



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](#)

## 국문 초록

GOS는 모유 성분 중에 3 번째로 많이 존재하는 올리고당의 한 가지이다. 이는 모유나 동물 유즙에 천연적으로 존재한다. 프리바이오틱스(prebiotics)는 비피더스 유산균의 성장을 촉진시키는 인자이며 올리고당과 식이 섬유가 이에 포함되며 이 중 GOS가 가장 널리 알려져 있다.

본 연구의 목적은 GOS를 합성하는 방법을 새롭게 하고 새로운 GOS 합성하는 데에 있다.

균 선별 실험을 통해서  $\alpha$ -와  $\beta$ -galactosidase 활성이 높은 프로바이오틱스(probiotics)인 *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* RD47 (RD 47)을 선발하였다. RD 47이 modified MRS(기존 MRS 배지에 텍스트란 대신에 라피노오스를 2% (w/v) 첨가하는 것)에 배양하였을 때  $\alpha$ -와  $\beta$ -galactosidase의 활성이 가장 높았다. 올리고당 합성반응 조건으로는 pH 6, 37°C에서 GOS의 합성수율이 가장 높았다.

RD 47의 조효소액을 이용하여 갈락토오스(galactose)를 원료로 하여 새로운 GOS가 합성된 것을 확인할 수 있었다. TLC 결과에는 4가지 GOS가 합성된 것을 확인할 수 있었다. 합성된 GOS는 GOS II-V로 명명하였고, GOS II는 di-galactose, GOS III는 tri-galactose, GOS IV는 tert-galactose, GOS V는 penta-galactose인 것으로 추정하였다. 그중에 GOS III가 가장 많이 합성되었고 그 다음으로는 GOS II인 것을 확인할 수 있었다.

SPE (Solid phase extraction) tube로 합성된 GOS를 정제 및 분리하였을 때 GOS III가 정제 분리되었다. 600 MHz NMR (Nuclear Magnetic Resonance)로 GOS III의 구조분석을 진행하였다. 예상 구조는  $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1→6)-O- $\alpha$ -D-galactopyranosyl-(1→6)-O-D-galactopyranose이다.

본 연구를 통해서 GOS를 합성하는 방법을 새롭게 제시하였고 안전성에 문제가 없는 방법으로서 비피도박테리움의 조효소액으로 갈락토오스를 이용하여 신규한 GOS를 생산할 수 있다는 것을 규명하였다. 앞으로 이는 식품, 의약, 생물학 등 영역에서 유용하게 활용될 것으로 기대된다.

**Keywords:** Galactose, Oligosaccharide, Bifidobacterium, GOS, 갈락토올리고당

학번: 2012-22650

# 목 차

국문초록 .....	i
목 차 .....	iii
그림목차 .....	v
표 목 차 .....	v
약어요약 .....	vi
<b>1. 서론</b> .....	<b>1</b>
1.1 갈락토올리고당(galactooligosaccharides,GOS)의 정의 .....	1
1.2 GOS의 기능성 .....	1
1.3 GOS의 합성 방법 .....	3
<b>2. 실험재료 및 방법</b> .....	<b>5</b>
2.1. 실험재료 및 시약 .....	5
2.2. 사용균주 및 배양조건 .....	6
2.3. 효소추출 및 활성 분석 .....	7
2.3.1. 조효소의 추출 .....	7
2.3.2. 효소의 활성 측정 및 분석 .....	7
2.4. GOS의 합성 .....	8
2.4.1. GOS의 합성 조건 .....	8
2.4.2. GOS의 합성 결과 .....	8
2.5. 합성된 GOS의 정제 및 분석 .....	9

2.5.1. 합성된 GOS의 분리 및 정제 .....	9
2.5.1.1 유리판 TLC를 이용한 GOS 분리 및 정제 .....	9
2.5.1.2 Solid phase extraction (SPE)법으로 GOS 분리 및 정제 ..	9
2.5.2. 합성된 GOS의 구조 분석 .....	10
<b>3. 실험 결과 및 고찰 .....</b>	<b>11</b>
3.1 GOS의 합성 .....	11
3.1.1 GOS의 합성 조건 .....	11
3.1.2 합성된 GOS의 종류 .....	14
3.2. 합성된 GOS의 구조분석 .....	16
3.2.1 유리판 TLC로 GOS의 분리 및 정제 .....	16
3.2.2 SPE로 GOS의 분리 및 정제 .....	18
3.2.3 NMR로 GOS의 구조 분석 .....	22
<b>4. 요약 및 결론 .....</b>	<b>29</b>
<b>참고문헌 .....</b>	<b>30</b>
<b>Abstract in English .....</b>	<b>36</b>

## 그림 목 차

Fig 1. Outline of galactooligosaccharides synthesis by $\beta$ -galactosidase from lactose .....	4
Fig 2. The $\alpha$ -and $\beta$ -galactosidase activities of RD 47 .....	13
Fig 3. Results of a TLC analysis of galacto-oligosaccharides .....	15
Fig 4. The GOS II and GOS III obtained by TLC separation .....	17
Fig 5. The result of GOS III purified by SPE .....	19
Fig 6. HSQC spectrum of purified GOS III .....	20
Fig 7. HMBC spectrum of purified GOS III .....	21
Fig 8. Deduced structure of GOS III .....	24

## 표 목 차

Table 1. The components of Modified MRS .....	11
Table 2. $^{13}\text{C}$ -NMR chemical shift .....	23
Table 3. $^{13}\text{C}$ -NMR chemical shift of galactose in literature .....	24
Table 4. Structural formula of glycosidic bond of different degree of polymerization in GOS .....	28

## 약 어 요약

DW: distilled water

Gal: galactose

Glu: glucose

GOS: galacto-oligosaccharides

HMBC: heteronuclear multiple bond correlation

HSQC: heteronuclear single quantum coherence

MRS: deMan-Rogosa sharpe

NMR: nuclear magnetic resonance

pNP: para-nitrophenol

PB: sodium phosphate buffer

RD 47: *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* RD 47

SPE: solid phase extraction

TLC: thin layer chromatography

# 1. 서론

## 1.1 갈락토올리고당(galactooligosaccharide,GOS)의 정의

갈락토올리고당(galactooligosaccharide, GOS)은 갈락토오스(galactose)를 주성분으로 하는 올리고당의 총칭이며  $\alpha$ -와  $\beta$ -결합 형식이 있다.  $\alpha$ -GOS는 식물에 널리 존재하고 있고 라피노오스(raffinose)와 스타치오스(stachyose) 등은 이에 포함되어 있다. 동물성  $\alpha$ -GOS는 비환원 말단이 표면지질, 단백질, 당화합물에 결합되는 형식으로 존재한다.<sup>(4)</sup>  $\beta$ -GOS는 주로 동물성으로 존재하는데, 특히 동물 유즙이나 인간 모유에 많이 존재하고 있다. 공업적으로 GOS는 락토오스 (lactose)를 원재료로 하고  $\beta$ -galactosidase를 이용하여 가공한다. GOS의 구조는 일반적으로 Gal/Glu-(Gal)n-Gal (Glu; glucose, Gal; galactose, n=0~6)이다. 락토오스( $\beta$ -1,4)는 이에 제외된다.<sup>(1-3)</sup>

## 1.2 GOS의 기능성

프리바이오틱스(prebiotics)는 비피더스 유산균의 성장을 촉진시키는 인자이며 올리고당과 식이 섬유가 이에 포함되며 이 중 GOS가 가장 널리 알려져 있다.  $\alpha$ -와  $\beta$ -GOS는 모두 활성이 높은 프리바이오틱스 소재이다. 프리바이오틱스는 장내 유익한 박테리아의 성장을 돕는 난소화성 성분으로서 비피도박테리움 등 프로바이오틱스의 영양원이 되어 장내 환경을 개선하는 데 도움을 주는 물질이다.

GOS는 소장에서 분해되지 않고 대장에 도달하고, 프리바이오틱스로서 장내 유용세균인 비피도박테리움의 증식인자로 작용하여 산성물질을 생성하여 장내 pH를 낮추고 장내의 대장균, 장 구균 및 부패성세균의 증식을 억제한다.<sup>(4,5)</sup> 비피도박테리움은 거식세포의 식작용을 활성화 하는



데에 도움을 주어 인체 면역력 향상, 암 세포 성장을 억제에 적극적인 영향을 준다.<sup>(31)</sup>

유당불내증 (Lactose intolerance)은 락토오스 (lactose)를 소화시키는 데 필요한 효소인  $\beta$ -D-galactosidase가 부족해서 락토오스를 소화시킬 수 없어 설사하는 증상이 나타나는 현상이다. 비피도박테리움은 GOS를 흡수하여  $\beta$ -D-galactosidase를 합성할 수 있으며 락토오스 분해에 사용할 수 있으므로 유당불내증을 완화시켜 준다.

칼슘은 주로 대장에서 흡수함으로 GOS는 칼슘과 마그네슘의 흡수를 촉진하는 데에 중요한 역할을 하여<sup>(32)</sup> 골밀도를 강화해 주어 골다공증을 예방하는 효과도 있다고 보고되었다.<sup>(7,10,33)</sup>

GOS의 섭취가 혈청 콜레스테롤 수준을 저하시킬 수 있다는 연구가 많이 보고되었다. GOS는 프로바이오틱스를 증식하고 이의 대사산물이 단쇄 지방산인 것으로 총 혈청콜레스테롤 농도를 낮춘다는 보고도 있었다.<sup>(34,35)</sup>

GOS는 장관 요소 분해되지 못하여 칼로리가 발생하지 않은 저칼로리 당이다. 그래서 당뇨 등으로 당 섭취가 제한되는 사람에게 유용하고, 조제분유, 음료수, 아이스크림, 빵 등의 식품소재, 의약품 및 가축사료로 이용되고 있다.<sup>(1,6)</sup>

GOS는 충치의 원인균인 구강 구균(*Streptococcus mutans*)의 생육에 이용되지 않고 또한 불용성 글루칸이 생성되지 않으므로 충치의 원인물질이 되지 않는 것으로 보고되었다.<sup>(8)</sup>

또한 장내 비피도박테리움의 대사산물인 단쇄 지방산이 대변의 수분함량과 삼투압을 증가시키고 장의 운동을 자극하여 변비 개선효과가 있다.

위에 기술된 바와 같이 GOS의 기능성은 비피도박테리움으로 대표되는 장내 유익균의 증식을 촉진시킴으로써 발생하며, 임상실험으로 장 및 간

기능개선, 혈압의 강하, 항암작용, 골다공증의 예방 등 많은 효과가 보고되어 있다. 반면 섭취 시 발생하는 부작용으로는 일시적인 더부룩함 정도로 매우 안전한 물질로 간주된다.<sup>(7,10)</sup> 또한 GOS는 약산성조건하에서 열에 매우 안정한 성질을 가지고 있어 설탕 대비 열변성 등의 우려가 없다.

따라서 가치 있는 올리고당의 합성은 식품, 의학, 생물학 등 영역에서 유용하게 활용할 수 있을 것이다.<sup>(9)</sup>

### 1.3 GOS의 합성 방법

갈락토올리고당은 천연적으로 존재하지만 함량이 낮고 이는 무기질처림 전하를 띠고 있지 않으므로 천연 추출은 효율적이지 않다. 화학적인 합성법은 독성 우려가 있어 갈락토올리고당을 식품소재로 하였을 때 좋은 제조 방법이 아니다. 미생물 발효법을 이용하여 갈락토올리고당을 합성할 수도 있지만 발효액에 복잡한 성분이 포함되며 분리 정제하기가 어렵다. 연구 진행되는 바와 같이 지금까지 미생물 효소를 이용하여 갈락토올리고당을 합성하는 방법이 선호되고 있다. 이는 주로 락토오스를 기질로 사용하여 미생물의  $\beta$ -galactosidase 효소를 이용하는 방법이다. 이 방법에 대한 주요 영향 인자는 효소의 급원, 반응 온도, pH, 기질농도 등이다. 반응 매커니즘은 Fig. 1에 제시되었다.  $\beta$ -galactosidase 의 카르복실기가 촉매작용 하는 데에 중요한 역할을 하고 있다. 반응 과정에 중간 물질이 생성되는데 수용액이 수용체로 작용하였을 때 가수분해작용을 일으키고 당분자(락토오스 등)가 수용체로 작용하였을 때 당전이반응이 일어난다. 당 분자에 갈락토오스를 연결시켜주는 과정은 갈락토올리고당을 합성하는 과정이다.<sup>(2)</sup>  $\beta$ -galactosidase로 합성되는 갈락토올리고당은  $\beta$ -

GOS이고  $\alpha$ -GOS는 *Aspergillus niger*의  $\alpha$ -galactosidase를 이용하여 고농도 갈락토오스를 기질로 합성한 연구가 있었다.<sup>(4)</sup>

또한  $\alpha$ -GOS의 생산 공정은 라피노오스, 스타치오스, 베르바스코오스(verbascose)를 많이 함유하는 식물 등을 원료로 하여 미생물 발효법을 통해서 프룩토오스(fructose)를 잘라내고 글루코오스와 갈락토오스가 연결된 구조를 생산하는 과정을 이용한다.<sup>(14)</sup>

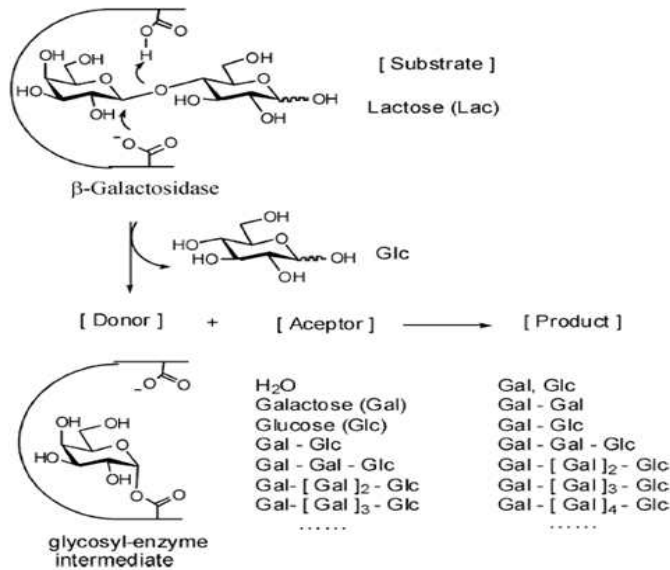


Fig. 1 Outline of galactooligosaccharides synthesis by  $\beta$ -galactosidase from lactose <sup>(2)</sup>

위와 같이 다양한 연구에서는 갈락토올리고당의 합성에서 갈락토오스를 기질로 이용한 연구가 주로 이루어졌다. 반면에 본 연구에서는 갈락토오스를 기질로 이용하는 새로운 합성방법을 시도하였다. 본 연구의 목적은 *Bifidobacterium* 조효소 액으로 갈락토오스를 기질로 이용하여 안전성 문제가 없는 방법으로 갈락토올리고당을 생산하는 데에 있다.

## 2. 실험재료 및 방법

### 2.1 실험재료 및 시약

*Bifidobacterium* 의 배양은 deMan-Rogosa Sharpe (MRS) (Difco, Detroit, MI, USA) 배지를 사용하였다. 사용 균주의 galactosidase 생산에 대한 탄소원의 영향에 대한 연구에서 당 이외에는 MRS의 성분을 함유한 modified MRS 배지 조성을 사용하였다. Modified MRS의 성분 중에 proteose peptone NO.3, beef extract, yeast extract는 Difco (Detroit, MI, USA)의 제품을 사용하였다. Sodium phosphate monobasic(anhydrous), sodium phosphate dibasic (anhydrous), tween 80는 Samchumn Pure Chemical CO.,LTD. (Pyeongtaek city, Korea)의 제품을 사용하였다. 나머지 시약은 시그마 회사에서 구입하였다. 유기용매는 HPLC grade를 사용하였고 methanol 외에는 모두 시그마 회사 것을 사용하였다. Methanol은 Duksan Pure Chemicals (Ansan city, Korea)의 제품을 사용하였다.

## 2.2 사용 균주 및 배양 조건

서울대학교 식품영양학과 식품미생물 연구실에서 보유하고 있는 유산균인 비피도박테리움 (*Bifidobacterium*)과 락토바실러스 (*Lactobacillus*) 중 32 개 균주를 스크리닝을 하였다. 그 중에서 *B. longum* subsp. *longum* RD 47 (RD 47)은 가장 우수한  $\alpha$ -와  $\beta$ -galactosidase 활성을 가지므로 이 연구에 사용하는 균주로 선발하였다. 선발하는 과정에서 모든 균주는 0.05% (w/v) cysteine-HCl (Sigma, St, Louis, Mo, USA)를 첨가한 MRS 배지에 배양하였다.<sup>(12)</sup> 냉동 보관한 stock 1% (v/v)를 배지에 접종하고 37°C에서 18 시간 동안 혐기 배양하였다. 동일한 조건에서 위 배양액을 1% (v/v)를 취하여 새 MRS 배지에 접종하고 2 차 배양하였다.

효소활성을 증가시키기 위하여 0.05% (w/v) cysteine-HCl를 함유한 modified MRS에 2% (w/v) 탄소원을 첨가해서 선발된 균을 37°C에서 18 시간 동안 혐기 배양하였다.

본 연구 실험에서 사용하는 sodium phosphate buffer (PB)는 50 mM sodium phosphate dibasic 용액과 50 mM sodium phosphate monobasic 용액을 혼합하면서 pH 6로 조절하였다. 용매는 3 차 증류수 (distilled water; DW)를 사용하였다.

실험에서 사용된 tube, broth, buffer 등은 autoclave (121°C, 15 분)로 멸균하였다.

## 2.3 효소 추출 및 활성 분석

### 2.3.1 조효소의 추출

효소는 초음파 (sonication)로 생균 세포를 파쇄하여 추출하였다. 추출한 효소는 당일에 4°C에서 보관하였고 효소 활성은 para-nitrophenol (*p*NP)-D- $\alpha$ -galacto-pyranosides와 *p*NP-D- $\beta$ -galacto-pyranosides가 기질로 반응하고 흡광도를 측정하여 분석하였다.

배양한 균액을 1 mL씩 취하여 원심분리 (16,000 × g, 5 분, 4°C)하고 상등액을 버리고 1 mL의 50 mM PB (pH 6)로 두 번을 세척하였다. PB로 원심분리된 균을 현탁하여 sonicator (Sonicator 500, Q-Sonica, U.S.A)로 4°C 에서 1.0 s in/1.0 s off로 5 분 동안 균 세포를 파쇄하였다. 다시 원심분리(16,000 × g, 10 분, 4°C )하여 상등액을 조효소 추출액으로 사용하였다.

### 2.3.2 효소의 활성 측정 및 분석

PNP-D- $\alpha$ -galacto-pyranosides와 *p*NP-D- $\beta$ -galacto-pyranosides 기질로 효소활성을 측정하였다. 추출한 효소 원액은 50 mM의 PB (pH 6)로 1 : 15 (5  $\mu$ l: 75  $\mu$ l)로 희석하였다. 50 mM PB (pH 6)가 용매로 하는 5 mM *p*NP-D- $\alpha$ -galacto-pyranosides와 5 mM *p*NP-D- $\beta$ -galactoside를 기질로 만들었다. 기질과 효소는 1 : 4 (20  $\mu$ l: 80  $\mu$ l)의 비율로 37°C에서 10 분 동안 shaking incubator에서 반응시켰다. 반응 후 100  $\mu$ l의 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 405 nm에서 흡광도를 측정하여 효소 활성을 분석하였다. 표준물질로서는 *p*NP를 사용하였다.

## 2.4 갈락토올리고당(GOS)의 합성

### 2.4.1 GOS의 합성 조건

갈락토오스(galactose) 분말 시약을 PB (pH 6)에 용해하여 70% (w/v) 용액으로 만들었다. 이는 기질로 RD 47 조효소와 1 : 2 (v/v)의 비율로 37°C, 200 rpm의 조건으로 항온수조에서 반응시키었다. 갈락토오스의 최종농도는 23%(w/v)이었다. 시료를 100°C 끓은 물에 10 분 동안 열처리 하여 효소를 불화성화 시켜서 반응을 종료하였다.

GOS를 합성할 때 사용되는 모든 시료는 실린지 필터 (Acrodisc syringe filter 0.2  $\mu$ m Supor Membrane Low Protein Binding Non-Pyrogenic PN4602)로 하여 멸균 시키었다.

### 2.4.2 GOS 합성 결과 확인

Thin-layer chromatography (TLC)로 GOS 합성 현황을 확인하였다. Silica gel plate 60 F254 (Merck, Darmstadt, Germany)을 고정상으로 사용하였다. 10 배로 희석한 시료를 10  $\mu$ l씩 일정한 간격(1 cm or 0.8 cm)으로 TLC plate에 점적하였다. 이동상은 1-propanol : DW : ethyl-acetate (7 : 2 : 1)의 비율로 하였고, 발색제는 sulfuric acid-ethanol (1 : 9, v/v)로 사용하였다. 이동상을 200 mL를 준비하여 TLC chamber에 넣어 포화시킨 후에 TLC에 전개시키었다. 전개된 silica gel plate는 발색제를 골고루 분사한 후에 후드에서 말린 후에 dry oven (110°C, 5 분)에서 가열하여 GOS의 합성 현황을 확인하였다.<sup>(12)</sup>

## 2.5 합성된 GOS의 정제 및 분석

### 2.5.1 합성된 GOS의 분리 및 정제

합성된 GOS는 유리판 TLC를 사용한 방법과 SPE (Solid phase extraction)법으로 분리 정제 실험을 하였다.

#### 2.5.1.1 유리판 TLC를 이용한 GOS 분리 및 정제

Silica gel 60 F254 glass plate를 사용해서 합성된 시료를 최대한 많이 점적하였다. 전개를 종료한 후 유리판을 수직으로 1/5를 유리칼로 잘라내서 발색시켜 당의 위치를 확인하였다. 전개 용매하고 발색제는 위와 동일하게 하였다. 발색시킨 부분을 대조해서 남은 4/5의 유리판에 GOS의 위치를 표시하여 해당 silica gel를 유리판에서 분리하였다. 분리된 silica gel를 모아서 3 차 증류수 (triple distilled water, DW) 에다가 녹여서 원심분리 (16,000 × g, 10 분, 4°C)하고 상등액을 회수하여 동결건조 (-80°C, 48 시간) 하였다. 동결 건조 후에 남은 분말 시료를 회수하여 DW에 녹여서 TLC plate로 분리여부를 확인 후에 NMR(Nuclear Magnetic Resonance)로 구조를 분석하였다.

#### 2.5.2.2 SPE법으로 GOS의 분리 및 정제

고정상은 Supelclean Envi-Carb SPE tube (0.5 g/ 6 mL, 30 pk) (Sigma-Aldrich Co. LLC)를 사용하였다. 이동상은 유기용매 (methanol, 1-propanol, ACE, ethyl acetate)를 농도별 (5, 10, 15, 20, 50, 70, 90, 100%)로 하였고 시료를 10 배로 희석하여 분석 실험을 진행하였다.

본 연구에서 합성된 GOS를 분리하는 데에 표준화를 다음과 같이 하였다.

SPE tube에 고정상을 활성화시키기 위하여 tube 용적의 2 배의 해당되



는 100% 유기용매 (12 mL)를 용출시키었다. 활성화 시킨 후에 같은 양의 DW로 고정상에 남은 유기용매를 세척하였다. 이어서 10 배로 희석한 시료를 1 mL 용출시킨 후에 4 mL DW를 흘려보내면 갈락토오스를 제거할 수 있었다. 농도를 맞춘 유기용매를 흘려보내면서 GOS 분리 작업을 진행하였다. 이 SPE tube를 사용하는 동안 용출되는 시료를 분획별로 회수하였고 TLC를 이용하여 확인하였다.

목적 분획물을 모아서 동결건조 (-80°C, 48 h) 하여 시료를 조제하였고 건조시료를 D<sub>2</sub>O에 녹여서 NMR로 구조분석을 하였다.

### 2.5.2 합성된 GOS의 구조분석

합성된 GOS의 구조 분석은 NMR로 하였다. NMR 측정은 서울대학교 공동기기원에 의뢰하였다. 600 MHz NMR Cryoprobe (z-gradient, 5 mm)로 <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C와 2D(HSQC, HMBC)로 분석하였고 용매는 D<sub>2</sub>O를 사용하였다.<sup>(11,13)</sup>

### 3. 실험 결과 및 고찰

#### 3.1 GOS의 합성

##### 3.1.1 GOS의 합성 조건

선행 연구<sup>(16)</sup>에서 RD 47는 유익균 중에서  $\alpha$ -와  $\beta$ -galactosidase 생산능이 우수한 것으로 보고되었다. Modified MRS (Table 1)에 탄소원으로 raffinose를 첨가하였을 때 RD 47의  $\alpha$ -와  $\beta$ -galactosidase 활성은 가장 높았다(Fig. 2).

균을 배양하고 실험 재료 및 방법에 기술한 바와 같이 RD 47의 galactosidase 조효소액을 얻었다. 한유리 등의 실험에서 pH 5, 5.5, 6, 7, 7.5 중 RD 47의  $\alpha$ -와  $\beta$ -galactosidase 활성은 pH 6, 온도 37°C에서 가장 우수하다고 발표되었다.<sup>(12)</sup> 본 연구에서는 선행 연구의 결과에 따라 pH 6로 하였고 반응 온도는 37°C로 하였다.

GOS 합성반응을 하는 실험에서는 기질을 농도 별로 하고 기질과 효소의 비율을 조합하여 시간 별로 반응시키었다. 최적 반응 조건은 기질의 농도가 70% (w/v)로 하고 기질과 효소의 비율은 1 : 2 (v/v)로 해서 24 시간 동안 반응시키는 것이었다. 24 시간 지나고 반응 시간에 따라서 더 많이 합성 되지 않았다. 갈락토오스의 최종농도는 23% (w/v)이었다. 효소비율 높여도 더 많이 합성 되지 않음을 확인하였다.

**Table 1. The components of Modified MRS**

<b>component</b>		<b>g/L</b>
Proteose peptone	NO.3	10 g
Beef extract		10 g
Yeast extract		5 g
Sodium acetate		5 g
Tween 80		1 g
Dipotassium phosphate		2 g
Ammonium citrate		2 g
Magnesium sulfate		0.1 g
Manganese sulfate		0.05 g
L-cysteine-HCl		0.5 g

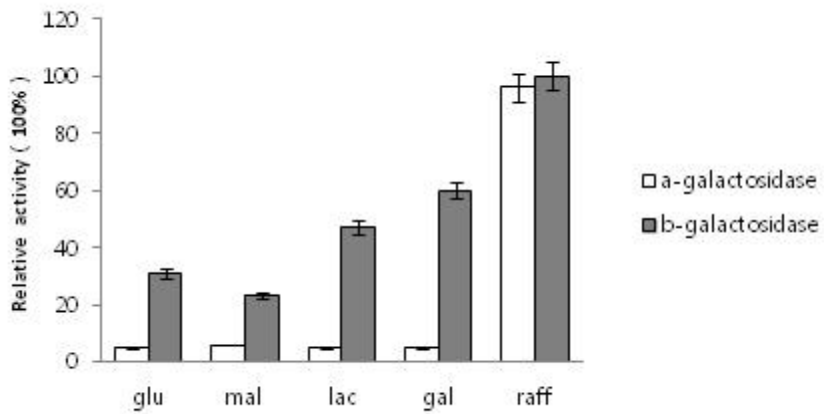


Fig. 2 The  $\alpha$ - and  $\beta$ -galactosidase activities of RD 47, which was grown in basal modified MRS medium containing various 2% (w/v) carbon sources (glu=glucose, mal=maltose, lac=lactose, gal=galactose, raff=raffinose). When RD 47 was grown in modified MRS medium with raffinose as a carbon source, RD 47 showed the highest level of  $\alpha$ - and  $\beta$ -galactosidase activity.

### 3.1.2 합성된 GOS의 종류

TLC결과 (Fig. 3)에서 4 가지 GOS가 합성된 것을 확인 하였다. GOS II-V로 명명하였고 GOSII는 di-galactose, GOSIII는 tri-galactose, GOSIV는 tert-galactose , GOSV는 penta-galactose로 추정하였다. GOS III는 제일 많이 합성된 것을 확인할 수 있었고 그 다음은 GOSII이었다.

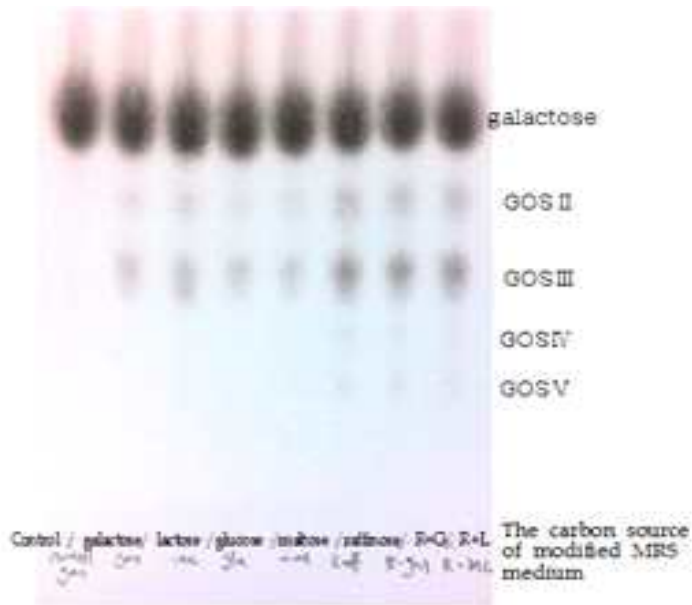


Fig. 3 Results of a TLC analysis of galacto-oligosaccharides synthesized with the crude enzyme extracts from cells grown in the basal modified MRS medium containing various 2% (w/v) carbon sources. R+G contained 1% (w/v) raffinose and 1% (w/v) galactose as a carbon source. R+L contained 1% (w/v) raffinose and 1% (w/v) lactose as a carbon source.

## 3.2 GOS의 구조분석

### 3.2.1 유리판 TLC로 GOS의 분리 및 정제

유리판 TLC로 GOSⅡ, GOSⅢ를 분리 실험을 진행하였다. 이 방법은 쉽게 조작할 수 있지만 분리된 당의 순도가 그다지 높지 않았다. 구조 분석하기에는 적합하지 않았다.

Fig. 4에서 GOSⅡ 분획물의 경우는 GOSⅡ 외에 galactose도 함유되어 있는 것으로 확인되었다. GOSⅢ 분획물의 경우에는 GOSⅢ 대부분이 있었지만 약간 양의 갈락토오스가 함유되어 있는 것으로 나타났다. 이 방법으로 높은 순도의 GOS를 얻지 못 하였습니다.



Fig. 4 The GOS II and GOS III obtained by TLC separation was identified by TLC analyzed.



### 3.2.2 SPE로 GOS의 분리 및 정제

고정상은 SPE tube로 하고 이동상은 실험재료 및 방법에 기술한 바와 같이 methanol 등을 농도 별 (5, 10, 15, 20, 50, 70, 90, 100%)로 하여 GOS의 분리실험을 진행하였다. 이동상은 15% (v/v) methanol로 하였을 때 GOSⅢ를 정제 분리할 수 있었다. Fig. 5는 15% (v/v) methanol를 사용하여 정제한 GOSⅢ의 분획물의 TLC결과이다.

결과적으로 SPE tube 컬럼으로 유리판 TLC보다 높은 순도의 GOSⅢ을 얻을 수 있었다. 본 GOSⅢ 분획물을 이용하여 구조 분석을 진행하였다.



Fig. 5 The result of GOSIII purified by SPE was analyzed by TLC.

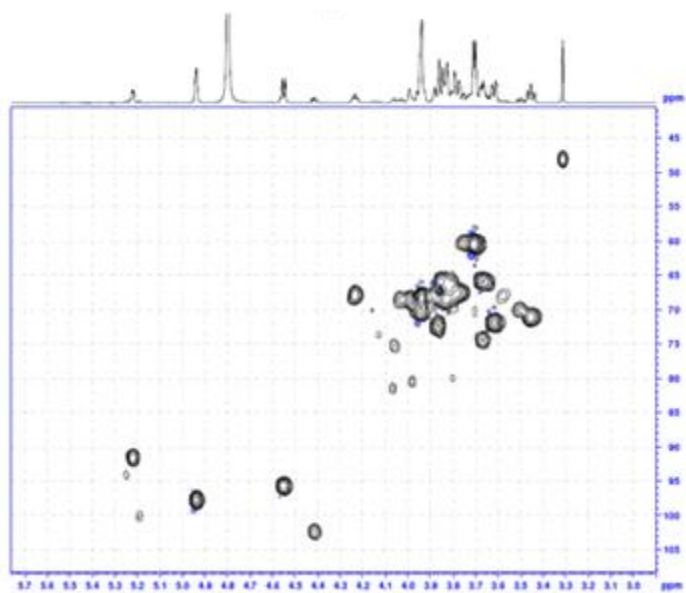


Fig. 6 HSQC spectrum of purified GOSIII.

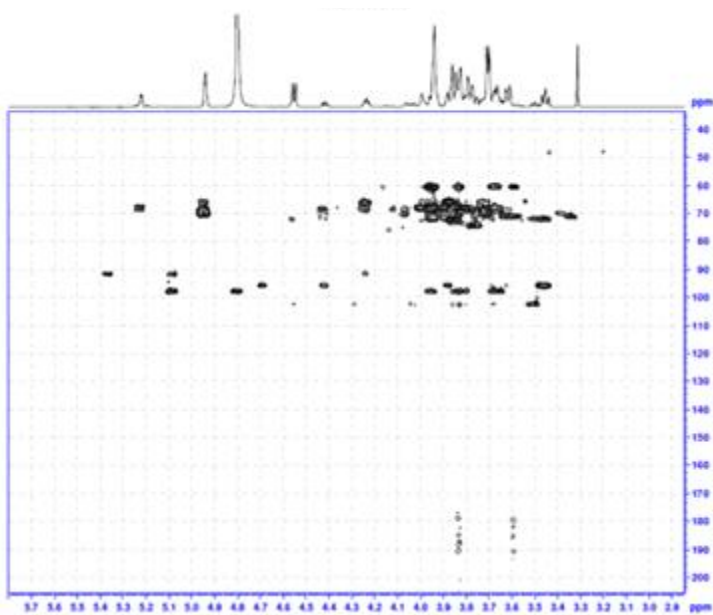


Fig. 7 HMBC spectrum of purified GOS III.

### 3.2.3 NMR를 이용하는 GOS의 구조 분석

GOS 는  $^1\text{H}$ - 및  $^{13}\text{C}$ -NMR에서 2개의 hemiacetal carbon에서 유래하는 signal 이 major 로 관측되었고, 또한 다른 2개의 hemiacetal carbon 에서 유래하는 signal 이 minor 로 관측되었다(Table 2). 따라서 GOS는 3개의 당이 결합한 올리고당으로 추정되었다. Major signal 은 2번 및 3번 당에서 유래한 것이고, minor signal 은 1번당의 anomer 수산기가  $\alpha$  와  $\beta$  가 4:6 정도로 혼재되어 나타난 것으로 확인되었다. 3번당은  $^{13}\text{C}$ -NMR 의 chemical shift 와  $^1\text{H}$ -NMR 에서의 anomer proton 의 결합정수 ( $J=7.2$  Hz)로부터  $\beta$ -galactopyranose로 동정되었다(Table 3). 2번 당은  $^{13}\text{C}$ -NMR 에서의 chemical shift 를 보면 6번 탄소를 제외하면 모두  $\alpha$ -galactopyranose 와 일치하였으며,  $^1\text{H}$ -NMR에서의 anomer proton 의 결합정수가 작게 나타나 ( $J=2.1$  Hz) 1번 수산기가  $\alpha$  인 것이 확인되었다. 6번 탄소는 galactose 의 경우 보통  $\delta_{\text{C}}$  62 정도에서 관측되는데, GOS 의 경우에는  $\delta_{\text{C}}$  65 보다 저자장에서 관측되었는데, 이는 3번 당이 2번당의 6번 수산기에 결합하여 배당체 결합 효과를 나타내었기 때문이다. 1번당의 경우에는 NMR 데이터로부터 galactose 로 추정되었는데, anomer 수산기가 열려 있어,  $\alpha$  와  $\beta$  가 4:6 의 비율로 존재하는 것으로 판명되었다. 1번 당의 6번 탄소 역시  $\delta_{\text{C}}$  65 보다 더 저자장에서 관측되어 1번당의 6번 수산기에 2번 당이 결합한 것이 확인되었다. 따라서 GOS 는  $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-O- $\alpha$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-O-D-galactopyranose로 구조 동정되었다. 각 탄소와 수소의 NMR signal은 HSQC(Fig. 6) 와 HMBC(Fig. 7)를 이용하여 동정하였다.

Table 2 <sup>13</sup>C-NMR chemical shift

Data	Data+2ppm	
102.34	104.34	gal-b1
97.72	99.72	
95.77	97.77	
91.64	93.64	
74.37	76.37	gal-b5
72.18	74.18	gal-b3
71.93	73.93	
71.20	73.2	
70.96	72.96	gal-b2
69.01	71.01	
68.77	70.77	gal-b4
68.53	70.53	
68.28	70.28	
66.09	68.09	
65.61	67.61	
60.25	62.25	gal-b6

Table 3  $^{13}\text{C}$ -NMR chemical shift of galactose in literature

galactose	alpha	beta
1	101.7	106.1
2	70.5	72.5
3	71.6	75.2
4	70.9	70.1
5	72.5	76.8
6	62.6	62.3

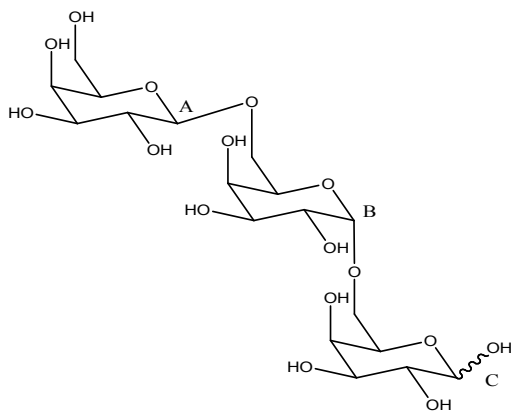


Fig. 8 Deduced structure of GOSIII.

대부분의 연구에서는 미생물의  $\beta$ -galactosidase를 이용하여  $\beta$ -GOS가 합성되었다.  $\beta$ -galactosidase는 락토오스 등의 가수분해 효소이며, 기질 농도가 낮을 때 기질을 가수분해하고 기질 농도가 높을 때에는 당 전이 반응을 일으켜 GOS를 합성할 수 있다.<sup>(3,15,16)</sup> 상품화된 GOS는 락토오스가 원료로 미생물들이 분비하는 당 전이활성을 가진  $\beta$ -galactosidase (EC 3.2.1.23)를 이용하여 획득하였다. GOS 생산에 사용할 수 있는 미생물 (세균, 효모, 곰팡이, 고세균을 포함)의  $\beta$ -galactosidase는 십 여 종인 것으로 이미 알려져 있다.<sup>(18-20)</sup>

산업화하여 생산되는 GOS는 보통 글루코오스, 갈락토오스, 락토오스와 2-5개 단당으로 구성되는 올리고당의 혼합물이다. 산업화 생산에 사용하는 효소의 급원과 생산 공정에 따라서 합성되는 올리고당이 구조와 비율이 다르게 나타날 수 있다. 생산에 사용되는 효소와 생산 공정은 다르지만 상품화된 GOS는 주로 갈락토오스가  $\beta$ -(1→6)와  $\beta$ -(1→4) 결합된 형태이다.  $\beta$ -D(1→3)결합도 상대적으로 많으나  $\beta$ -D-(1→2)결합은 매우 적다. 또한 글루코오스가 없고 갈락토오스만으로 구성되는  $\beta$ -D-Gal-(1→6)-D-Gal도 발견되었다(table 4).<sup>(2,3)</sup>

지금까지 발표된 GOS를 합성할 수 있는 미생물은 *Bacillus circulans*, *Aspergillus niger*, *Sterigmatomyces elviae*, *Bifidobacterium*, *Bullera singularis* KCTC 7534, *Aspergillus* sp. AF, *Bacillus megaterium*2-37-4-1, *Enterobacter agglomerans*B1, *Enterobacter cloacae* CGMCC 1401, *B. bifidum* NCIMB 41171, *Lactobacillus reuteri*, *Talaromyces thermophilus* CBS 236.58, *B. longum* BCRC, *Arthrobacter*, *Pseudoalteromonas* 등이 있다.<sup>(21-29)</sup> 윗 균주들을 이용하는 GOS 합성 연구는 거의 락토오스를 원료로 사용하였다. 때문에 합성된 GOS는 글루코오스를 함유한다. GOS의 일반 구조는 table 4에 나열되어



있다.<sup>(3,17)</sup> 락토오스를 기질로 역합성 하여 생산되는 GOS는 중합도 비율이 일반적으로 tri-> di-> tert-> penta-의 순으로 보고된 바 있는데 본 연구 결과에서도 비슷한 양상이 나타났다.

$\alpha$ -GOS는 천연적으로 식물에 존재하고 있다. 미생물 발효법을 이용하여 합성할 수 있다고 보고되었다. 일반적으로  $\alpha$ -GOS의 구조는  $\beta$ -GOS와 마찬가지로 글루코오스에 갈락토오스(1-4개)가 연결되어 있는 것으로 발표되었다.<sup>(14)</sup>

Akiko Y. 등은 *A. niger*의  $\alpha$ -galactosidase를 이용하여 갈락토오스를 기질로 사용하였을 때  $\alpha$ -GOS가 합성된다는 것을 보고하였다.<sup>(4)</sup>

Tzortzis G. 등은 *L. reuteri*의 조효소를 이용하여 갈락토오스를 기질로 사용하였을 때  $\alpha$ -GOS는 합성되지 못 하였고 멜리비오스 (melibiose; D-Gal- $\alpha$ -1,6-D-Glu) 와 라피노오스를 기질로 사용하였을 때  $\alpha$ -GOS가 합성되었다고 발표하였다. 이들 연구에서 합성된  $\alpha$ -GOS의 구조는 단당들이 모두  $\alpha$ -(1→6)인 것으로 발표되었다.<sup>(30)</sup> 곰팡이 *A. niger*의  $\alpha$ -galactosidase를 이용하여 갈락토오스를 기질로 사용하였을 때  $\alpha$ -GOS를 합성할 수 있지만 유산균인 *L. reuteri*의 조효소 액은 갈락토오스를 기질로 하였을 때  $\alpha$ -GOS를 합성하지 못 하였다.

본 연구를 통해서 갈락토오스를 원료로 하고 *B. longum* RD 47의 조효소를 이용하여 GOS 합성이 가능한 것을 확인하였다. 합성된 GOS III의 구조는  $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1→6)-O- $\alpha$ -D-galactopyranosyl-(1→6)-O-D-galactopyranose이고  $\alpha$ -와  $\beta$ - 결합을 동시에 보유하므로 RD 47의  $\alpha$ -와  $\beta$ -galactosidase가 동시에 작용한 것으로 추정하였다. 따라서 RD 47의  $\alpha$ -와  $\beta$ -galactosidase는 모두 갈락토올리고당 합성능을 가지고 있는 것으로 추정하였다.

일반적으로  $\beta$ -galactosidase의 작용으로 인하여  $\beta$ -GOS가 합성되는데

본 연구를 통해서 RD 47의  $\alpha$ -와  $\beta$ -galactosidase를 이용하여 GOS를 합성할 수 있음을 추정하였다. 본 연구 결과는 앞으로 RD 47의  $\alpha$ -와  $\beta$ -galactosidase를 이용하여 갈락토올리고당을 생산하는데 기여하는 기초 자료로서의 활용성이 기대된다.

Table 4 Structural formula of glycosidic bond of different degree of polymerization in GOS<sup>(3)</sup>

polymerization degree	Structural formula
Di-	$\beta - D - Gal - (1 \rightarrow 6) - D - Glu$
	$\beta - D - Gal - (1 \rightarrow 6) - D - Gal$
	$\beta - D - Gal - (1 \rightarrow 3) - D - Glu$
	$\beta - D - Gal - (1 \rightarrow 2) - D - Glu$
Tri-	$\beta - D - Gal - (1 \rightarrow 6) - \beta - D - Gal - (1 \rightarrow 4) - D - Glu$
	$\beta - D - Gal - (1 \rightarrow 6) - \beta - D - Gal - (1 \rightarrow 4) - \beta - D - Glu$
	$\beta - D - Gal - (1 \rightarrow 3) - \beta - D - Gal - (1 \rightarrow 4) - D - Glu$
	$\beta - D - Gal - (1 \rightarrow 6) - \beta - D - Gal - (1 \rightarrow 6) - D - Glu$
	$\beta - D - Gal - (1 \rightarrow 6) - \beta - D - Gal - (1 \rightarrow 6) - \beta - D - Glu$
	$\beta - D - Gal - (1 \rightarrow 6) - \beta - D - Gal - (1 \rightarrow 6) - D - Gal$
	$\beta - D - Gal - (1 \rightarrow 2) - \beta - D - Gal - (1 \rightarrow 6) - D - Glu$
	$\beta - D - Gal - (1 \rightarrow 4) - \beta - D - Gal - (1 \rightarrow 6) - D - Glu$
Tert-	$\beta - D - Gal - (1 \rightarrow 4) - \beta - D - Gal - (1 \rightarrow 6) - \beta - D - Gal - (1 \rightarrow 4) - D - Glu$
	$\beta - D - Gal - (1 \rightarrow 6) - \beta - D - Gal - (1 \rightarrow 3) - \beta - D - Gal - (1 \rightarrow 4) - D - Glu$
	$\beta - D - Gal - (1 \rightarrow 3) - \beta - D - Gal - (1 \rightarrow 6) - \beta - D - Gal - (1 \rightarrow 4) - D - Glu$
	$\beta - D - Gal - (1 \rightarrow 2) - \beta - D - Gal - (1 \rightarrow 2) - \beta - D - Gal - (1 \rightarrow 4) - D - Glu$
	$\beta - D - Gal - (1 \rightarrow 6) - \beta - D - Gal - (1 \rightarrow 6) - \beta - D - Gal - (1 \rightarrow 4) - \beta - D - Gal - (1 \rightarrow 4) - D - Glu$
Pent-	$\beta - D - Gal - (1 \rightarrow 6) - \beta - D - Gal - (1 \rightarrow 6) - \beta - D - Gal - (1 \rightarrow 4) - \beta - D - Gal - (1 \rightarrow 4) - D - Glu$

## 4. 요약 및 결론

갈락토올리고당(GOS)은 프리바이오틱스 중에 가장 널리 알려져 있다. GOS의 생산은 가용성 효소법, 초고압에 의한 생산, 고정화 효소에 의한 방법 등이 있다.<sup>(8)</sup> 본 연구에서는 프로바이오틱스 균주인 *B. longum* RD 47의 조효소 액을 이용하여 갈락토오스로부터 GOS를 합성하는 방법을 새롭게 제시하였다. 합성된 올리고당은 갈락토오스로만 구성되는 GOS이며  $\alpha$ -와  $\beta$ -결합을 동시에 가지는 새로운 GOS가 합성되었다. 유익균인 *Bifidobacterium*의 조효소를 이용하여 GOS를 합성하였기 때문에 안전성 문제가 없는 프리바이오틱스 소재로서의 사용이 가능할 것으로 사료된다. GOS의 종류가 많이 있으나 갈락토오스만으로 합성되는 GOS는 많지 않았다. 본 연구에서 합성된 GOS는 앞으로 기능성 식품에 활용되는 올리고당 소재로의 응용이 기대된다.

## 참고문헌

1. Li JW, Wang Z, Yang YX. Determination of galacto-oligosaccharide in syrups by high performance ion exchange chromatography method. China J. Hyg. Res. 35: 584-586 (2006)
2. Lili L, Zhengyi L, Min X. Recent progress on galacto-oligosaccharides synthesis by microbial  $\beta$ -galactosidase. Acta Microbiol. Sin. 48 : 980-985 (2008)
3. Zhang ZG. Research and application on functional galactooligosaccharides. China Food Addit. 6: 207-213 (2012)
4. Akiko Y, Hiroyuki H, Koki F, Masamichi O, Shigeharu M, and Sumio K. Reverse reaction of *Aspergillus niger* APC-9319  $\alpha$ -Galactosidase in a supersaturated substrate solution: production of  $\alpha$ -Linked Galactooligosaccharide ( $\alpha$ -GOS). Japan Biosci. Biotechnol. Biochem. 69: 1381-1388 (2005)
5. Jørgensen F, Hansen OC, Stougaard P. High-efficiency synthesis of oligosaccharides with a truncated  $\beta$ -Galactosidases from *Bifidobacterium bifidum*. Appl Microbiol. Biotechnol. 57: 647-652 (2001)
6. Kim CR. Use of Galactooligosaccharides from Cheese Whey for Growth of *Bifidobacteria*. Korea J. Food & Nutr. 12: 50-54 (1999)
7. Shin HJ, Yang JW. Characteristics of Galacto-oligosaccharide production using cellulases. Korea J. Biotechnol. Bioeng. 11: 317-322 (1996)

8. Heo GT. Physiological characteristic of Galactooligosaccharide. pp. 24-28. In: Symposium on health and functional food. Spetember, Sangji Univ. Wonju, Korea. The Korean Society of Food Science and Technology, Seoul, Korea (1995)
9. Liu YL, Yin H, Cui P, Deng MY, Du B. Chemical synthesis, structural characterization of galactan. *China Chem. Res. and App.* 25: 1726-1729 (2013)
10. Macfarlane GT, Steed H, Macfarlane S. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *J. Applied Microbiol.* 104: 305 - 344 (2008)
11. Duarte PMT, Maria DPF, José AT, Lígia RR. Galactooligosaccharides: production, properties, applications, and significance as prebiotics. *Comperhensive Rev. in Food Sci. and Food Saf.* 9: 438-454 (2010)
12. Han YR, Youn SY, Ji GE, Park MS. Simultaneous production of  $\alpha$ - and  $\beta$ -Galactosidases from *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* RD47. *J. Microbiol. Biotechnol.* 24: 675 - 682 (2014)
13. Barbara RC, Miguel AA, Lucia FA, Roseri de B, Ana P, Jesus JB, Dietmar H, Antonio OBO, Maria FL, Francisco JP. Production of Galacto-oligosaccharides by the  $\beta$ -Galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: Comparative Analysis of Permeabilized Cells versus Soluble Enzyme. *Agr. and Food Chem.* 59: 10477-10484 (2011)
14. Hou XH, Zhang JZ, Lin J, Duan SF, Gao JT, Zhou ZQ. Response surface methodology for preparation  $\alpha$ -galacto-

- oligosaccharide from plants by fermentation. China National Res. Inst. of Food & Ferment. Ind. 40: 119-123 (2014)
15. Kumiko A, Mitsunori T, Koki H, Shigeo O. Production of galactooligosaccharides from lactose using a  $\beta$ -glucosidase from *Thermus* sp2-1. J. Biosci. Biotech. Biochem. 65: 438-441 (2001)
  16. Prenosil JE, Stuker E, Bourne JK. Formation of oligosaccharides during enzymatic lactose hydrolysis and their importance in a whey hydrolysis process, part II: experimental. J. Biotech. Bioeng. 30: 1026-1031 (1987)
  17. Gui L, Wei D. Biologically active substance-Galacto-oligosaccharide. J. China Dairy Ind. 4: 9-12 (1998)
  18. Mahoney RR. Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: a review. Food Chem. 63: 147-154 (1998)
  19. Sako T, Matsumoto K, Tanaka R. Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. J. Int. Dairy. 9: 69-80 (1999)
  20. Nakakuki T. Oligosaccharides, production, properties, and applications. : Gordon and Breach Science Publisher, Switzerland. pp90-106 (1993)
  21. Kim CR, Lee SR, Lee YK. Formation of galactooligosaccharides by the partial purified beta-galactosidase from *Aspergillus niger* CAD 1. Han'guk Ch'uksan Hakhoechi. 32: 323-333 (1990)

22. Onishi N, Yamashiro A, Yokozeki K. Production of galacto-oligo-saccharide from lactose by *Sterigmatomyces elviae* CBS8119. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 4022 - 4025 (1995)
23. Rabiou BA, Jay AJ, Gibson GR, Rastall RA. Synthesis and fermentation properties of novel galacto-oligosaccharides by beta-galactosidases from *Bifidobacterium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2526–2530 (2001)
24. Cho YJ, Shin HJ, Bucke C. Purification and biochemical properties of a galactooligosaccharide producing beta-galactosidase from *Bullera singularis*. *Biotechnol. Lett.* 25: 2107–2111 (2003)
25. Yuan S, Xiao M, Sun ZQ, Xin M. Study on trans-galactosylation of  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus* sp. AF. *Food and Ferment. Ind.* 29: 31–34 (2003)
26. Wang H, Xiao M, Li Z, Li Y, Qian X. Screening and identification of  $\beta$ -galactosidase-producing microorganism and enzymatic synthesis of galacto-oligosaccharides using its transgalactosylation. *China J. Shandong Univ.* 41: 133–139 (2006)
27. Lili L, Min X, Xiaodong X. *Enterobacter agglomerans* B1 producing  $\beta$ -galactosidase with transglycosylation activity: screening, identification, fermentation conditions, and galacto-oligosaccharides synthesis. *Acta Microbiol. Sin.* 48: 38–44 (2008)



28. Tzortzis G, Goulas AK, Gibson GR. Synthesis of prebiotic galactooligosaccharides using whole cells of a novel strain, *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171. Appl. Microbiol. Biotechnol. 68: 412–416 (2005)
29. Nakkharat P, Haltrich D. Purification and characterisation of an intracellular enzyme with beta-glucosidase and beta-galactosidase activity from the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus* CBS 236.58. J. Biotechnol. 123: 304–313 (2006)
30. Tzortzis G, Jay AJ, Baillon MLA, Gibson GR, Rastall RA. Synthesis of  $\alpha$ -galactooligosaccharides with  $\alpha$ -galactosidase from *Lactobacillus reuteri* of canine origin. Appl. microbiol. biotechnol. 63: 286–292 (2003)
31. Hu B, Kou L, Li C, Zhu LP, Fan YR, Wu ZW, Wang JJ, Xu GX. *Bifidobacterium longum* as a delivery system of trail and endostatin cooperates with chemotherapeutic drugs to inhibit hypoxic tumor growth. J. Cancer Gene and Cell. Therapies. 16: 655–663 (2009)
32. Chonan O, Watanuki M. Effect of galactooligosaccharides on calcium absorption in rats. Japan J. Nutr. Sci. and Vitaminol. 41: 95–104 (1995)
33. Chonan O, Watanuki M. The effect of 6' galactooligosaccharides on bone mineralization of rats adapted to different levels of dietary calcium. Int. J. Vitam. Nutr. Res. 66: 244–249 (1996)
34. Campbell J M, Fahey G C J, Wolf B W. Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal

short-chain fatty acids, pH and microflora in rats. *British J. Nutr.* 127: 130-136 (1997)

35. Djouzi Z, Andrieux C. Compared effects of three oligosaccharides on metabolism of intestinal microflora in rats inoculated with a human faecal flora. *British J. Nutr.* 78: 313-324 (1997)

## Abstract

The objective of this study is the synthesis of a novel galacto-oligosaccharide (GOS) using crude enzyme extracts of *Bifidobacterium*.

A screening experiment was used to screen *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* RD 47 (RD47) with high  $\alpha$ - and  $\beta$ -galactosidase activity. The optimal medium for the RD47 galactosidase with high activity is a modified MRS medium with 2% raffinose added. Galactose was used as a solid substrate for the synthesis of GOS. The optimal synthesis condition is a pH of 6 and a temperature of 37°C.

This study used Thin-layer chromatography (TLC) to confirm the synthetic results. In the TLC results, four GOS types were synthesized. They are conjectured to be di-galactose, tri-galactose, tert-galactose, and penta-galactose, of which tri-galactose (GOS III) is the major type of GOS produced by RD 47 galactosidase. GOS III was successfully separated using a SPE (Solid phase extraction) tube. Then, 600 MHz NMR (Nuclear Magnetic Resonance) was employed to analyze its structure, which was deduced to be  $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-O- $\alpha$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-O-D-galactopyranose.

**Key words** : Bifidobacterium, galacto-oligosaccharide, Oligosaccharide GOS, Galactose, .

Student number : 2012-22650