정성

올리고당의 안정성을 검토하기 위하여 Brix 12의 올리고당을 제조하여 pH 및 온도를 변화시키면서 올리고당으로부터 생성되는 단당류를 측정하였다. Fig. 6의 A는 각 용액을 pH 3, 5, 7, 9인 조건에서 140°C로 10분간 가열한 후 잔존하는 올리고당을 나타내었다. SOS는 pH에 대하여 매우 안정한 반면에 설탕용액의 경우는 pH 3에서 매우 불안정한 결과를 나타내었다. 그러므로 유산균 음료와 같이 pH가 낮은 식품에 첨가하여도 분해되지 않기 때문에 식이음료로 사용이 가능할 것으로 판단되었다.

또한 올리고당의 온도 안정성을 검토하기 위하여 pH

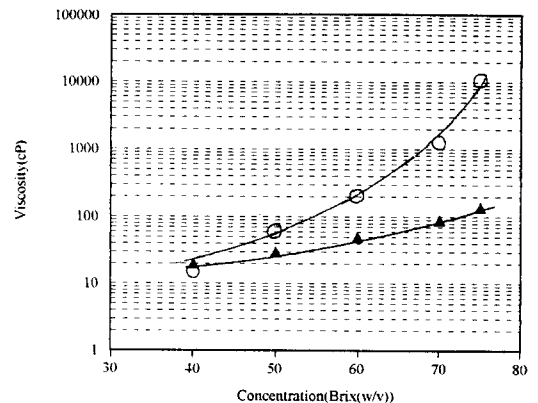


Fig. 5. Effect of concentration on oligosaccharide viscosity. Viscosity was measured by using Brookfield viscometer DV-1+ at 25°C. ▲ : Sucrose ○ : SOS

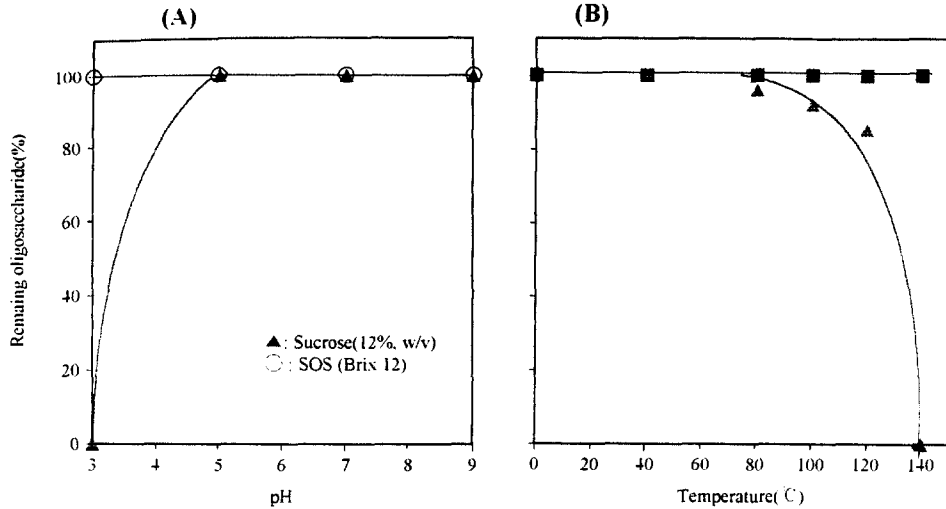


Fig. 6. Effect of pH and temperature on the stability of galactooligosaccharide.

(A) Effect of pH : The sample was incubated 140°C for 10 min and pH was adjusted by 1N NaOH or 1 N HCl.
 (B) Effect of temperature : The sample was incubated each temperature for 10 min at pH 3.

를 3으로 조절한 후 온도를 80~140°C까지 변화시키면서 잔존하는 올리고당을 측정하였다(Fig. 6B). pH 안정성과 마찬가지로 온도에 대하여도 매우 안정하였으며 설탕용액의 경우는 120°C 이상에서는 급격히 분해되는 양상을 보이고 있다. 즉 생산한 갈락토올리고당(SOS)이 온도에 대해 매우 안정하여 과자, 빵, 디저트, 캔디 등의 열처리 식품에 첨가하여 사용하면 분해되지 않기 때문에 기능성 소재로 사용 가능할 것으로 판단되었다.

요 약

대두 및 두유박의 주요 다당류인 대두 arabinogalactan(SAG)을 이용하여 갈락토올리고당을 생산하고자 SAG 가수분해효소인 β -1,4-galactanase를 이용하여 대두 갈락토올리고당(SOS)의 생산조건 및 그 특성을 연구, 검토하였다.

SOS는 SAG 1%(w/v), pH 8.0, 50°C인 조건에서 β -1,4-galactanase를 20 unit/g SAG를 첨가하여 24~40시간 반응하여 생산하였다. 생산된 SOS 용액(75%)은 11,000 cp의 점도를 나타내어 같은 농도의 설탕용액 140 cp의 값에 비해 80배 큰 값을 나타내었다. 점도의 온도 의존성은 50°C 이하에서는 온도의존 함수(B) 값이 11,037 cp·K로 설탕용액의 2,760보다 약 4.6배 크지만 50°C 이상에서는 3,400으로 큰 차이를 보이지 않았다. 또한 올리고당의 농도가 50 Brix 이하에

서는 설탕용액의 점도 20~30 cp와 유사한 20~40 cp로 차이를 보이지 않지만 농도가 증가함에 따라 차이가 커져 Brix 70에서는 1,280 cp로 설탕용액의 90 cp보다 15배 높은 값을 나타내었다. 생산된 SOS는 pH 및 온도에 대해 매우 안정하여 pH 3, 140°C인 조건하에서도 분해로 인하여 생산되는 galactose가 없었다.

참고문헌

- Trowell, H., Southgate, D. A. T, Wolever, T. M. S., Leeds, A. R., Gassull, M. A. and Jenkins, D. J. A. : Dietary fiber redefined, *Lancet*, 1, 67 (1976).
- Anoc. : Dietary fiber, *Food Technol.*, 43(10), 133~140 (1989).
- Cummings, J. H. and Englyst, H. N. : What is dietary fiber?, *Trend. Food Sci. Technol.*, 45(4), 99~132 (1991).
- 박관화, 정기섭, Hidaka, H., Kitahata, S., 서진호, and Kaji, Y. : "올리고당의 기능성", 한국식품과학회 심포지움 (1994).
- Mozaffar, Z., Nakanishi, K. and Matsuno, R. : Continuous production of galacto-oligosaccharides from lactose using immobilized β -galactosidase from *Bacillus circulans*, *Appl. Microb. Biotech.*, 25, 224~228 (1986).
- 유태종 : "최신식품학", p235~237, 보성문화사.
- McCleary, B. V. and Mathesson, N. K. : V. Pectic polysaccharides, *Adv. Carbohydr. Biochem.*, 44, 182~186 (1986).
- 신해현, 변유량 : β -1,4-D-arabinogalactanase 생산균주

- 의 분리 및 효소정제, *한국산업미생물학회지*, 23(6), 687~694 (1995).
9. 신해헌, 변유량 : 호알칼리성 *Bacillus* sp. HJ-12가 생산하는 β -1,4-D-arabinogalactanase의 특성, *한국산업미생물학회지*, 23(6), 710~716 (1995).
10. Morita, M., Okuhara, M., Kikuchi, T. and Sakurai, Y. : Polysaccharides of soybean seeds. Part III. 1, 4-Linked galactodi and trisaccharides from partial acid hydrolysate of the "hot-water-extract" fraction of soybean seed polysaccharides, *Agr. Biol. Chem.* 31(3), 314~318 (1967).
11. Dubois, M., Gills, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. : Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.*, 28(3), 350~356 (1956).
-
- (1997년 10월 8일 접수)