



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년07월31일
(11) 등록번호 10-1291906
(24) 등록일자 2013년07월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 11/02 (2006.01) C12N 9/38 (2006.01)

C12N 9/92 (2006.01) C12P 19/12 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0022608

(22) 출원일자 2012년03월06일

심사청구일자 2012년03월06일

(56) 선행기술조사문헌

Food Chem. 2010, Vol.123, pp.1-5

Chem. Eng. 2011, Vol.28, pp.1096-1100

Enzyme and Microbial Technology. 2006,
Vol.39, pp.903-908

(73) 특허권자

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가 1

(72) 발명자

김승욱

서울특별시 노원구 공릉동 737 삼익아파트
104-905

박철환

서울특별시 성북구 동선동5가 105번지 동선빌라
B동 402호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

한양특허법인

전체 청구항 수 : 총 10 항

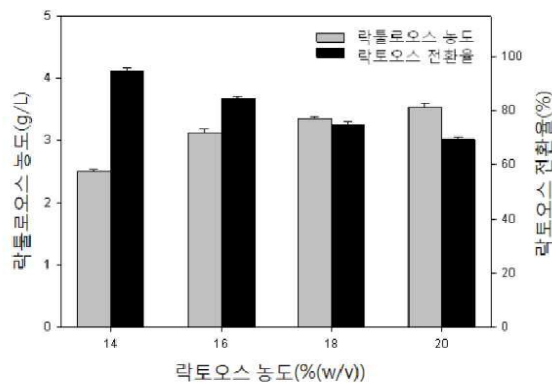
심사관 : 한지혜

(54) 발명의 명칭 락툴로오스 합성 촉매 및 락툴로오스 생산 방법

(57) 요약

본 발명은 락툴로오스 합성 촉매 및 락툴로오스 생산 방법에 관한 것으로, 구체적으로는 유청을 포함하는 기질을 락툴로오스로 전환시키는 담체에 고정된 베타-갈락토시다제 및 글루코오스 이성화효소를 포함하는 촉매 및 이를 이용하여 락툴로오스를 생산하는 방법을 통하여, 기질로 고가의 정제된 유당 대신에 저가의 유청을 이용하여 공정 비용을 감소시키고, 재활용이 가능한 락툴로오스 합성 촉매 및 락툴로오스 생산 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

이희욱

경기도 고양시 일산서구 가좌동 188-1

송윤석

경기도 부천시 원미구 춘의동 184-2 아태리치빌아
파트 503호

한성욱

서울특별시 성북구 길음1동 대우푸르지오아파트
209동 1503호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20110031360

부처명 교육과학기술부

연구사업명 (원천)글로벌프론티어사업

연구과제명 바이오매스의 바이오디젤 및 고부가가치 화학물질 생산을 위한 전환기술 개발

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2010.10.22 ~ 2019.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

기질로 유청을 이용하고, 담체에 고정된 베타-갈락토시다제 및 글루코오스 이성화효소를 포함하는 락툴로오스 합성 촉매.

청구항 2

청구항 1에서, 상기 유청은 유당을 9 내지 25%(w/v)로 포함하는 것을 특징으로 하는 락툴로오스 합성 촉매.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 담체에 고정화된 베타-갈락토시다제의 유닛(U) 및 글루코오스 이성화효소의 유닛(U) 간의 비율은 1:1 내지 1:6인 것을 특징으로 하는 락툴로오스 합성 촉매.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 베타-갈락토시다제 및 글루코오스 이성화효소는 상기 담체와 공유결합하여 고정된 것을 특징으로 하는 락툴로오스 합성 촉매.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 담체는 실리카 겔인 것을 특징으로 하는 락툴로오스 합성 촉매.

청구항 6

베타-갈락토시다제 및 글루코오스 이성화효소를 담체에 고정화하는 단계 및 유청을 포함하는 기질을 반응시키는 단계를 포함하는 락툴로오스 생산 방법.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 유청은 유당을 9 내지 25%(w/v)로 포함하는 것을 특징으로 하는 락툴로오스 생산 방법.

청구항 8

청구항 6에 있어서, 상기 담체에 고정화된 베타-갈락토시다제의 유닛(U) 및 글루코오스 이성화효소의 유닛(U) 간의 비율은 1:1 내지 1:6인 것을 특징으로 하는 락툴로오스 생산 방법.

청구항 9

청구항 6에 있어서, 상기 기질을 반응시키는 단계는 42 내지 65℃ 온도 조건에서 반응되는 것을 특징으로 하는 락툴로오스 생산 방법.

청구항 10

청구항 6에 있어서, 상기 기질은 완충용액을 포함하며, 상기 완충용액의 이온 강도는 20 내지 330mM인 것을 특징으로 하는 락툴로오스 생산 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 락툴로오스 합성 촉매 및 락툴로오스 생산 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 프리바이오틱스(prebiotics)란 대장에 존재하는 유익한 미생물의 성장이나 활성을 선택적으로 촉진하여 인간의

건강을 개선시키는 난소화성 물질이다. 상기 프리바이오틱스의 기능을 나타내는 물질은 대부분 당류이며, 이당류, 올리고당 및 다당류에 속하는 일부의 물질들이 이 부류에 포함된다. 상기 이당류 중 유당의 유도체인 락툴로오스가 대표적인 프리바이오틱스의 기능을 나타낸다.

[0003] 상기 락툴로오스는 소장에서 분해되거나 흡수되지 않고, 대장에 존재하는 비피더스균 및 유산균과 같은 유익균에 의해 이용되며, 변비치료, 만성문맥계뇌증에 있어서 간성혼수의 치료 및 예방에 유용하게 사용되고 있다. 특히 영유아의 변비 및 임신 중 또는 분만 후 변비에도 장기간 안전하게 사용할 수 있는 물질이다.

[0004] 현재, 락툴로오스의 생산은 화학적 합성방법이며, 알칼리 처리에 의한 에피머반응(epimerization)을 이용한다. 상기 화학적 합성방법은 반응산물인 락툴로오스 이외에 다양한 부산물의 생성으로 인하여 의약품 및 특별한 목적의 식품으로 적용 시, 고가의 다단계 정제공정이 수반되어야 하고, 고온고압의 반응 조건 때문에 위험성이 높으며, 화학촉매와 유기용매의 사용으로 인한 공해가 발생할 수 있다.

[0005] 이에 반해, 효소를 이용한 생물전환 합성방법은 반응에 있어 고도의 정밀성, 특이성, 선택성을 지니고, 소규모의 장치로도 생산이 가능하며, 환경 친화적이라는 장점을 가진다. 따라서 화학적 합성방법의 단점을 극복하기 위하여 생촉매인 효소가 알칼리촉매를 대체할 수 있다.

[0006] 그러나, 생물전환 합성방법에서는 기질(substrate)로써 고가의 정제된 유당을 사용하고 있어 경제성이 낮고, 연속공정의 부재 등의 문제점을 가지고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제1989-0009958호

(특허문헌 0002) 대한민국 공개특허 제1992-0000779호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 상기와 같은 종래기술의 문제점을 해결하기 위한 것으로서, 기질로 유청을 사용하여 담체에 고정된 베타-갈락토시다제 및 글루코오스 이성화효소를 포함하는 락툴로오스 합성 촉매를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 담체에 고정화된 베타-갈락토시다제 및 글루코오스 이성화효소에 의한 가수분해반응 및 당전이반응에 의하여 연속적으로 락툴로오스를 합성하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 기질로 유청을 이용하고, 담체에 고정된 베타-갈락토시다제 및 글루코오스 이성화효소를 포함하는 락툴로오스 합성 촉매를 제공한다.

[0011] 본 발명은 베타-갈락토시다제 및 글루코오스 이성화효소를 담체에 고정화하는 단계 및 유청을 포함하는 기질을 반응시키는 단계를 포함하는 락툴로오스 생산 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명의 락툴로오스 합성 촉매는 기존의 락툴로오스 생산에 사용되었던 기질인 고가의 정제된 유당 대신에, 유청을 사용하여 경제적이며, 락툴로오스의 연속적인 생산이 가능하다.

[0013] 또한, 본 발명의 락툴로오스 생산 방법은 락툴로오스의 연속 합성방법으로, 공정의 경제성을 향상시킬 수 있으며, 유당함유 폐액 등을 적극적으로 활용함으로써 자원을 재활용 할 수 있고, 프리바이오틱스 생산 산업 전반에 이용될 수 있다.

[0014] 또한, 기질로서 유청을 사용함으로써, 폐기되는 유청의 이용가치를 높이고, 폐기 및 환경정화의 비용을 감소시킬 수 있으며, 락툴로오스의 생산 비용을 절감시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0015] 도 1은 유청에 포함된 유당(락토오스)의 농도에 따른 락툴로오스의 농도 변화를 나타내는 그래프이다.
- 도 2는 온도에 따른 락툴로오스의 농도 변화를 나타내는 그래프이다.
- 도 3은 완충용액의 이온 강도에 따른 락툴로오스의 농도 변화를 나타내는 그래프이다.
- 도 4는 고정화된 베타-갈락토시다제 및 글루코오스 이성화효소의 비율에 따른 락툴로오스의 농도 변화를 나타내는 그래프이다.
- 도 5는 고정화된 베타-갈락토시다제 및 글루코오스 이성화효소의 재사용에 따른 촉매활성도를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0017] 본 발명은 기질로 유청을 이용하고, 담체에 고정된 베타-갈락토시다제 및 글루코오스 이성화효소를 포함하는 락툴로오스 합성 촉매를 제공한다.
- [0018] 유청(乳清)은 우유가 엉겨서 응고된 뒤 남은 액체이며, 웨이(Whey) 또는 유장(乳漿)이라고도 한다. 보통 치즈나 카세인 제조 과정에서 부산물로 생성되며, 몇몇 상업적인 용도로 이용된다. 유당은 락토오스(lactose), 젖당이라고도 하며, 우유의 대표적인 탄수화물로 1 분자의 글루코오스와 1 분자의 갈락토오스로 구성되어 있는 이당류이다.
- [0019] 갈락토시다제(galactosidase)는 알릴 및 알킬-D-갈락토시드를 가수분해하여 갈락토오스를 생성하는 효소이다. 또한, 가수분해와 함께 갈락토오스 잔기를 다른 당, 알코올 및 페놀로 전이하는 갈락토시드 전달효소 작용도 한다. 상기 갈락토시다제는 알파형 및 베타형으로 구분되며, 상기 베타-갈락토시다제는 락타아제라고도 하고, 베타-D-갈락토시드 외에 유당에도 작용한다.
- [0020] 글루코오스 이성화효소(glucose isomerase)는 글루코오스 즉, 포도당을 과당으로 이성화시키는 반응을 촉진시키는 효소로, 산업적으로는 전분가수분해로 얻어진 포도당으로부터 고과당시럽을 생산하는데 사용된다.
- [0021] 대장에 존재하는 유익한 미생물의 성장이나 활성을 선택적으로 촉진하여 인간의 건강을 개선시키는 난소화성 물질인 프리바이오틱스(prebiotics) 중 하나인 락툴로오스는 소장에서 분해되거나 흡수되지 않고, 대장에 존재하는 유익균, 주로 비피더스균과 일부 유산균에 의해 이용되며, 변비치료, 만성문맥계뇌증에 있어서 간성혼수의 치료 및 예방에 유용하게 사용되고 있고, 특히 영유아의 변비 및 임신 중 또는 분만 후 변비에도 장기간 안전하게 사용할 수 있는 물질이다.
- [0022] 상기 유청을 포함하는 기질을 담체에 고정화된 베타-갈락토시다제 및 글루코오스 이성화효소를 포함하는 락툴로오스 합성 촉매에서, 고정화된 베타-갈락토시다제는 유청에 포함된 유당을 글루코오스 및 갈락토오스로의 가수분해반응시키고, 고정화된 글루코오스 이성화효소에 의한 글루코오스가 과당으로 전환되는 이성질화반응(isomerization)이 일어나게 된다. 또한, 고정화된 베타-갈락토시다제에 의한 갈락토오스와 과당 사이의 당전이 반응에 의하여 락툴로오스를 합성할 수 있다.
- [0023] 상기 락툴로오스 합성 촉매는 종래에 락툴로오스의 합성에 이용되었던 기질로 고가의 정제된 유당을 저가의 유청으로 대체함으로써 경제성을 향상시킬 수 있다.
- [0024] 기질에 포함되는 상기 유청은 유당, 즉 락토오스를 9 내지 25%(w/v)으로 포함하는 것이 바람직하며, 상술한 범위를 만족할 경우, 락툴로오스의 생산성을 향상시킬 수 있고, 고온의 조건에서 유당의 농도로 25%(w/v)를 초과할 경우, 부가 반응에 의하여 부산물이 생성되어 락툴로오스의 생산성이 저하되는 문제점이 있다.
- [0025] 상기 담체에 고정화된 베타-갈락토시다제의 유닛(U) 및 글루코오스 이성화효소의 유닛(U) 간의 비율은 1:1 내지 1:6인 것이 바람직하며, 보다 바람직하게는 1:4 내지 1:6인 것이 좋다. 상술한 범위를 만족할 경우, 고정화된 효소에 의하여 락툴로오스의 생산성이 우수하다. 이때 1 유닛은 1분동안 1 μ mol의 생산물을 생산하는데 필요한 효소의 양을 의미한다.
- [0026] 상기 베타-갈락토시다제 및 글루코오스 이성화효소는 상기 담체와 공유결합하여 고정된 것이 바람직하며, 이때 상기 담체는 실리카 겔인 것이 바람직하나, 담체에 효소를 공유결합에 의하여 고정화시키고, 기질과 반응시키는

데 사용될 수 있는 담체라면 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0027] 본 발명은 베타-갈락토시다제 및 글루코오스 이성화효소를 담체에 고정화하는 단계 및 유청을 포함하는 기질을 반응시키는 단계를 포함하는 락툴로오스 생산 방법을 제공한다.
- [0028] 담체에 고정화된 베타-갈락토시다제 및 글루코오스 이성화효소에 의하여 유청을 포함하는 기질과 연속적으로 반응시킬 수 있으며, 종래에 락툴로오스의 합성에 이용되었던 기질로 고가의 정제된 유당을 저가의 유청으로 대체함으로써 경제성을 향상시킬 수 있다.
- [0029] 기질에 포함되는 상기 유청은 유당, 즉 락토오스를 9 내지 25%(w/v)으로 포함하는 것이 바람직하며, 상술한 범위를 만족할 경우, 락툴로오스의 생산성을 향상시킬 수 있고, 고온의 조건에서 유당의 농도로 25%(w/v)를 초과할 경우, 부가 반응에 의하여 부산물이 생성되어 락툴로오스의 생산성이 저하되는 문제점이 있다.
- [0030] 상기 담체에 고정화된 베타-갈락토시다제의 유닛(U/mL) 및 글루코오스 이성화효소의 유닛(U) 간의 비율은 1:1 내지 1:6인 것이 바람직하며, 보다 바람직하게는 1:4 내지 1:6인 것이 좋다. 상술한 범위를 만족할 경우, 고정화된 효소에 의하여 락툴로오스의 생산성이 우수하다. 이때 1 유닛은 1분동안 1 μ mol의 생산물을 생산하는데 필요한 효소의 양을 의미한다.
- [0031] 상기 기질을 반응시키는 단계는 42 내지 65 $^{\circ}$ C 온도 조건에서 반응되는 것이 바람직하고, 보다 바람직하게는 47 내지 56 $^{\circ}$ C 온도 조건인 것이 좋고, 보다 바람직하게는 53.5 $^{\circ}$ C인 것이 좋다. 상술한 범위를 만족할 경우, 담체에 고정화된 효소의 활성이 증가되고, 그에 따라 기질이 락툴로오스로 전환되는 효율이 우수하다.
- [0032] 상기 기질은 완충용액을 포함하며, 상기 완충용액의 이온 강도는 20 내지 330mM 인 것이 바람직하고, 보다 바람직하게는 50 내지 130mM 인 것이 좋고, 보다 바람직하게는 100mM 인 것이 좋다. 구체적으로, 상기 완충용액은 pH 6 내지 pH 8인 인산 완충용액을 사용하는 것이 바람직하며, 상기 완충용액의 이온 강도가 상술한 범위를 만족할 경우, 고정화된 효소가 기질을 락툴로오스로 전환시키는데 최적 pH를 만족시킬 수 있어, 락툴로오스의 생산성이 증가한다.
- [0033] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.
- [0034] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0035] <실시예 1>
- [0036] 1. 베타-갈락토시다제 및 글루코오스 이성화효소의 고정화를 위한 담체의 제조
- [0037] 베타-갈락토시다제 및 글루코오스 이성화효소를 담체에 고정화시키기 위하여, 건조된 실리카 겔 1g을 15%(v/v) 3-아미노프로필트리에톡시실란((3-aminopropyl)triethoxysilane)을 포함하는 아세톤(acetone) 용액 20mL에 첨가한 후, 50 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 일정하게 교반하며 반응시켰다.
- [0038] 상기 반응된 실리카 겔을 증류수로 세척한 후 60 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 건조시켰다. 상기 건조된 실리카 겔 및 2.6M 글루타르알데히드(glutaraldehyde) 용액 1.6mL을 100mM 인산완충용액(pH 8.0) 18.4mL에 첨가하였고, 20 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 반응시켰다. 이후 활성화된 실리카 겔을 증류수로 세척한 다음 60 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 건조시켰다.
- [0039] 2. 유당을 이용한 베타-갈락토시다제의 전처리
- [0040] 클루이베로마이세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*)로부터 유래한 10%(v/v)의 베타-갈락토시다제(시그마, 미국) 및 전처리 물질로 30mM의 유당을 100mM 인산완충용액(pH 7.2)에 첨가하여 20mL의 반응 수용액(reaction mixture)을 제조하였다. 상기 반응 수용액을 37 $^{\circ}$ C, 150rpm에서 1시간 동안 반응시켜 베타-갈락토시다제를 전처리하였다.
- [0041] 3. 자일로스를 이용한 글루코오스 이성화효소의 전처리
- [0042] 스트렙토마이세스 루비지노수스(*Streptomyces rubiginosus*)로부터 유래한 글루코오스 이성화효소(헵프톤 리서치, 미국) 400U, 20mM MgSO₄·7H₂O, 1mM CoCl₂·6H₂O 및 전처리 물질로 2.0M의 자일로오스(xylose)를 200mM 인산완충용액(pH 7.0)에 첨가하여 20mL의 반응 수용액(reaction mixture)을 제조하였다. 상기 반응 수용액을 60 $^{\circ}$ C, 200 rpm에서 45분간 반응시켜 글루코오스 이성화효소를 전처리하였다.

- [0043] 4. 유당을 이용하여 전처리된 베타-갈락토시다제의 고정화
- [0044] 상기 활성화된 실리카 겔 1g을 상기 전처리한 베타-갈락토시다제 용액에 첨가하였고, 20℃에서 12시간 동안 반응시켰다. 이후 상기 반응액을 여과하고, 100 mM 인산완충용액(pH 7.2)으로 세척한 후, 실온에서 건조시킴으로써 고정화된 베타-갈락토시다제를 제조하였다.
- [0045] 5. 자일로오스를 이용하여 전처리된 글루코오스 이성화효소의 고정화
- [0046] 상기 활성화된 실리카 겔 1g을 상기 전처리한 글루코오스 이성화효소 용액에 첨가하였고, 20℃에서 12시간 동안 반응시켰다. 이후 상기 반응액을 여과하고, 200mM 인산완충용액(pH 7.0)으로 세척한 후, 실온에서 건조시킴으로써 고정화된 글루코오스 이성화효소를 제조하였다.
- [0047] 6. 유청 내 함유된 유당용액의 제조
- [0048] 건조된 유청(시그마, 미국) 200g을 50mM 인산완충용액(pH 7.5) 100mL에 혼합하였다. 이후 상기 혼합액은 10,000rpm에서 20분간 원심분리 되었고, 새로운 비이커에 옮겨진 상등액은 pH 7.5로 조절되었으며, 이 용액을 다시 10,000 rpm에서 20분간 원심분리 하여, 유청 내 함유된 유당용액의 농도가 20%(w/v)인 유당용액을 제조하였다.
- [0049] <실시예 2>
- [0050] 상기 실시예 1에서, 상기 농도가 20%(w/v)인 유당용액을 50mM 인산완충용액(pH 7.5)에 의한 희석을 통하여 14%(w/v)의 유당용액을 제조한 것을 제외하고, 실시예 1과 동일하게 실시하였다.
- [0051] <실시예 3>
- [0052] 상기 실시예 1에서, 상기 농도가 20%(w/v)인 유당용액을 50mM 인산완충용액(pH 7.5)에 의한 희석을 통하여 16%(w/v)의 유당용액을 제조한 것을 제외하고, 실시예 1과 동일하게 실시하였다.
- [0053] <실시예 4>
- [0054] 상기 실시예 1에서, 상기 농도가 20%(w/v)인 유당용액을 50mM 인산완충용액(pH 7.5)에 의한 희석을 통하여 18%(w/v)의 유당용액을 제조한 것을 제외하고, 실시예 1과 동일하게 실시하였다.
- [0055] <실시예 5>
- [0056] 상기 실시예 1에서, 건조된 유청(시그마, 미국) 200g을 50mM 인산완충용액(pH 7.5) 100mL에 혼합하는 것 대신에, 100mM 인산완충용액(pH 7.5) 100mL에 혼합하는 것을 제외하고, 실시예 1과 동일하게 실시하였다.
- [0057] <실시예 6>
- [0058] 상기 실시예 1에서, 건조된 유청(시그마, 미국) 200g을 50mM 인산완충용액(pH 7.5) 100mL에 혼합하는 것 대신에, 150mM 인산완충용액(pH 7.5) 100mL에 혼합하는 것을 제외하고, 실시예 1과 동일하게 실시하였다.
- [0059] <실시예 7>
- [0060] 상기 실시예 1에서, 건조된 유청(시그마, 미국) 200g을 50mM 인산완충용액(pH 7.5) 100mL에 혼합하는 것 대신에, 200mM 인산완충용액(pH 7.5) 100mL에 혼합하는 것을 제외하고, 실시예 1과 동일하게 실시하였다.
- [0061] <실시예 8>
- [0062] 상기 실시예 1에서, 건조된 유청(시그마, 미국) 200g을 50mM 인산완충용액(pH 7.5) 100mL에 혼합하는 것 대신에, 250mM 인산완충용액(pH 7.5) 100mL에 혼합하는 것을 제외하고, 실시예 1과 동일하게 실시하였다.
- [0063] <실시예 9>
- [0064] 상기 실시예 1에서, 건조된 유청(시그마, 미국) 200g을 50mM 인산완충용액(pH 7.5) 100mL에 혼합하는 것 대신에, 300mM 인산완충용액(pH 7.5) 100mL에 혼합하는 것을 제외하고, 실시예 1과 동일하게 실시하였다.
- [0065] <실험예 1: 고정화된 베타-갈락토시다제의 활성도 측정>
- [0066] 고정화된 베타-갈락토시다제의 활성도는 *o*-니트로페닐- β -D-갈락토피라노사이드(*o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside, *o*-NPG)의 가수분해(hydrolysis) 측정에 의하여 수행하였다. 20mM 인산완충용액(pH 7.0) 10mL에 5mM *o*-NPG 및 상기 실시예 1에서 제조된 고정화된 베타-갈락토시다제 100mg을 첨가하여 37℃, 150rpm에

서 10분간 반응시켰다.

[0067] 그 후, 1.0M의 탄산나트륨(Na_2CO_3) 2mL를 첨가하여 반응을 정지시켰고, 410nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도를 기준 곡선(standard curve)에 대입하여 고정화된 베타-갈락토시다제의 활성도를 측정하였고, 1유닛(unit)의 효소 활성도는 1분간 1 μmol 의 *o*-NPG를 *o*-니트로페놀(*o*-nitrophenol)로 가수분해하는 효소의 양으로 계산하였다.

[0068] <실험예 2: 고정화된 글루코오스 이성화효소의 활성도 측정>

[0069] 고정화된 글루코오스 이성화효소의 활성도는 글루코오스로부터 전환된 과당 농도의 측정에 의하여 수행하였다. 200 mM 인산완충용액(pH 7.0) 10 mL에 0.2 M 글루코오스, 20 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 mM $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 그리고 상기 실시예 5에서 제조된 고정화된 글루코오스 이성화효소 100 mg을 첨가하여 60℃, 100 rpm에서 30분간 반응시켰고, 20%(v/v)의 HCl 2 mL를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 반응액 1 mL와 아세트산(acetic acid, glacial) 100 mL에 티오우레아(thiourea) 0.25 g, 레조르시놀(resorcinol) 0.1 g을 첨가하여 제조한 레조르시놀 시약 1 mL 그리고 30%(v/v)의 HCl 4 mL를 첨가하여 80℃에서 10분간 반응시켰다. 그 후, 반응액을 냉각시켰고, 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도를 기준 곡선(standard curve)에 대입하여 고정화된 글루코오스 이성화효소의 활성도를 측정하였고, 1유닛(unit)의 효소 활성도는 1분간 1 μmol 의 글루코오스를 과당으로 전환시키는 효소의 양으로 계산하였다.

[0070] <실험예 3: 탄수화물의 농도 측정>

[0071] 반응기질인 유당 및 과당과 반응산물인 락툴로오스의 농도는 고성능액체크로마토그래피(high-performance liquid chromatography; HPLC)를 이용하여 측정하였다. 고성능탄수화물컬럼(High performance carbohydrate column, 4.6 mm×250 mm, Waters Co., USA)과 굴절율 검출기(RI detector)를 사용하였고, 컬럼오븐(column oven)의 온도와 이동상의 유속은 각각 35℃, 분당 1.4 mL이었으며, 이동상은 아세토니트릴(acetonitrile) 대비 초순수(deionized water)의 비율이 8:2(v/v)인 용액을 제조하여 사용하였다.

[0072] <실험예 4: 유당 내 함유된 유당농도가 락툴로오스 합성에 미치는 영향>

[0073] 상기 실시예 1 내지 4의 유당용액 5mL에 상기 고정화된 베타-갈락토시다제 및 글루코오스 이성화효소를 각각 12U/mL을 첨가하여 47℃에서 락툴로오스 합성반응을 수행하였고, 유당과 락툴로오스의 농도는 상기 실험예 3과 같이 측정하였다.

[0074] 그 결과, 도 1에서 보는 바와 같이, 유당의 전환율은 유당 농도의 증가에 따라 점차 감소되었다. 이에 반해, 합성된 락툴로오스 농도는 점차 증가하였다. 즉, 락툴로오스 합성은 유당 농도에 의존적이었다. 또한, 20%(w/v)의 유당 농도에서 3.54 g/L로 가장 높은 락툴로오스 농도를 얻었다.

[0075] <실험예 5: 반응 온도가 락툴로오스 합성에 미치는 영향>

[0076] 상기 실시예 1 내지 4에서 제조된 20%(w/v) 유당용액 5mL에 상기 고정화된 베타-갈락토시다제와 글루코오스 이성화효소를 각각 12U/mL을 첨가하여 각각 47, 50, 53.5, 57 및 60℃에서 락툴로오스 합성반응을 수행하였고, 락툴로오스의 농도는 상기 실험예 3과 같이 측정하였다.

[0077] 그 결과, 도 2에서 보는 바와 같이, 합성된 락툴로오스의 농도와 비생산성은 53.5℃까지 점차 증가하였고, 그 이상의 온도에서는 감소하였다. 락툴로오스 합성을 위해 온도는 42 내지 65℃인 것이 바람직하고, 보다 바람직하게는 47 내지 55℃인 것이 좋고, 보다 바람직하게는 53.5℃인 것이 좋다. 2.5시간 반응 후에 락툴로오스 농도는 4.81g/L, 비생산성은 0.16mg/Uh를 나타내었다.

[0078] <실험예 6: 인산완충용액의 이온 강도가 락툴로오스 합성에 미치는 영향>

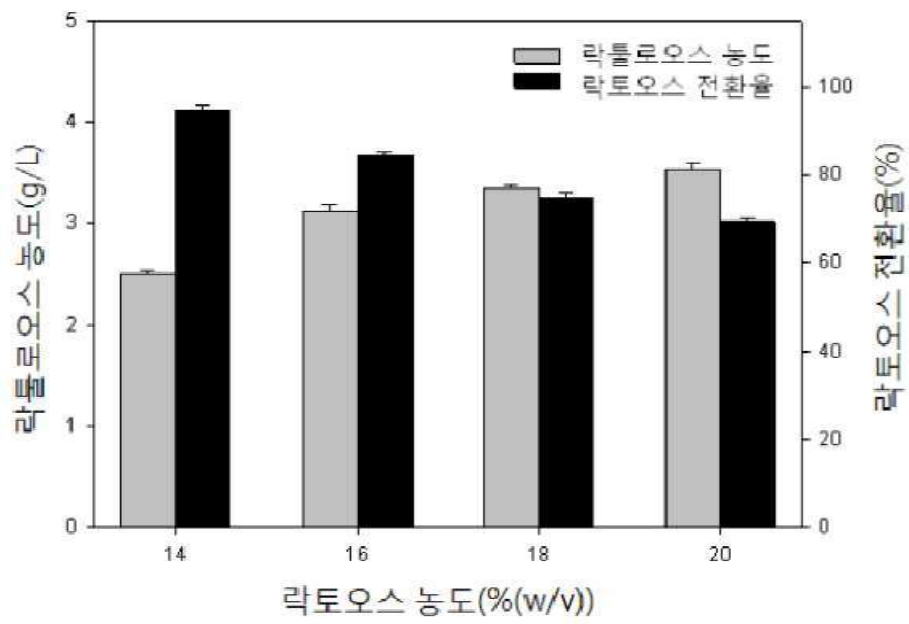
[0079] 상기 실시예 1, 5 내지 9에서 제조된 유당용액 5mL에 상기 고정화된 베타-갈락토시다제 및 글루코오스 이성화효소를 각각 12U/mL을 첨가하여 53.5℃에서 락툴로오스 합성반응을 수행하였고, 락툴로오스의 농도는 상기 실험예 3과 같이 측정하였다.

[0080] 그 결과, 도 3에서 보는 바와 같이, 합성된 락툴로오스의 농도와 비생산성은 100mM의 이온 강도까지 점차 증가하였고, 그 이상의 이온 강도에서는 감소하였다. 락툴로오스 합성을 위한 인산완충용액의 이온 강도는 20 내지 330mM 인 것이 바람직하고, 보다 바람직하게는 50 내지 130mM 인 것이 좋고, 보다 바람직하게는 100mM 인 것이 좋다. 이때, 2시간 반응 후에 락툴로오스 농도는 5.18g/L, 비생산성은 0.22mg/Uh를 나타내었다.

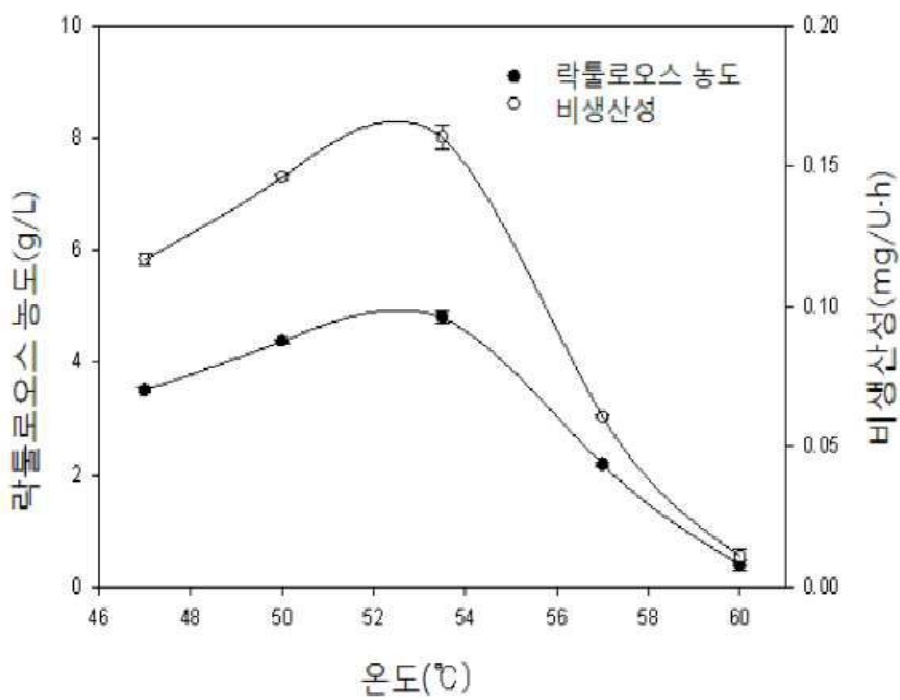
- [0081] <실험예 7: 고정화된 베타-갈락토시다제와 글루코오스 이성화효소의 비율이 락툴로오스 합성에 미치는 영향>
- [0082] 상기 실시예 5에서 100mM 인산완충용액(pH 7.5)을 사용하여 제조된 유당용액 5mL에 상기 고정화된 베타-갈락토시다제와 글루코오스 이성화효소의 비율, 즉 고정화된 베타-갈락토시다제의 유닛(U)과 글루코오스 이성화효소의 유닛(U) 간의 비율을 각각 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 및 1:6으로 첨가하여 53.5℃에서 락툴로오스 합성반응을 수행하였다.
- [0083] 이 때, 상기 1:1의 비율은 고정화된 베타-갈락토시다제 및 고정화된 글루코오스 이성화효소가 각각 반응되는 기질의 부피(mL)에 대하여 12U/mL로 포함된 것을 나타내고, 락툴로오스의 농도는 상기 실험예 3과 같이 측정하였다.
- [0084] 그 결과, 도 4에서 보는 바와 같이, 과당의 농도는 1:6의 고정화 효소들의 비율까지 점차 증가하였고, 이 때, 과당의 농도는 33.9g/L이었다. 합성된 락툴로오스 농도도 과당 농도의 증가에 따라 1:5의 고정화된 효소들의 비율까지 점차 증가하였지만, 1:6의 비율에서는 약간 감소하였다. 락툴로오스 합성을 위한 최적의 고정화 효소들의 비율은 1:5로 관찰되었고, 2시간 반응 후에 락툴로오스 농도는 7.68g/L, 비생산성은 0.32 mg/Uh을 나타내었다. 따라서, 높은 과당의 농도가 락툴로오스 합성을 향상시키는 중요한 인자라는 것을 관찰할 수 있었다.
- [0085] 이를 통하여 고정화된 베타-갈락토시다제와 글루코오스 이성화효소를 동시에 사용하여 락툴로오스 합성을 위한 단일 기질인 유청 내 함유된 유당으로부터 락툴로오스가 합성될 수 있음을 확인할 수 있었다.
- [0086] <실험예 8: 고정화된 베타-갈락토시다제와 글루코오스 이성화효소의 재사용 시 활성화도 변화 조사>
- [0087] 실시예 5의 100mM 인산완충용액(pH 7.5)을 사용하여 제조된 20%(w/v) 유당용액 5mL에 상기 고정화된 베타-갈락토시다제 12U/mL 및 글루코오스 이성화효소 60U/mL을 첨가하여 53.5℃에서 2시간 동안 락툴로오스 합성반응을 7회 반복 수행하면서 고정화된 베타-갈락토시다제 및 글루코오스 이성화효소의 활성화도 변화를 관찰하였다.
- [0088] 이 때, 단일 배치(batch) 반응이 종료된 후, 고정화된 베타-갈락토시다제와 글루코오스 이성화효소는 원심분리에 의하여 수거되었다. 상기과 같이 수거한 고정화된 베타-갈락토시다제와 글루코오스 이성화효소는 100mM 인산완충용액(pH 7.5)으로 수차례 세척한 후, 다음 배치 반응에 재사용되었고, 락툴로오스의 농도는 상기 실험예 3과 같이 측정하였다.
- [0089] 그 결과, 최초 반응에서 합성된 락툴로오스의 농도는 7.54g/L이었다. 이후, 7회 재사용하였을 때, 합성된 락툴로오스의 농도는 4.31g/L이었고, 도 5에서 보는 바와 같이, 최초 반응에서의 활성화도와 비교하여 57.1%의 활성화도가 유지되었음을 확인할 수 있었다.

도면

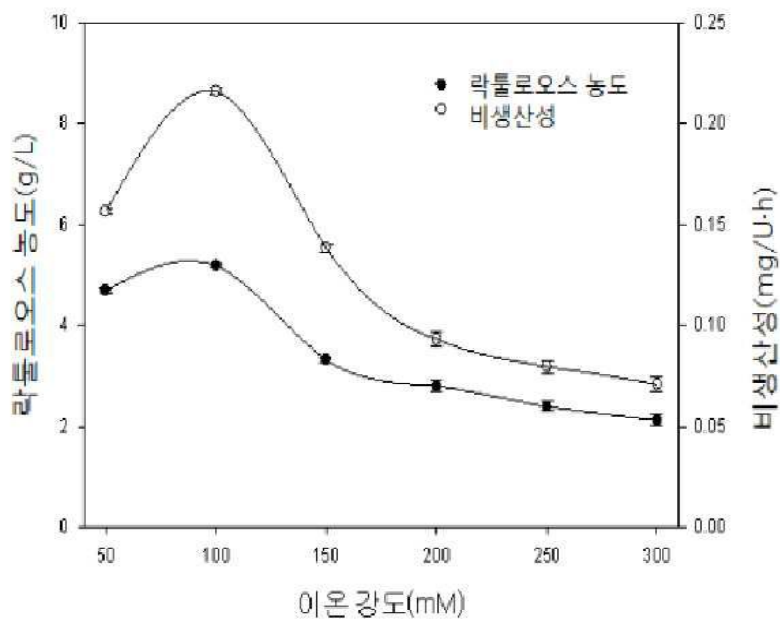
도면1



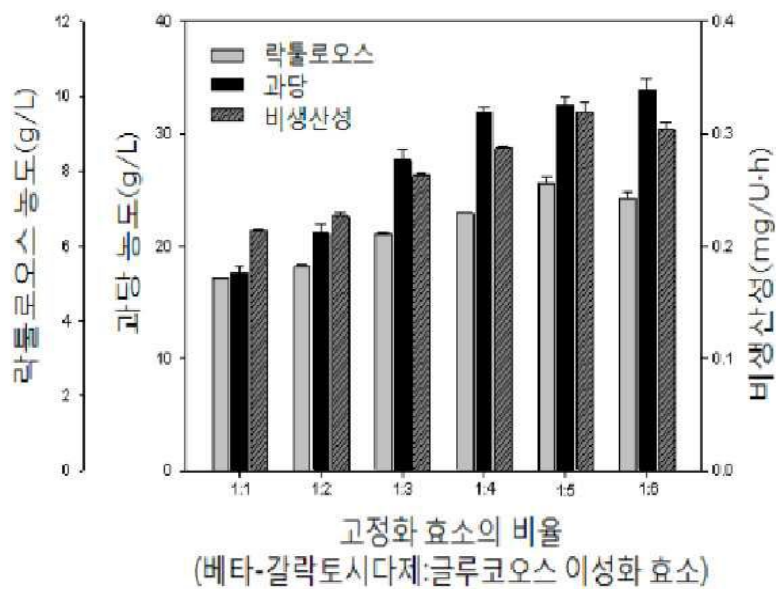
도면2



도면3



도면4



도면5

