



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

공 학 석 사 학 위 논 문

쌀가루를 이용한 말토올리고당과
이소말토올리고당의 제조 및
프리바이오틱 효과



부 경 대 학 교 대 학 원

식 품 공 학 과

박 지 인

공 학 석 사 학 위 논 문

쌀가루를 이용한 말토올리고당과
이소말토올리고당의 제조 및
프리바이오틱 효과

지 도 교 수 양 지 영

이 논문을 공학석사 학위논문으로 제출함.

2019년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

식 품 공 학 과

박 지 인

박지인의 공학석사 학위논문을 인준함

2019년 2월 22일



위 원 장 약학박사 김 영 목 (인)

위 원 농학박사 이 양 봉 (인)

위 원 농학박사 양 지 영 (인)

목 차

Abstract	iii
I. 서론	1
II. 실험방법 및 재료	4
1. 실험 재료	4
2. 쌀가루의 액화 반응	4
3. 말토올리고당의 제조	6
4. 이소말토올리고당의 제조	6
5. 액화액의 환원당 측정	9
6. HPLC-CAD를 이용한 올리고당 분석	9
7. 말토올리고당 및 이소말토올리고당의 이화학적 특성	10
8. 이소말토올리고당의 프리바이오틱 효과	10
9. 통계처리	13
III. 결과 및 고찰	14
1. 쌀가루의 액화반응에 미치는 Termamyl 2X 효소 농도 및 반응 시간에 따른 효과.....	14
2. HPLC-CAD를 이용한 말토올리고당 및 이소말토올리고당의 동시분석	17

3. 말토올리고당의 제조를 위한 당화효소의 효과	20
4. 이소말토올리고당의 제조를 위한 당화효소와 전이효소의 동시 반응 효과	24
5. 이소말토올리고당 제조를 위한 당화효소와 전이효소의 농도에 따른 동시반응 효과	28
6. 이소말토올리고당 제조를 위한 당화효소와 전이효소의 동시 반응 시 반응시간에 따른 당 조성 변화	36
7. 제조된 말토올리고당과 이소말토올리고당의 이화학적 특성	39
8. 제조된 이소말토올리고당이 장내 미생물의 생육에 미치는 효과	41
IV. 요약	48
V. 참고문헌	50

Production and Prebiotic Activity of Maltooligosaccharides
and Isomaltooligosaccharides from Rice Flour

Ji-In Park

Department of Food Science & Technology, Pukyong National University,
Busan 48513, Korea

Abstract

This study was aimed to manufacture maltooligosaccharides(MO) and isomaltooligosaccharides(IMO) using rice flour. To determine the optimal condition of enzyme reaction(liquefaction, saccharification and transglucosylation), Termamyl 2X, Maltogenase L, Promozyme D2, Fungamyl 800L and Transglucosidase L were used. The contents of MO and IMO were examined by HPLC with charged aerosol detector(HPLC-CAD) in each manufacturing process. Liquefaction reaction of rice flour was performed according to different Termamyl 2X concentration(0.025%, 0.05%, 0.075%, 0.1%) and reaction time(1h, 2hs). As a result, reaction with 0.075% of Termamyl 2X during 2hrs was the optimal condition. For the preparation of maltooligosaccharides, different saccharification enzymes were added and total maltooligosaccharide contents were compared. As a result, the highest total maltooligosaccharide content was 108.31 g/L when saccharification enzyme was not added. Therefore, it was concluded that the maltooligosaccharide preparation was possible only by the liquefaction reaction. In order to optimize the production of isomaltooligosaccharides, the selection of enzyme, optimal enzyme concentration, and optimal enzyme reaction time were investigated. As a result of the enzyme selection experiment, Maltogenase L,

Promozyme D2, and Transglucosidase L, which produced the most total isomaltooligosaccharide at the same time, were selected as the optimum enzyme combination. Optimal enzyme concentration was 0.0015% Maltogenase L, 0.05–0.1% Promozyme D2 and 0.1% Tansglucosidase L. This condition decreased glucose contents and increased the content of isomaltooligosaccharide with high degree of polymerization. Change of sugar contents was observed every 6 hours to determine optimal enzyme reaction time. As a result, reaction for 36 hrs was determined as optimal conditions. The isomaltooligosaccharides 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 isomaltooligosaccharide in the total sugar was 56.37%. To confirm prebiotic effect on isomaltooligosaccharides, growth of intestinal microflora (*Lactobacillus acidophilus* KCTC 3140, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* KCTC 3636, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* KCTC 3635, *Lactobacillus reuteri* KCTC 3594, *Lactobacillus gasseri* KCTC 3181, *Lactobacillus rhamnosus* KCTC 5033, *Escherichia coli* KCTC 1682 and *Salmonella* spp.) was evaluated. The growth of *Lactobacilli* was enhanced, but the growth of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. was inhibited.

I. 서론

쌀은 벼과에 속하는 식물로 밀, 보리와 함께 세계적으로 중요한 농산물이다. 쌀은 탄수화물, 단백질, 지방, 식이섬유, 미네랄 등의 영양성분이 존재하고 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, 2017년 1인당 쌀 소비량은 연간 61.8 kg으로 1986년 소비량의 절반 수준으로 감소하였다(통계청, 2017). 또한 쌀 수요는 햅쌀이 높기 때문에 묵은 쌀의 재고를 시장에 풀지 못할 뿐더러 그 재고량이 적정 수준을 넘고 있어 문제로 대두되고 있다. 2015년에는 쌀 재고량이 163만 톤에 그쳤고(농림축산식품부, 2015), 잉여 쌀은 보관비용의 발생으로 경제적 손실을 초래하고, 농민에게는 소득원의 감소라는 문제점을 가져온다. 국내 제조업 부문 쌀 소비량은 가공 산업의 78% 이상이 주정(30.5%), 떡류(23.9%), 도시락 및 식사용 조리식품(16.2%), 탁주 및 약주(8.0%)를 제조하는 데 편중되어 있으며(통계청, 2017), 그 중 도시락용 쌀 수요가 증가하고 있지만 주로 햅쌀을 사용하기 때문에 비축하고 있는 쌀을 소비할 수 있는 새로운 쌀 수요 창출이 요구되며 다양한 쌀 가공 식품의 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 필요하다고 사료된다.

말토올리고당은 포도당 3~10개가 α -(1→4) 결합으로 연결된 직쇄 올리고당이다. 저감미, 저점도, 전분의 노화방지 억제효과, 우수한 보습성을 가지고

있어 냉동 빵 생지, 냉동식품, 제과, 제빵, 양금, 두유제품 등에 물성 개선의 목적으로 사용되고 있다(Lee et al., 1998). 이소말토올리고당은 포도당 분자가 α -1,6 결합을 하고 있는 분지올리고당으로, 당 전이 효소에 의해 맥아당이나 말토올리고당의 전이반응으로 만들어진다. 대표적으로 isomaltose, panose, isomaltotriose, isomaltotetraose 등이 있다. 이소말토올리고당에 대한 다양한 생리학적 기능성들이 연구되었는데, 장내 효소에 의해 서서히 분해되기 때문에 혈당지수를 낮추며(Sheng et al., 2006), 장내 유익균들을 증식시켜 정장작용을 촉진시키고, 면역기능을 향상시키며 일부 미네랄의 생체 이용률을 높이고, 중성지방의 신진대사를 촉진하고(Qiang et al., 2009), 혈중 콜레스테롤을 개선하는 등(Yen et al., 2011)의 효과가 있다고 보고되었다. 또한 이소말토올리고당은 열 안정성, 저점도, 높은 보습성 등의 특징으로 식품에 광범위하게 응용이 가능하고 효모에 의해 발효되지 않아 베이킹이나 주정, 조미료 등에 감미료로 사용이 가능하다(Gourineni et al., 2018). 이에 따라 기능성 식품소재로 주목받고 있으며, 설탕 대체 천연감미료 및 자연당 시장이 지속적으로 성장하고 있는 추세이기 때문에 그 소비도 계속 늘어나고 있다.

지금까지 이소말토올리고당의 효율적인 생산을 위해 다양한 연구가 보고되었다. 유전자 변형을 통한 효소생산으로 이소말토올리고당의 수율을 높였지만 이러한 효소를 사용하여 상업적인 응용은 어렵고, 최적화 반응조건에 대한 연구도 보고된 바 없다. 따라서 이소말토올리고당 각 생산 단계의 최적화를 연구하여 효율적인 새로운 공정을 개발하고자 한다.

본 연구에서는 쌀을 원료로 하여 말토올리고당과 이소말토올리고당을 제조하기 위해 액화반응, 당화·전이 동시반응의 최적 조건을 탐색하였다. 올리고당의 효율적인 생산을 위하여 효소 종류, 효소 농도, 반응 시간에 변화를 주어 조사하였으며, 제조 조건별 당 조성 및 함량을 분석하였다. 또한, 제조된 쌀 이소말토올리고당으로 장내 세균의 생육 활성을 확인하여 프리바이오틱스

의 효과를 확인하고자 하였다.



II. 실험 재료 및 방법

1. 실험 재료

실험에 사용된 쌀가루는 시중에서 판매되고 있는 쌀 함량 100%의 국산 쌀가루를 사용하였다. 쌀가루의 입자 크기는 180~250 μm 이었다. 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 첨가해주었으며, 실험에 사용된 상업적 효소의 최적 활성 조건 및 유래는 Table 1과 같았다.

2. 쌀가루의 액화 반응

쌀가루와 증류수를 1대 4의 비율로 혼합하여 분산시킨 후, 칼슘 이온이 70 ppm이 되도록 CaCO_3 를 첨가하고, 1 N HCl를 사용하여 pH를 6.0~6.4로 조정하였다. 쌀 슬러리가 담긴 샘플병을 항온수조에 넣고 진탕하다가 60°C가 되면 Termamyl 2X를 첨가하여 급격한 호화를 방지하였다. 95°C가 되는 순간부터 시간을 측정하여 1시간 마다 액화액을 채취하였고, -80°C에

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	<i>Bacillus licheniformis</i>
Maltogenase L	55-65	4.5-5.5	Novozymes	<i>Bacillus subtilisamyloliquefaciens</i>
Promozyme D2	55-60	4.2-5.4	Novozymes	<i>Bacillus acidopullulyticus</i>
Fungamyl 800 L	53-58	5.0-6.0	Novozymes	<i>Aspergillus niger</i>
Transglucosidase L	55-60	5.0-5.5	Amano	<i>Aspergillus niger</i>

서 냉동보관 하여 이후에 환원당 측정에 사용하였다.

3. 말토올리고당의 제조

액화를 마친 액화액은 당화효소의 최적 조건으로 맞추기 위해 온도는 55°C로 낮추었고, pH는 효소의 최적 조건으로 맞추기 위해 1 N HCl 또는 1 N NaOH로 조정되었다. 당화를 위해 Maltogenase L, Promozyme D2, Fungamyl 800L이 사용되었고, 사용된 효소 종류에 따라 3가지 실험군을 설정하였다. 첫 번째 실험군은 액화액을 제조한 후 반응 온도만 55°C로 낮추는 것이고(T), 두 번째 실험군은 액화액을 제조한 후 Maltogenase L과 Promozyme D2를 각각 기질의 0.1%(v/w)로 첨가하여 반응시킨 것이고(MP), 세 번째 실험군은 액화액을 제조한 후 Fungamyl 800L을 기질의 0.1%(v/w)로 첨가하여 반응시킨 것이다(F). 각 실험군들을 24시간 동안 반응시켜서 말토올리고당의 조성을 조사하였다.

4. 이소말토올리고당의 제조

이소말토올리고당의 제조를 위하여 당화 및 전이효소를 동시에 첨가하여 반응시켰다. 당화반응과 전이반응을 순차적으로 진행했을 때 보다 당화반응과 전이반응을 동시에 했을 때 이소말토올리고당의 수율도 증가하고 glucose의 함량도 감소하였다(Basu et al., 2016). 액화액의 온도를 55°C로 하강시킨 후 당화효소와 전이효소의 공통조건으로 pH와 온도를 조절하여

반응시켰다.

이소말토올리고당을 제조하기 위한 최적의 효소를 탐색하기 위해 Pan et al.(2005)의 방법을 응용하였고, 3가지 실험군을 설정하여 실험을 진행하였다. 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 실험군은 액화액을 제조한 후 Fungamyl 800L, Transglucosidase L을 각각 0.1%(v/w) 첨가한 것이다(F+TG). 각 실험군들을 24시간 반응시켜 생성된 이소말토올리고당의 함량을 조사하였다.

이소말토올리고당을 제조하기 위한 최적 효소농도를 설정하기 위해 Maltogenase L, Promozyme D2, Transglucosidase L의 농도를 다르게 하여 반응시켰으며, 그 조건은 Table 2와 같았다. 각 효소의 역할을 알아보기 위하여 3개 중 2개의 효소는 상업적 정량을 첨가하였고, 나머지 하나의 효소만 정량의 10배 및 100배 희석하여 첨가하였다. 또한 3가지 효소 모두 정량을 첨가한 실험군(MAX)을 두어 비교할 수 있게 하였다. 그리고 60°C에서 효소반응 1, 4.5, 9, 18 및 36시간마다 당화액을 채취하여 이소말토올리고당 함량을 분석하였다.

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

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

5. 액화액의 환원당 측정

환원당은 DNS 방법(Miller, 1959)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, USA)를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선을 작성하기 위해 맥아당을 표준물질로 하여 회귀방정식을 구하였으며, 이를 이용해 시료의 환원당 함량을 계산하였다.

6. HPLC-CAD를 이용한 올리고당 분석

정량분석에 사용되는 표준물질 중 glucose, maltose, isomaltose, panose, isomaltotriose는 Sigma사(USA)에서 구입하였으며, maltotriose, maltotetraose, maltopentaose, maltohexaose, maltoheptaose, maltooctose, maltononaose는 Elicityl Oligotech(France)에서 구입하였으며, isomaltotetraose, isomaltopentaose는 Toronto Research Chemicals (Canada)에서 구입하였으며, isomaltohexaose는 Carbosynth사(UK)에서 구입하였다. 검량선 작성을 위한 표준용액의 조제를 위해 각 표준물질을 10,000 ppm 용액으로 제조하였고, 이들을 동량으로 혼합 및 희석하여 사용하였다. 표준용액 및 쌀 당화액은 0.45 µm syringe filter(Advantec, Japan)를 이용하여 여과한 후 최종시료로 사용하였다. 말토올리고당과 이소말토올리고당의 정량분석을 위한 기기는 HPLC(Thermo scientific, UltiMate 3000)가 사용되었고, 검출기로는 Charged Aerosol Detector(Corona Veo RS, Thermo scientific)가 사용되

었다. 컬럼은 HILICpak VG-50 4E(Shodex, Japan)을 사용했으며, 분석 조건은 Table 3과 같았다.

7. 말토올리고당 및 이소말토올리고당의 이화학적 특성

효소반응이 끝난 당액은 90°C에서 5분간 가열하여 불활성화 시켰다. 그리고 pH 조정을 위해 사용하였던 1 N HCl을 중화하기 위해 1 N NaOH를 같은 양으로 첨가해주었다. Filter paper(Advantec, No.2)를 통해 시럽박을 제거한 뒤, 감압농축기로 농축하여 시럽의 형태로 제조하였다.

당도 측정은 시럽 일정량을 취하여 refractometer(PAL-2, Atago, Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였다. pH 측정은 시럽을 증류수에 10배 희석하여 균질화 한 후 pH meter(ORION 3 STAR, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)로 측정하였다. 색도 측정은 색차계(Serie sp60, Lovibond, Amesbury, UK)를 사용하여 L(lightness), a(redness), b(yellowness)값으로 나타내었다.

8. 이소말토올리고당의 프리바이오틱 효과

제조한 이소말토올리고당의 프리바이오틱 효과를 알아보기 위해 장내 유익균주와 유해균을 사용하였다(Table 4). 실험에 사용하기 전에 2세대 계대 배양하여 활성화시킨 후 배양액의 흡광도가 660 nm에서 0.3이 되도록 희석하여 준비하였다. 미생물의 생육을 위한 탄소원으로는 glucose와 제조한 이

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

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

Table 4. Microorganisms and subculture medium used for prebiotic effect of isomaltooligosaccharides

Strain	Medium
<i>Lactobacillus acidophilus</i> KCTC 3140	MRS broth
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> KCTC 3636	MRS broth
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> KCTC 3635	MRS broth
<i>Lactobacillus reuteri</i> KCTC 3594	MRS broth
<i>Lactobacillus gasseri</i> KCTC 3181	MRS broth
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> KCTC 5033	MRS broth
<i>Escherichia coli</i> KCTC 1682	Tryptic soy broth
<i>Salmonella</i> spp.	RCM broth

소말토올리고당을 사용하였으며 대조군은 멸균증류수를 사용하였다. 이소말토올리고당과 glucose는 각각 40 brix로 농축한 후 멸균하여 준비하였다. Mueller-hinton broth(Oxoid, Basingstoke, UK) 50 mL에 이소말토올리고당, glucose, 멸균증류수를 각각 1 mL씩 첨가한 배지에 활성화된 균주 0.5%를 접종하여 37°C에서 배양하였다. 그리고 균주의 생육 정도를 알아보기 위해 0, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24 및 28시간 마다 배양액을 채취하였고, microplate reader로 660 nm에서 흡광도를 측정하여 생육곡선을 작성하였다.

9. 통계처리

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

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 쌀가루의 액화반응에 미치는 Termamyl 2X 효소 농도 및 반응 시간에 따른 효과

쌀가루에 Termamyl 2X를 기질 대비 0.025%, 0.05%, 0.075%, 0.1%씩 농도별로 첨가하고 1시간 및 2시간 동안 액화시킨 후 시료를 채취하여 환원당 함량을 측정하였다(Table 5, Fig. 1). 환원당의 함량은 농도가 높아질수록 증가하는 경향을 보였고, 1시간 액화했을 때보다 2시간 액화했을 때 환원당의 함량이 더 높았다. 효소의 농도를 높이는 것보다 시간을 1시간 더 길게 하는 것이 효율적이라고 판단되었다. 가장 높은 환원당 함량을 나타내는 조건은 Termamyl 2X를 기질대비 0.075%(v/w) 첨가하여 2시간 동안 반응할 때이며, 138.26 g/L의 함량을 나타내었다. 그리고 2시간 반응했을 때 효소의 농도가 0.075% 이상에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 다른 연구자는 액화 전분의 dextrose equivalent(DE)가 높으면, 전이반응에서 단위시간당 전환되는 이소말토올리고당의 수율이 증가한다고 보고하였다(Niu et al., 2017). 환원당 함량이 높을수록 전분의 가수분해가 많이 이루어졌다고 판단하였으므로, Termamyl 2X를 기질대비 0.075% 첨가하여 2시간 동안 반응하는 것을 액화의 최적 조건으로 설정하였다.

Table 5. Changes of reducing sugar contents in the liquefying slurry

Contents of reducing sugar (g/L)	Termamyl 2X concentration (%)			
	0.025	0.05	0.075	0.1
1hr	61.34±0.88 ^a	83.84±10.80 ^a	98.34±2.38 ^b	106.43±3.28 ^c
2hr	109.59±1.84 ^a	129.26±5.76 ^b	138.26±2.79 ^c	137.51±9.12 ^{bc}

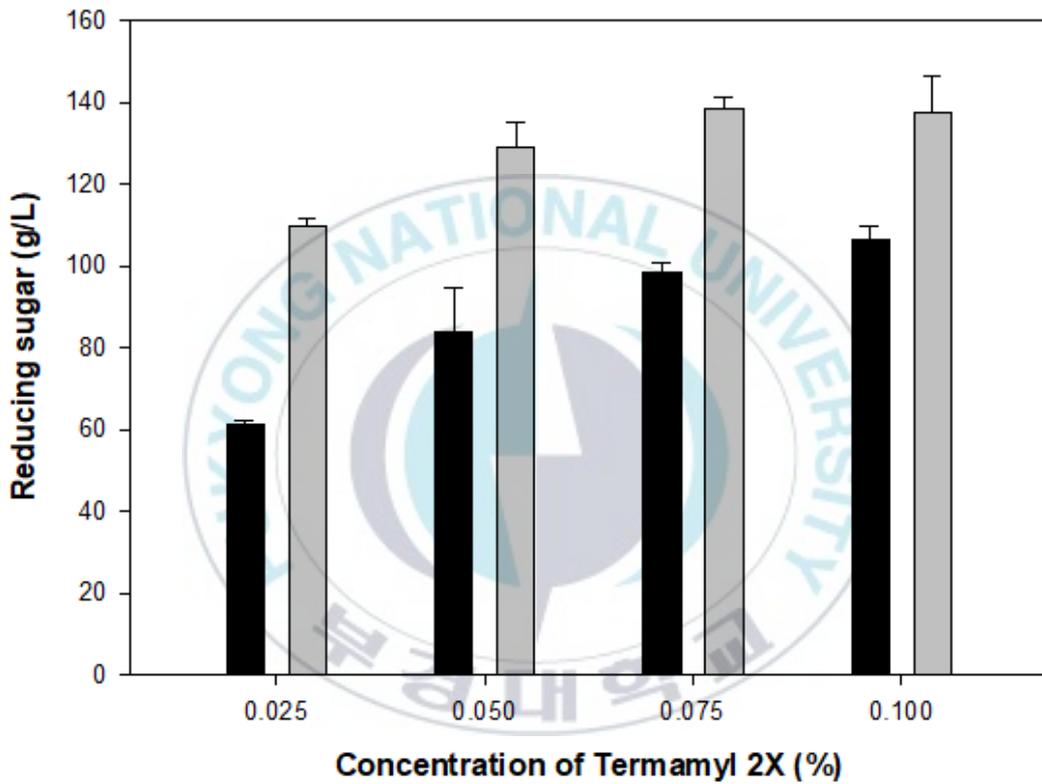


Fig. 1. Changes of reducing sugar contents in the liquefying slurry

■, 1hr; □, 2hrs

2. HPLC-CAD를 이용한 말토올리고당 및 이소말토올리고당의 동시분석

말토올리고당과 이소말토올리고당의 동시분석을 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. 2 에 나타내었다. 또한 동일한 분석조건으로 말토올리고당을 maltononaose 까지 분석한 크로마토그램을 Fig. 3에 나타내었다. 효소반응을 통한 이소말토올리고당의 제조 시에는 말토올리고당의 잔존이 발생하게 되며, HPLC에서 isocratic 조건으로 분석 시 말토올리고당 등의 당류와 이소말토올리고당의 분리가 용이하지 않아 정확한 이소말토올리고당의 함량을 계산하는 것에 어려움이 있다. 그래서 이동상을 gradient 조건으로 흘려주어 피크의 분리능을 높여 분석이 효율적이게 하였다. HPLC-ELSD를 이용하여 말토올리고당과 이소말토올리고당을 동시분석한 크로마토그램을 확인하였을 때, 당류의 검출 순서가 본 실험의 결과와 일치하였다(Ko et al., 2013). 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(Inagaki et al., 2007). 그러나 CAD를 이용하여 말토올리고당과 이소말토올리고당을 동시분석한 연구 자료는 없었다. 이에 본 연구에서는 말토올리고당과 이소말토올리고당의 동시 분석 조건을 설정하여 새로운 분석법 개발의 가능성을 제시하였다.

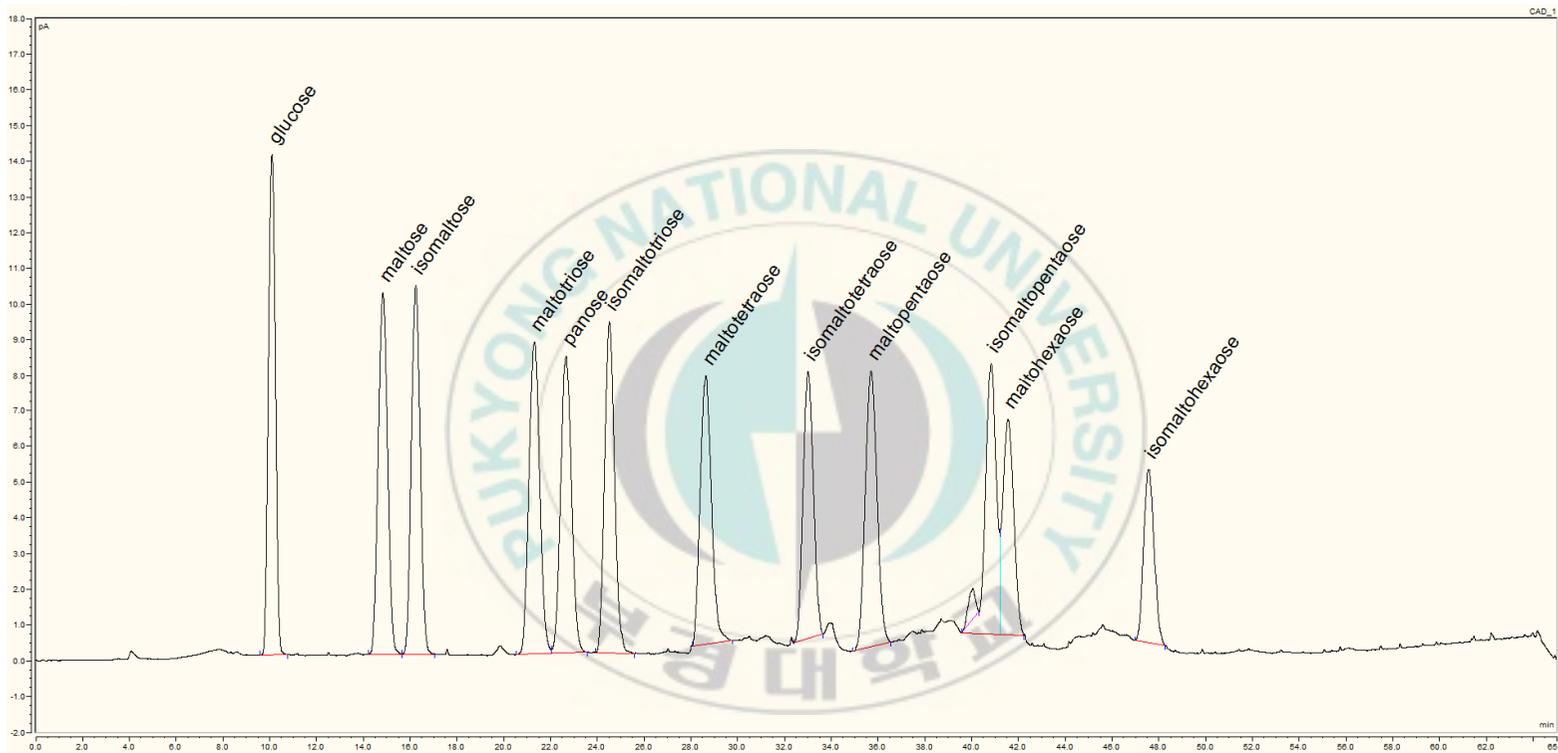


Fig. 2. HPLC chromatogram of 800 ppm concentrations of standard compounds of maltooligosaccharides and isomaltooligosaccharides

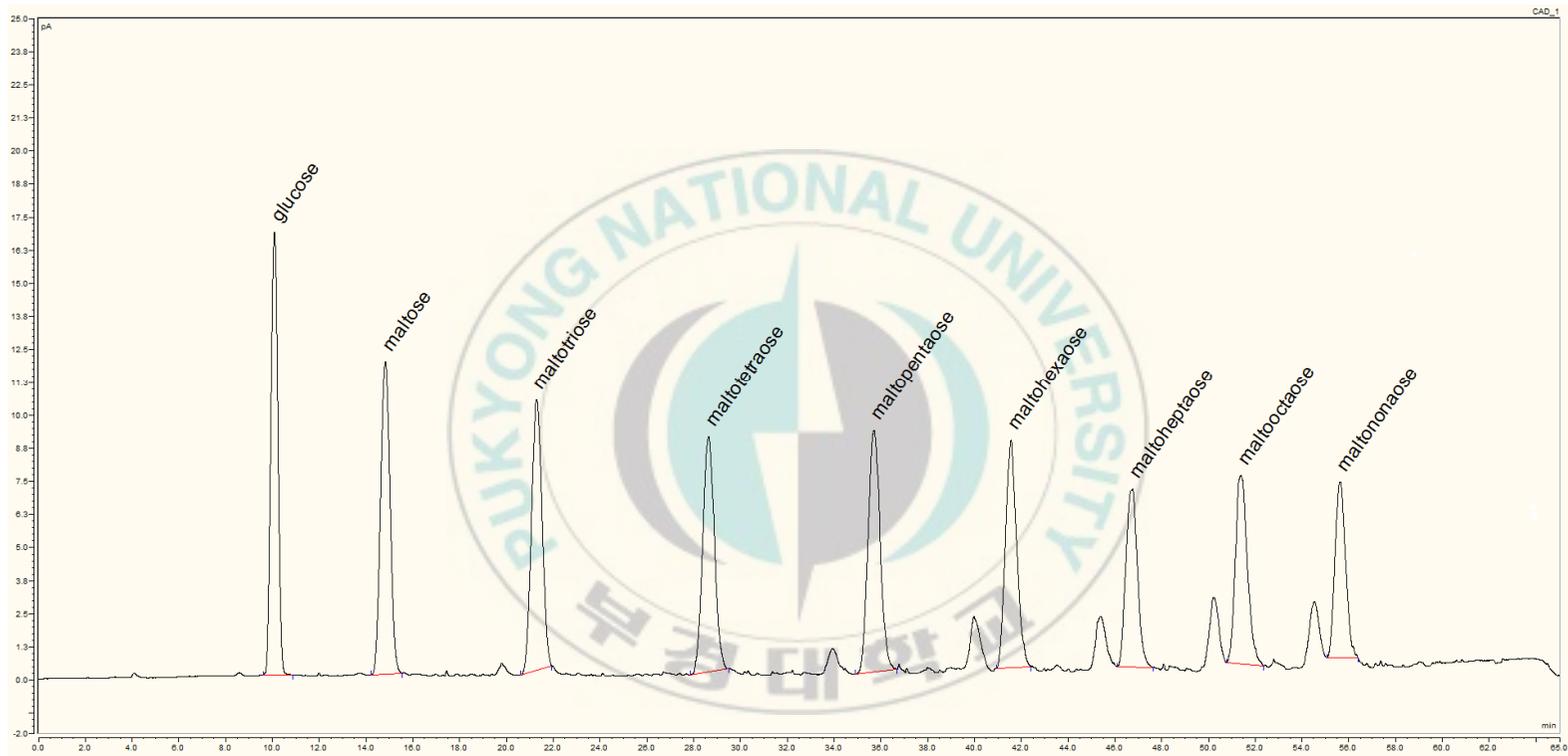


Fig. 3. HPLC chromatogram of 1000 ppm concentrations of standard compounds of maltooligosaccharides

3. 말토올리고당의 제조를 위한 당화효소의 효과

효소 종류에 따른 말토올리고당 생성 경향을 알아보기 위해 3가지 실험군 (T, MP, F)으로 나누어 실험을 진행하였다. 0, 12 및 24시간에 당화액을 채취하여 말토올리고당의 함량을 분석하였고, 총 말토올리고당의 함량은 식품공전의 규격에 따라 포도당 분자가 3개 이상 연결된 maltotriose부터 합산하였다. 분석 결과는 Table 6, Table 7 및 Table 8과 같았다. 액화액을 온도만 낮춰서 당화한 경우(T), 다른 효소 당화액에 비해 상대적으로 중합도가 높은 말토올리고당의 함량이 높게 분석되었다. 특히 maltopentaose의 함량이 가장 높았고 24시간까지 서서히 증가하여 32.19 g/L까지 생산되었다. 그리고 총 말토올리고당의 함량은 0시간일 때 108.31 g/L로 가장 높게 나타났다. Maltogenase L과 Promozyme D2를 함께 반응시킨 경우(MP), β -amylase인 Maltogenase L의 영향으로 maltose의 함량이 가장 높았다. 24시간에 maltose가 73.80 g/L까지 생성되면서 다른 실험군(T, F)과 비교하여 가장 높았다. 그리고 긴 체인을 끊어주면서 반응하였기 때문에, 총 말토올리고당의 함량은 시간이 지날수록 감소하였다. Fungamyl 800L로 반응시킨 경우(F)도 MP와 비슷한 생산 경향을 보였다. Fungamyl 800L은 maltose를 주로 생산하는 α -amylase이기 때문에 maltose의 함량이 가장 높게 나왔고 24시간에 67.72 g/L이 생산되었다. 하지만 MP보다 maltose의 함량이 더 낮았는데 이는 Promozyme D2가 α -1,6 결합을 끊어주어 maltose를 생산할 수 있는 기질을 더 많이 제공했기 때문이라고 사료되었다(Gaouar et al., 1998). 그리고 MP와 다르게 F의 반응에서는 maltotetraose가 빠르게 분해되어 12시간부터는 아주 소량만이 존재하는 것을 확인할 수 있었다. 액화된 banana flour slurry에 barley β -amylase를 첨가했을 때와는 달리 Fungamyl 800L을 첨가하여 당화하는 동안에는 maltotetraose가 생성되지 않았다는 연구는

Table 6. Contents of maltooligosaccharides of liquefying slurry without saccharification enzyme

Sugar contents (g/L)	Reaction time (hr)		
	0	12	24
Glucose	10.79±0.45 ^a	12.72±0.48 ^b	13.38±0.54 ^b
Maltose	28.71±1.51 ^a	28.39±1.37 ^a	28.61±1.92 ^a
Maltotriose	28.07±0.72 ^a	27.79±0.86 ^a	28.32±0.98 ^a
Maltotetraose	17.54±0.26 ^a	16.80±0.44 ^{ab}	16.66±0.52 ^b
Maltopentaose	25.79±0.88 ^a	30.10±0.74 ^b	32.19±1.10 ^c
Maltohexaose	17.68±0.67 ^a	5.97±0.30 ^b	3.40±0.40 ^c
Maltoheptaose	5.49±0.46 ^a	5.27±0.46 ^a	4.84±0.31 ^a
Maltooctaose	6.61±0.71 ^a	6.08±0.37 ^a	6.32±0.65 ^a
Maltononaose	7.12±0.35 ^a	7.21±0.47 ^a	6.71±0.23 ^a
Total maltooligosaccharides	108.31±0.89 ^a	99.22±1.05 ^b	98.45±0.85 ^b

Table 7. Contents of maltooligosaccharides in saccharifying slurry using 0.1% Maltogenase L and 0.1% Promozyme D2

Sugar contents (g/L)	Reaction time (hr)		
	0	12	24
Glucose	12.38±1.14 ^a	22.55±0.96 ^b	25.59±1.25 ^c
Maltose	34.64±0.61 ^a	66.29±1.04 ^b	73.80±1.08 ^c
Maltotriose	30.24±0.52 ^a	22.17±0.57 ^b	13.93±0.24 ^c
Maltotetraose	19.35±0.16 ^a	9.29±1.24 ^b	4.14±1.58 ^c
Maltopentaose	18.03±0.65 ^a	9.03±0.58 ^b	7.97±0.69 ^b
Maltohexaose	14.59±0.54 ^a	1.99±1.02 ^b	0.00 ^c
Maltoheptaose	6.40±0.69 ^a	1.26±0.51 ^b	0.00 ^c
Maltooctaose	5.94±0.60 ^a	0.46±0.60 ^b	0.11±0.10 ^b
Maltononaose	6.75±0.81 ^a	1.14±0.38 ^b	0.39±0.08 ^b
Total maltooligosaccharides	101.31±2.93 ^a	45.36±2.64 ^b	26.53±2.58 ^c

Table 8. Contents of maltooligosaccharides in saccharifying slurry using 0.1% Fungamyl 800L

Sugar contents (g/L)	Reaction time (hr)		
	0	12	24
Glucose	12.88±2.22 ^a	19.33±0.07 ^b	21.74±1.03 ^b
Maltose	34.17±1.12 ^a	65.60±1.79 ^b	67.72±1.73 ^b
Maltotriose	36.95±1.09 ^a	22.03±0.78 ^b	16.02±0.52 ^c
Maltotetraose	21.64±1.53 ^a	0.29±0.22 ^b	0.00 ^b
Maltopentaose	16.38±1.08 ^a	8.54±0.93 ^b	7.56±0.44 ^b
Maltohexaose	12.69±0.90 ^a	1.54±0.59 ^b	0.66±0.28 ^b
Maltoheptaose	5.41±0.41 ^a	0.47±0.28 ^b	0.09±0.10 ^b
Maltooctaose	4.98±0.09 ^a	0.06±0.06 ^b	0.06±0.06 ^b
Maltononaose	5.53±0.19 ^a	0.27±0.13 ^b	0.34±0.06 ^b
Total maltooligosaccharides	103.58±4.91 ^a	32.54±2.16 ^b	23.92±1.16 ^c

본 연구 결과와 유사하였다(Chockchaisawasdee et al., 2013). 총 말토올리고당의 함량은 T에서 가장 높게 나타났고, 그 중 당화반응을 하지 않은 0시간에서 가장 높았다. 따라서 액화 반응만으로 기능성 말토올리고당의 제조가 가능하다고 판단되었으므로, 말토올리고당의 효소반응 조건은 액화 조건과 동일하게 설정하였다.

4. 이소말토올리고당의 제조를 위한 당화효소와 전이효소의 동시반응 효과

이소말토올리고당(IMO)을 제조하기 위한 최적 당화효소를 선정하기 위하여 서로 다른 당화효소를 사용하여 당화·전이반응을 진행하였다(T+TG, MP+TG, F+TG). 효소 첨가 후 0, 12 및 24시간에 당화액을 채취하여 말토올리고당 및 이소말토올리고당의 함량을 분석하였고, 그 결과는 Table 9, Table 10, Table 11과 같았다. 실험 결과에 나타난 총 당 함량에는 당 전이반응으로 생성되는 중간 산물이나 nigerose, kojibiose, isopanose는 포함되지 않았기 때문에 실제 총 당 함량과 일치하지는 않았다.

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(Ahn et al., 1996). 그리고 총 IMO 함량 중에 isomaltotriose, isomaltotetraose의 비율이 다른 실험군에 비해 높다는 것을 확인할 수 있었다.

24시간 동안 당화·전이 반응을 했을 때 MP+TG에서 총 IMO의 함량이 가

Table 9. Contents of oligosaccharides in liquefied slurry adding 0.1% Transglucosidase L for the process of transglucosylation without saccharification(T+TG)

Sugar contents (g/L)	Reaction time (hr)		
	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 10. 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 (hr)		
	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

Table 11. 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 (hr)		
	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

장 높았으며 그 함량은 75.02 g/L으로 측정되었다. 특히 isomaltose와 panose가 가장 많았고, isomaltose는 24시간일 때 34.70 g/L이고, panose는 12시간일 때 35.47 g/L로 가장 많이 측정되었다. Maltogenase L과 Promozyme D2를 사용하였을 때의 특징은 maltose가 많이 생산되는 것인데, 이를 통해 maltose가 isomaltose와 panose의 생산과 관련이 있다고 판단하였다. Transglucosidase L의 특성을 조사한 연구에 의하면 Transglucosidase L은 기질이 maltose일 때 주요 생산물로서 panose, glucose, isomaltose를 생성한다고 보고하였다(Ahn et al., 1996). 또한 F+TG에서도 isomaltose와 panose의 생성속도가 MP+TG보다 느린 것으로 판단되었다. 따라서 IMO 제조를 위한 최적 효소는 Maltogenase L, Promozyme D2, Transglucosidase L의 조합으로 선정되었다.

5. 이소말토올리고당 제조를 위한 당화효소와 전이효소의 농도에 따른 동시반응 효과

이소말토올리고당(IMO) 제조를 위한 최적 효소농도를 설정하기 위해 각 효소의 농도를 다르게 하여 반응시킨 후 1, 4.5, 9, 18 및 38시간에 당 함량을 분석하였고, 그 결과는 Table 12, Table 13, Table 14, Table 15, Table 16과 같았다. Transglucosidase L를 농도별로 반응한 결과를 보면 glucose는 주로 Transglucosidase L의 반응에 의해 생성되는 것을 볼 수 있고, Maltogenase L의 농도도 glucose의 생성에 기여하는 것으로 판단되는데, 이는 말토올리고당에서 maltose 단위로 분해하면서 남은 glucose와, 생산된 maltose에 Transglucosidase L가 작용하면서 생긴 glucose에 의한 것으로 사료된다.

Table 12. Contents of oligosaccharides in the process for simultaneous saccharification and transglucosylation at different enzyme concentration for 1hr

Sugar contents (g/L)	1hr						
	M 0.0015 ²⁾	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
m2 ¹⁾	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
m3	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
m4	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
m5	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
m6	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
m7	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 ^c
m8	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
m9	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
imo2	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
imo3	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
imo4	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a
imo5	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⁾ m#, maltooligosaccharide, degree of polymerization ; imo#, isomaltooligosaccharide degree of polymerization

²⁾ Refer to Table 2.

Table 13. Contents of oligosaccharides in the process for simultaneous saccharification and transglucosylation at different enzyme concentration for 4.5hrs

Sugar contents (g/L)	4.5hrs						
	M 0.0015 ²⁾	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
m2 ¹⁾	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
m3	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
m4	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
m5	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
m6	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
m7	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 ^c
m8	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}
m9	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
imo2	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
imo3	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
imo4	0.04 ±0.00 ^a	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b
imo5	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⁾ m#, maltooligosaccharide, degree of polymerization ; imo#, isomaltooligosaccharide degree of polymerization

²⁾ Refer to Table 2.

Table 14. Contents of oligosaccharides in the process for simultaneous saccharification and transglucosylation at different enzyme concentration for 9hrs

Sugar contents (g/L)	9hrs						
	M 0.0015 ²⁾	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
m2 ¹⁾	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
m3	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
m4	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
m5	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
m6	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
m7	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
m8	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
m9	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
imo2	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 ^c
imo3	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}
imo4	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
imo5	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⁾ m#, maltooligosaccharide, degree of polymerization ; imo#, isomaltooligosaccharide degree of polymerization

²⁾ Refer to Table 2.

Table 15. Contents of oligosaccharides in the processs for simultaneous saccharification and transglucosylation at different enzyme concentration for 18hrs

Sugar contents (g/L)	18hrs						
	M 0.0015 ²⁾	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
m2 ¹⁾	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
m3	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
m4	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
m5	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
m6	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
m7	0.62 ±0.04 ^a	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b
m8	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a
m9	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a
imo2	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
imo3	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
imo4	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
imo5	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⁾ m#, maltooligosaccharide, degree of polymerization ; imo#, isomaltooligosaccharide degree of polymerization

²⁾ Refer to Table 2.

Table 16. Contents of oligosaccharides in the process for simultaneous saccharification and transglucosylation at different enzyme concentration for 36hrs

Sugar contents (g/L)	36hrs						
	M 0.0015 ²⁾	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
m2 ¹⁾	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
m3	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
m4	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
m5	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
m6	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a
m7	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a
m8	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a
m9	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a
imo2	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
imo3	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
imo4	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
imo5	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⁾ m#, maltooligosaccharide, degree of polymerization ; imo#, isomaltooligosaccharide degree of polymerization

²⁾ Refer to Table 2.

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 (Ahn et al., 1996). 따라서 사슬이 짧은 것부터 순차적으로 생성되기 때문에 사슬이 긴 물질일수록 생성되기까지 반응시간이 오래 걸려서 함량도 더 적은 것으로 사료되었다. 반면, Plongbunjong 등(2017)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. 효소 반응 초반에는 panose가 생산물질이지만 9시간에 최고 함량을 도달한 이후부터는 반응물질로 작용하여 isomaltose나 isomaltotriose로 전환이 일어난 것으로 판단되었다(Ahn et al., 1996). 그래서 반응초반에는 Maltogenase L의 농도가 높을수록 panose가 많이 만들어져서 총 IMO의 함량도 높았지만 시간이 충분히 지나면 panose의 감소로 총 IMO 함량이 비슷해졌다.

Transglucosidase L는 시간 의존적일 뿐만 아니라 농도 의존적이었다. Transglucosidase L의 농도가 높을수록 반응 속도가 빨라지면서 같은 시간 동안에 훨씬 더 많은 IMO가 생산되었다. 팽화미분으로 당화·전이반응을 동시에 진행하여 이소말토올리고당을 제조한 연구에서는 Transglucosidase L을 본 연구의 5배인 0.5%를 첨가하여 1시간만에 총 이소말토올리고당을 56.40 g/L 생산하였다고 보고하였다(Lee et al., 2018). 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 et al.(2017)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 이소말토올리고당 함량이 각각 64.39 g/L, 68.88 g/L, 73.23 g/L 으로, 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 9의 0시간이나 Table 12의 1시간 반응결과에서 알 수 있듯이, 가장 빨리 생산되는 이소말토올리고당은 panose였다. 이것은 Transglucosidase L이 maltose를 acceptor로 하여 panose를 우선적으로 생산하려는 경향이 있는 것으로 보여졌다. 따라서 Table 12 ~ Table 14에서와 같이 Maltogenase L의 농도가 높을수록 panose의 함량도 높아지는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 Maltogenase L의 농도가 낮으면 maltose의 생산이 줄어들기 때문에 panose의 생산은 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 12 ~ Table 16에서 볼 수 있듯이 isomaltotriose, isomaltotetraose, isomaltopentaose는 Maltogenase L의 농도가 낮았던 실험군인 M 0.0015에서 더 빠르게 생산되었다. Ahn et al.(1996)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 중합

도가 높은 IMO를 생산하고자하면 Maltogenase L의 농도는 낮아도 된다고 사료되었다. 그러나 Maltogenase L를 아예 사용하지 않으면 isomaltose와 panose의 생성 속도가 느려지기 때문에(Table 9, Table 10) Maltogenase L의 농도는 0.0015%로 설정하였다. Maltogenase L의 농도를 감소시킴으로써, glucose의 함량을 줄일 뿐 아니라 효소 비용도 절감시킬 수 있었다.

6. 이소말토올리고당 제조를 위한 당화효소와 전이효소의 동시반응 시 반응시간에 따른 당 조성 변화

쌀 액화액에 0.0015% Maltogenase L, 0.075% Promozyme D2, 0.1% Transglucosidase L을 첨가하여 72시간동안 반응시켰고, 6시간마다 당화액을 채취하여 IMO의 함량을 분석한 결과는 Table 17과 같았다. 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 Table 18과 같았다. 총당 중 IMO의 비율은 약 56.37%였다. 다른 연구자들은 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 포함시켰

Table 17. Changes in isomaltooligosaccharides contents by enzyme reaction time¹⁾

Reaction time (hr)	Sugar contents (g/L)					
	Isomaltose	Panose	Isomaltotriose	Isomaltotetraose	Isomaltopentaose	Total IMO
0	0.06 ±0.01 ^a	1.22 ±0.01 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	1.28 ±0.01 ^a
6	16.52 ±0.36 ^b	27.95 ±0.07 ^b	4.38 ±0.01 ^b	0.16 ±0.02 ^a	0.00 ^a	49.00 ±0.47 ^b
12	24.90 ±0.54 ^c	26.34 ±1.17 ^c	10.68 ±0.18 ^c	1.74 ±0.09 ^b	0.00 ^a	63.66 ±1.97 ^c
18	29.26 ±0.67 ^d	21.28 ±0.72 ^d	15.07 ±0.40 ^d	3.72 ±0.35 ^c	0.00 ^a	69.33 ±2.14 ^d
24	32.21 ±0.18 ^e	17.11 ±0.16 ^e	17.63 ±0.24 ^e	5.51 ±0.15 ^d	0.57 ±0.01 ^b	73.02 ±0.73 ^{e fg}
30	33.01 ±0.10 ^f	13.55 ±0.17 ^f	18.70 ±0.21 ^{fg}	6.41 ±0.07 ^e	0.80 ±0.02 ^c	72.47 ±0.39 ^{fg}
36	35.11 ±0.05 ^{gh}	11.79 ±0.10 ^g	19.95 ±0.07 ^h	7.46 ±0.04 ^f	1.05 ±0.03 ^d	75.36 ±0.13 ^h
42	35.46 ±0.09 ^{gh}	10.05 ±0.18 ^h	19.88 ±0.14 ^h	8.16 ±0.11 ^g	1.18 ±0.02 ^e	74.75 ±0.10 ^{eh}
48	35.63 ±0.04 ^g	8.99 ±0.08 ⁱ	19.76 ±0.20 ^h	8.44 ±0.04 ^h	1.28 ±0.02 ^f	74.10 ±0.18 ^{efh}
54	35.28 ±0.44 ^{gh}	8.10 ±0.04 ^j	19.04 ±0.35 ^f	8.37 ±0.08 ^{gh}	1.38 ±0.02 ^g	72.18 ±0.92 ^g
60	34.93 ±0.83 ^{gh}	7.20 ±0.16 ^k	18.33 ±0.50 ^{gi}	8.31 ±0.11 ^{gh}	1.49 ±0.06 ^h	70.25 ±1.65 ^d
66	34.85 ±0.64 ^h	6.51 ±0.40 ^{kl}	18.22 ±0.27 ^{ij}	8.50 ±0.23 ^h	1.64 ±0.03 ^{ij}	69.72 ±1.58 ^d
72	34.89 ±0.17 ^h	6.42 ±0.21 ^l	17.79 ±0.43 ^{ej}	8.49 ±0.24 ^h	1.57 ±0.03 ^j	69.16 ±1.06 ^d

¹⁾ 0.0015% Maltogenase L, 0.075% Promozyme D2 and 0.1% Transglucosidase L were added for production of isomaltooligosaccharides.

Table 18. 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 hours

	Sugar contents (g/L)	Sugar composition (%)
Glucose	43.56±0.25	32.58
Maltose	11.26±0.21	8.42
Maltotriose	0.82±0.02	0.61
Maltotetraose	1.70±0.11	1.27
Maltopentaose	0.99±0.03	0.74
Maltohexaose	0.00	0.00
Isomaltose	35.11±0.05	26.26
Panose	11.79±0.10	8.82
Isomaltotriose	19.95±0.07	14.92
Isomaltotetraose	7.46±0.04	5.58
Isomaltopentaose	1.05±0.03	0.79
Total IMO ¹⁾	75.36±0.13	56.37
Total sugar	133.69±0.44	100.00

¹⁾ IMO, isomaltooligosaccharides

다(Basu et al., 2016; Chockchaisawasdee et al., 2013; Lee et al., 2002). 본 연구에서도 그러한 당들을 포함시킨다면 이소말토올리고당의 조성(%)이 더 높게 측정될 것이라 판단되었다.

7. 제조된 말토올리고당과 이소말토올리고당의 이화학적 특성

제조된 말토올리고당 당액과 이소말토올리고당 당액은 17~18 brix 였고, 여과 및 감압농축하여 시럽의 형태로 제조하였다. 그리고 제조된 올리고당들의 이화학적 특성을 분석한 결과는 Table 19와 같았다. 말토올리고당 당액은 72.45 brix까지 농축시켰고, 이소말토올리고당 당액은 75.00 brix까지 농축시켰다. pH는 말토올리고당과 이소말토올리고당이 각 6.81과 6.74로 거의 비슷하게 나타났다. 색도는 이소말토올리고당이 L값이 더 높게 나왔는데, 육안으로 관찰하였을 때 이소말토올리고당이 더 맑고 투명한 것을 확인할 수 있었다. 이는 말토올리고당은 중합도가 높은 당류가 많이 첨가되어 있기 때문에 더 탁해져서 L값이 비교적 낮게 측정된 것으로 사료되었다. a값은 양수일 때 빨강색, 음수일 때 초록색에 가깝다. 말토올리고당은 a값이 -0.29이고, 이소말토올리고당은 -1.75로 둘 다 음수의 결과를 나타내었다. b값은 양수일 때 노란색, 음수일 때 파란색에 가까운데 말토올리고당과 이소말토올리고당은 둘 다 양수의 값을 나타냈으며, 말토올리고당이 더 높은 황색도를 나타내었다.

Table 19. Brix, pH and color value of syrup

	$^{\circ}$ Brix	pH	Color value
MO ¹⁾ syrup	72.45±0.05 ^a	6.81±0.03 ^a	L : 52.93±0.24 ^a a : -0.29±0.00 ^a b : +10.82±0.09 ^a
IMO ¹⁾ syrup	75.00±0.20 ^b	6.74±0.04 ^a	L : 57.08±0.04 ^b a : -1.75±0.00 ^b b : +8.89±0.00 ^b

¹⁾ MO, maltooligosaccharides; IMO, isomaltooligosaccharides

8. 제조된 이소말토올리고당이 장내 미생물의 생육에 미치는 효과

이소말토올리고당(IMO)이 장내 유익균인 *Lactobacillus acidophilus* KCTC 3140, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* KCTC 3636, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* KCTC 3635, *Lactobacillus reuteri* KCTC 3594, *Lactobacillus gasseri* KCTC 3181, *Lactobacillus rhamnosus* KCTC 5033과 대장균인 *Escherichia coli* KCTC 1682와 장내 유해균인 *Salmonella* spp.의 생육에 미치는 효과를 알아보기 위해 glucose의 경우와 비교하여 조사하였다. 유산균들은 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*를 제외하고는 건강기능식품 공전에서 프로바이오틱스(고시형 원료)로 인정한 균주를 선정하였다. *Lactobacillus acidophilus* KCTC 3140의 경우 glucose는 거의 이용하지 않고 IMO를 탄소원으로 사용하여 증식하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4). *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* KCTC 3636의 경우는 glucose를 이용하여 증식할 수 있지만 IMO가 탄소원일 때 증식이 더 촉진되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4). *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* KCTC 3635는 glucose를 먼저 소비하는 것으로 보이며, 증식이 느리게 일어나 12시간부터 급격하게 증가하였다. 또한 glucose 이용능력 만큼 IMO도 탄소원으로 이용할 수 있음을 확인하였다(Fig. 5). *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* KCTC 3635는 glucose-6-phosphate가 생성되도록 해주는 maltose phosphorylase와 β -phosphoglucomutase가 없어서 ATP를 먼저 소비해야하기 때문에 에너지적으로 유리하지 않아 다른 균주보다 증식이 느리게 일어난 것으로 사료되었다(Gänzle et al., 2012). *Lactobacillus reuteri* KCTC 3594는 IMO를 먼저 이용하는 것을 확인할 수 있었고 12시간부터 glucose를 이용하는 것으로 보아 *Lactobacillus reuteri*

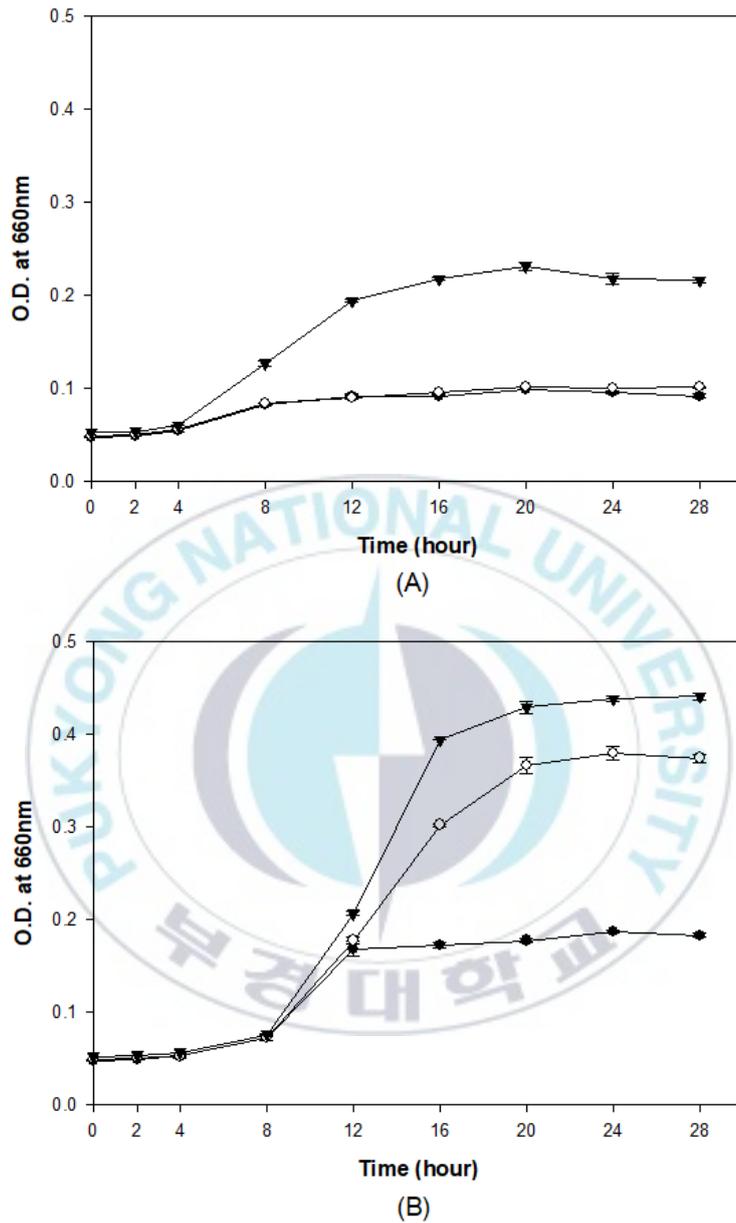
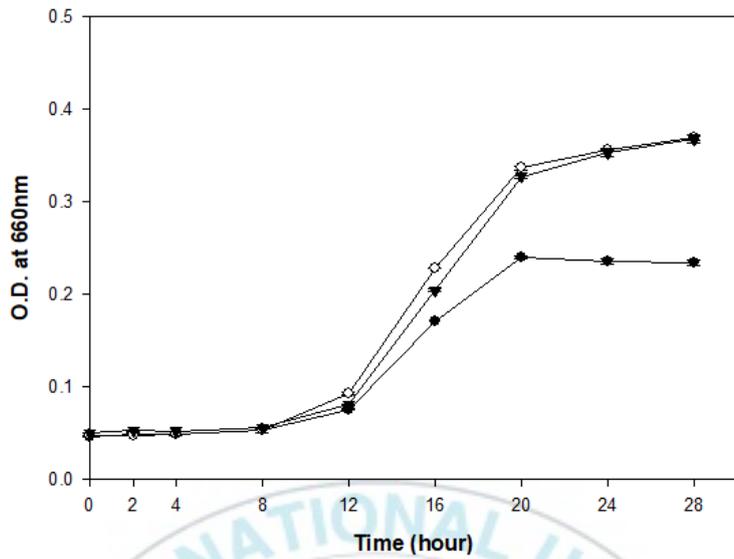
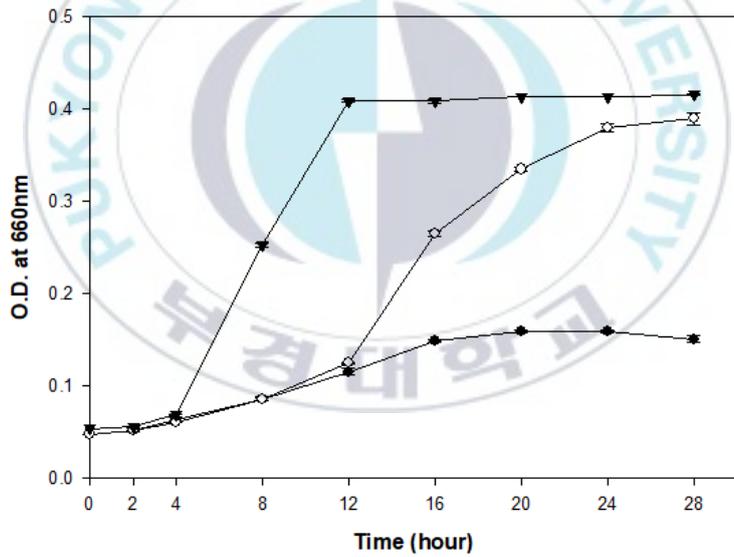


Fig. 4. Growth curves of *Lactobacillus acidophilus* KCTC 3140 (A) and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* KCTC 3636 (B) in medium containing isomaltooligosaccharides or glucose as a carbon source. ▲, isomaltooligo- saccharides; ○, glucose; ●, none.



(A)



(B)

Fig. 5. Growth curves of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* KCTC 3635 (A) and *Lactobacillus reuteri* KCTC 3594 (B) in medium containing isomaltooligosaccharides or glucose as a carbon source. ▼, isomaltooligo- saccharides; ○, glucose; ●, none.

KCTC 3594는 IMO를 탄소원으로 더 선호하는 것으로 사료되었다(Fig. 5). *Lactobacillus gasseri* KCTC 3181는 탄소원으로 glucose를 이용하지 않고 IMO을 이용하여 증식하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 6). 그리고 *Lactobacillus rhamnosus* KCTC 5033는 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* KCTC 3635와 유사하게 glucose와 IMO가 거의 동일한 생육양상을 나타내어 IMO도 탄소원으로서 우수함을 보여주었다(Fig. 6). 따라서 6개의 모든 장내 유익균이 IMO을 잘 이용하는 것으로 보이며, IMO에 의한 증식 효과가 우수한 것으로 나타났다. Gänzle et al.(2012)는 거의 모든 *Lactobacilli*는 α -1,6 glucosidic linkage를 가수분해할 수 있으며, 균주가 가지고 있는 효소에 따라 대사 경로는 다르다고 보고하였다. 따라서 균주의 종류에 따라 IMO의 이용률은 달라질 수 있다고 판단되었으며, 특히 *Lactobacillus acidophilus* KCTC 3140, *Lactobacillus reuteri* KCTC 3594가 glucose나 대조군과 비교하여 IMO를 더 잘 이용하는 것으로 사료되었다. IMO는 열과 산에 강하며(Kim et al., 1995) 소화효소에 의해 잘 분해되지 않고 대장까지 도달할 가능성이 높았다. Saminathan et al.(2011)은 10가지 종류의 올리고당류를 사용해 *Lactobacillus* 균주들의 상대적 성장률을 조사한 결과 IMO가 모든 균주에게 두루 잘 이용되었다고 보고하였다. 결과적으로 IMO은 프리바이오틱스로서 기능성 효과가 있는 것으로 보였고, 위의 장내 유익균들과 함께 신바이오틱스 제품으로의 개발 가능성이 있다고 판단되었다.

한편 *Escherichia coli* KCTC 1682와 *Salmonella* spp.의 경우(Fig. 7), 초반에 glucose를 소비하면서 대조군보다 조금 더 높은 성장률을 보이다가 8시간 이후부터는 오히려 대조군에서 증식이 더 활발히 일어났고, IMO가 있는 배지에서는 증식이 더 이상 일어나지 않았다. 다른 연구자는 이눌린을 첨가한 배지에서 *Staphylococcus aureus*와 *Clostridium perfringens*의 성장률을 조사

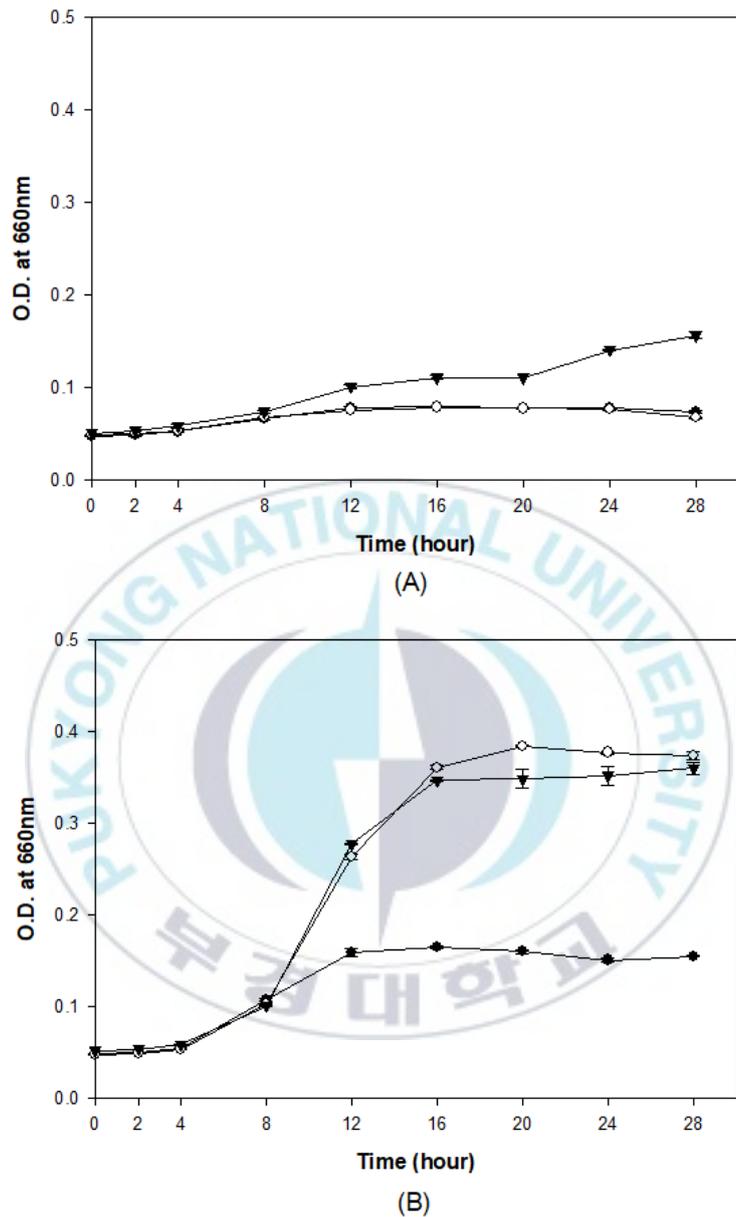


Fig. 6. Growth curves of *Lactobacillus gasseri* KCTC 3181 (A) and *Lactobacillus rhamnosus* KCTC 5033 (B) in medium containing isomaltooligosaccharides or glucose as a carbon source. —▼, isomaltooligosaccharides; —○, glucose; —●, none.

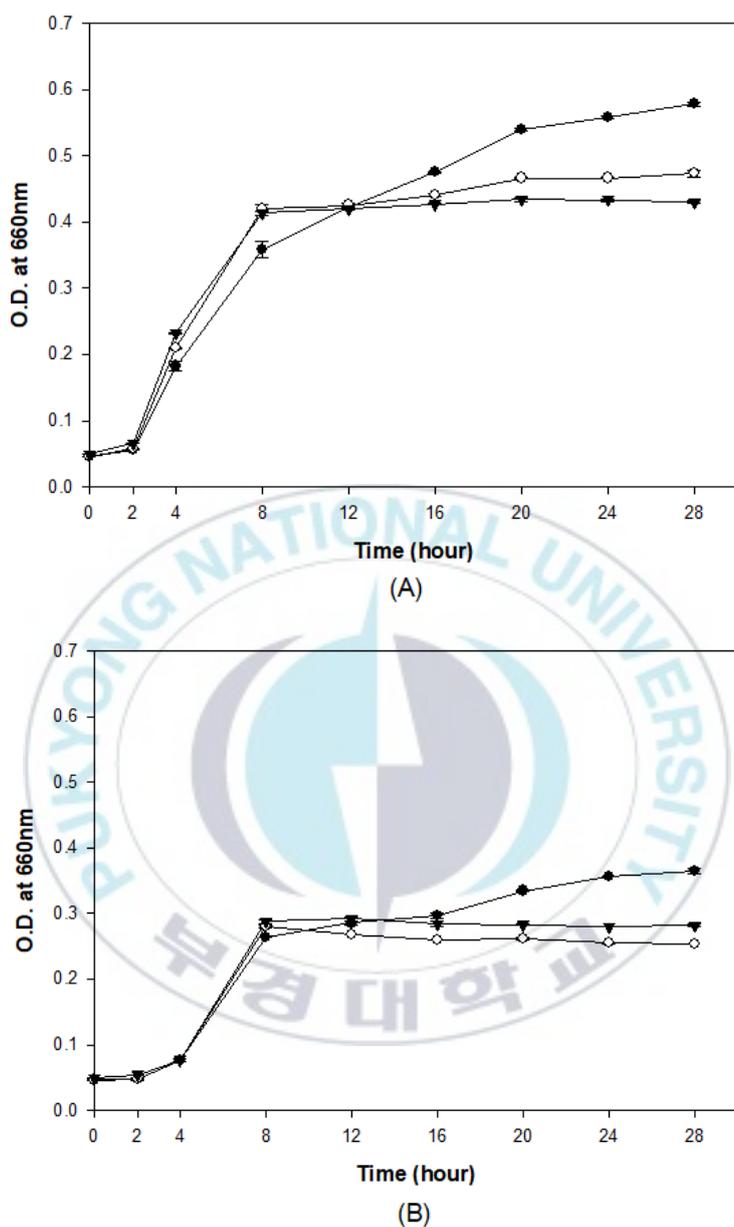


Fig. 7. Growth curves of *Escherichia coli* KCTC 1682 and *Salmonella* spp. in medium containing isomaltoligosaccharides or glucose as a carbon source. ▼, isomalto- oligosaccharides; ○, glucose; ●, none.

하였을 때, 생육 곡선이 대조군(이눌린 무첨가)과 유의한 차이가 없으면 미생물이 생육을 위한 영양원으로 이눌린을 이용하지 못하는 것으로 판단하였다 (Park, 2008). *Escherichia coli* KCTC 1682와 *Salmonella* spp.는 생육을 위한 영양원으로서 IMO를 이용하지 못하는 것으로 보이며, IMO가 유해균의 증식을 억제하는 효과가 있는 것으로 판단되었다.



IV. 요약

쌀 소비 촉진과 쌀가공품의 다양화를 위해 쌀을 이용한 올리고당 제조에 대해 연구하였다. 쌀가루를 이용하여 말토올리고당과 이소말토올리고당의 제조방법을 확립하기 위해서 효소는 상업적 효소인 Termamyl 2X, Maltogenase L, Promozyme D2, Fungamyl 800L, Trnasglucosidase L을 사용하였고, 당류는 HPLC-CAD를 이용하여 말토올리고당과 이소말토올리고당을 동시분석하였고, 제조 조건별 당의 구성 및 함량을 확인하였다.

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

말토올리고당 제조를 위해 서로 다른 당화효소를 첨가하여 당화시킨 후 총 말토올리고당 함량을 비교하였다. 그 결과 당화효소를 따로 첨가하지 않았을 때 총 말토올리고당의 함량이 108.31 g/L로 가장 높았다. 따라서 액화반응만으로 말토올리고당 제조가 가능하다고 판단하였다.

이소말토올리고당 제조의 최적화를 위해 효소선정, 최적 효소농도, 최적 효소반응시간에 대한 실험을 진행하였다. 효소선정 실험 결과, 같은 시간동안 총 이소말토올리고당을 가장 많이 생산한 Maltogenase L, Promozyme D2, Transglucosidase L이 최적 효소 조합으로 선정되었다. 최적 효소농도는, Maltogenase 0.0015%, Promozyme 0.05~0.1%, Transglucosidase 0.1%를 첨가하였을 때, glucose의 함량은 감소되고 중합도가 높은 이소말토올리고당의 함량은 증가하는 효과가 있었다. 최적 효소반응시간 결정을 위해 6시간마다

생성물의 변화를 관찰하였다. 그 결과, 36시간에 총 이소말토올리고당이 75.36 g/L로 가장 높았다. 최적 조건으로 제조된 이소말토올리고당은 18 brix 였고, 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.

제조한 이소말토올리고당의 프리바이오틱 효과를 확인하기 위해 mueller-hinton broth 배지에 이소말토올리고당을 첨가하여 장내 유익균인 *Lactobacillus acidophilus* KCTC 3140, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* KCTC 3636, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* KCTC 3635, *Lactobacillus reuteri* KCTC 3594, *Lactobacillus gasseri* KCTC 3181, *Lactobacillus rhamnosus* KCTC 5033과 대장균인 *Escherichia coli* KCTC 1682와 장내 유해균인 *Salmonella* spp.의 생육 활성을 측정하였다. 유산균들은 대조군과 큰 차이를 나타내면서 이소말토올리고당을 이용하여 증식하는 것을 확인하였으나, 장내 유해균은 증식이 억제되었다.

V. 참고문헌

통계청. (2018). 2017년 양곡소비량조사 결과 - 가구 · 사업체 부문.

Ahn J. W., Hong S. S., Park K. W. and Seo J. H. (1996). Reaction mode of transglucosidase from *Aspergillus niger* for production of isomaltooligosaccharide. *Korean Journal of Food Science and Technology*. 28. 273-278.

Basu A., Mutturi S. and Prapulla S. G. (2016). Production of isomaltooligosaccharides (IMO) using simultaneous saccharification and transglucosylation from starch and sustainable sources. *Process Biochemistry*. 51. 1464-1471.

Chockchaisawasdee S. and Poosaran N. (2013). Production of isomaltooligosaccharides from banana flour. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 93. 180-186.

Choi Y. H., Baek J. E., Park S. Y. Choi H. S. and Song J. (2014). Characteristics and yield of jochung processed by different preparation methods. *The Korean Journal of Food and Nutrition*. 27. 414-420.

Gänzle M. G. and Follador R. (2012). Metabolism of oligosaccharides and starch in lactobacilli: a review. *Frontiers in Microbiology*. 3. 1-15.

- Gourineni V., Stewart L. M., Icoz D. and Zimmer P. J. (2018). Gastrointestinal tolerance and glycemic response of isomaltooligosaccharides in healthy adults. *Nutrients*. 10. 301.
- Hong J. H., Lee J. J., Hur S. H., Choi H. S. and Kong J. Y. (2001). Effect of agarooligosaccharides on the growth of intestinal bacteria. *Journal of Food Hygiene and Safety*. 16. 11-15.
- Inagaki S., Min J. Z. and Toyo'oka T. (2007). Direct detection method of oligosaccharides by high-performance liquid chromatography with charged aerosol detection. *Biomedical Chromatography*. 21. 338-342.
- Kang S. K., Park N. H. and Lee T. H. (1990). Growth effect of levanoligosaccharide (levanooctose) on intestinal microflora. *The Korean Journal of Microbiology*. 35. 153-157.
- Kim J. R., Yook C., Kwon H. K., Homg S. Y., Park C. K. and Park K. H. (1995). Physical and physiological properties of isomaltooligosaccharides and fructooligosaccharides. *Food Science and Biotechnology*. 27. 170-175.
- Ko J. H., Lee M. S., Kwak B. M., Ahn J., H., Park J. S. and Kwon J. H. (2013). Determination of isomaltooligosaccharides in yoghurts by using HPLC-ELSD. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*. 33. 417-424.

- Lee E. B., Kim H. Y., Han G. J. and Park B. R. (2018). Preparation of iso-maltooligosaccharides using puffed rice flour and evaluation of physicochemical properties. *Korean Journal of Food Preservation*. 25. 229-236.
- 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. (2002). Cooperative action of α -glucanotransferase and maltogenic amylase for an improved process of isomaltooligosaccharide (IMO) production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50. 2812-2817.
- Lee M. Y. and Kang T. S. (1998). Production and property of maltooligosaccharide by *Bacillus cereus* IAM 1072 with response surface methodology. *Journal of Korean Society of Food Science and Nutrition*. 27. 639-647.
- Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analysis Chemistry* 31: 426-428.
- Niu D., Qiao J., Li P., Tian K., Liu X., Singh S. and Lu F. (2017). Highly efficient enzymatic preparation of isomalto-oligosaccharides from starch using an enzyme cocktail. *Electronic Journal of Biotechnology*. 26. 46-51.
- Pan Y. C., Lee W. C. (2005). Production of high-purity iso-malto-oligosaccharides syrup by the enzymatic conversion of transglucosidase and fermentation of yeast cells. *Biotechnology and Bioengineering*. 89. 797-804.

- Park B.S. (2008). Bifidogenic Effects of inuloprebiotics in broiler chickens. *Journal of Life Science*. 18. 1693-1699.
- Plongbunjong V., Graidist P., Knudsen K. E. B., and Wichienchot S. (2017). Isomaltooligosaccharide synthesised from rice starch and its prebiotic properties in vitro. *International Journal of Food Science and Technology*. 52. 2589-2595.
- Qiang X., Yonglie C., and Qianbing W. (2009). Health benefit application of functional oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*. 77. 435-441.
- Saminathan M., Sieo C. C., Kalavathy R., Abdullah N. and Ho Y. W. (2011). Effect of prebiotic oligosaccharides on growth of *Lactobacillus* strains used as a probiotic for chickens. *African Journal of Microbiology Research*. 5. 57-64.
- Sheng G. E., Dong-lian C. A. I. and Li-li W. A. N. (2006). Determination of glycemic index of xylitol and isooligosaccharide. *Chinese Journal of Clinical Nutrition*, 14. 235 - 237.
- Yen C. H., Tseng Y. H., Kuo Y. W., Lee M. C., and Chen H. L. (2011). 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.

Zhou J , Qi Y., Ritho J., Duan L., Wu L., Diao Q., Li Y., and Zhao J. (2012).
Analysis of maltooligosaccharides in honey samples by ultra-performance
liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detection
germinated grains. Source of bioactive compounds. Food Chemistry. 135.
950-959.

