

Enterobacter agglomerans TY-25 에 의한 D-Galactose로부터 D-Tagatose의 생산

김상용 · 노희진 · 오덕근^{1*}

동양제과(주) 기술개발연구소, ¹우석대학교 식품공학과

D-Tagatose Production from D-Galactose by *Enterobacter agglomerans* TY-25. Sang-Yong Kim, Hoe-Jin Roh and Deok-Kun Oh^{1*}. Tong Yang Confectionery Co., R&D Center, Seoul 140-715, Korea, ¹Department of Food Science and Technology, Woosuk University, Cheonju 565-800, Korea - A variety of microbial strains isolated from soil were tested for their ability to produce D-tagatose from D-galactose. An organism that can convert D-galactose into D-tagatose was selected and was identified as *Enterobacter agglomerans*. The cells grown on the induction medium containing 20 g/l arabinose were found to be the best conversion potential among different carbohydrates and the conversion yield was about 15% when 20 g/l galactose was used. The isolated crystals were obtained from the culture broth after the purification process such as treatment of ion resins, crystallization, and drying. The recovery yield was 70% after the purification. The crystals were identified as D-tagatose by the infrared spectroscopy, HPLC, specific optical rotation, and melting point.

설탕의 0.92배의 감미도를 지닌 육탄당 tagatose는 설탕과 가장 유사한 물리적, 화학적 성질을 가지고 있다. 또한, tagatose는 체내에 흡수시 거의 대사되지 않아 열량에 기여를 하지 않는 non-caloric sweetener이며, 쥐의 식이 실험에서 설탕 30%투여시 실험 쥐의 중량이 20% 이상 증가한데 비하여 같은 양의 tagatose 투여시 오히려 중량이 15% 감소되는 diet 감미료로서 보고되었다(1). Tagatose는 설탕대체 감미료로서 많이 이용되고 있는 당알코올류(솔비톨, 자일리톨, 말티톨, 이소말트, 락티톨 등) 등이 일정량 이상 섭취시 설사를 유발(laxative effect)하는데 비하여 설사유발의 부작용이 없다는 장점이 있다(2).

자연에서 지의류인 *Sterula setigera*의 gum 성분으로 존재하는 tagatose는 galactose나 galactose의 당 알코올인 dulcitol을 원료로 하여 화학적 방법, 효소적 방법, 미생물을 이용한 발효 방법으로 생산할 수 있다(3).

화학적 방법으로는 lactose를 가수분해하여 나온 저가의 galactose를 calcium 등을 촉매로하여 tagatose-calcium-hydroxide 복합체를 만들어 이성화시켜 tagatose를 생산하고(4), 효소적 방법으로는 D-tagatose-3-epimerase를 이용하여 L-sorbose로부터 생산한 경우와(5) arabinose-ketol-isomerase에 의해서 galactose로부터 생산한 경우(3) 그리고 dulcitol dehydrogenase에 의해서

dulcitol로부터 생산한 보고가 있다(6). 미생물 발효에 의한 tagatose의 생산은 dulcitol을 기질로 하여 *Pseudomonas* sp.(7), *Enterobacter agglomerans*(8), *Arthrobacter globiformis*(9), *Klebsiella pneumoniae*(10), *Mycobacterium smegmatis*(6) 등에서 보고되었다. 유제품인 유청(whey)이나 유당(lactose)에서 유래한 값싼 galactose를 기질로 tagatose를 생산한다면 dulcitol을 기질로 하는 경우보다 더 경제적일 것이다. 그러나, galactose를 사용하여 tagatose를 생산된 것은 *Mycobacterium phlei*와 *Lactobacillus gayonii*에서 보고되었으나 그 수율과 생산성이 매우 낮게 나타나고 있다(3).

그러므로, 본 연구에서는 D-galactose로부터 높은 수율로 D-tagatose를 생산(Fig. 1)하는 균주를 자연으로부터 선별하고 그 균주를 배양하여 배양액으로부터 정제분리한 ketose가 D-tagatose임을 확인하고자 한다.

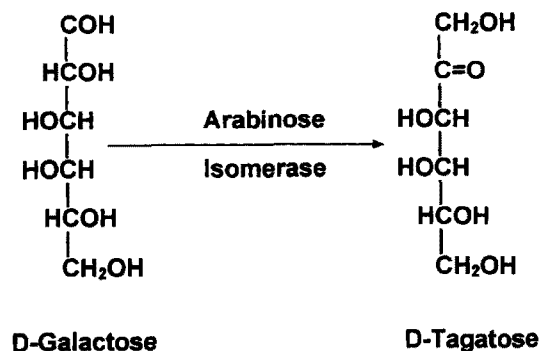


Fig. 1. Isomerization of D-galactose to D-tagatose.

*Corresponding author

Tel. 82-652-290-1632, Fax. 82-652-291-9312

E-mail: deokkun@unitel.co.kr

Key words: D-Tagatose, D-galactose, *Enterobacter agglomerans*

재료 및 방법

균주분리 및 선별

토양으로부터 D-galactose 20 g/l, yeast extract 1.0 g/l, (NH₄)₂SO₄ 2.5 g/l, KH₂PO₄ 2.4 g/l, K₂HPO₄ 5.6 g/l, MgSO₄ · 7H₂O 0.1 g/l, agar 15 g/l가 포함된 plate(7)를 이용하여 30°C에서 빨리 자라는 균주들을 중심으로 single colony로 선별하였고 이들 선별된 균주들을 D-galactose 20 g/l, yeast extract 5.0 g/l, (NH₄)₂SO₄ 5.0 g/l, KH₂PO₄ 5.0 g/l로 구성된 배지에서 24시간 배양한 후에 D-tagatose를 가장 많이 생산한 균을 최종적으로 선별하였다.

분리균주의 동정

균주의 동정은 형태학적, 배양학적 및 생리학적 특성을 조사하여 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(11)의 분류방법에 따라 동정하였다. 동정한 후 균주확인을 위하여 대조균주로 *Enterobacter agglomerans* KCTC 2564를 사용하였다.

미생물 및 배지

토양으로부터 분리하여 TY-25로 명명된 *Enterobacter agglomerans* 균주를 사용하였다. 성장배지로는 1% Trypto-soya broth(TSB) 배지를 사용하였고 induction배지로는 inducer 20 g/l(erythrose, arabinose, ribose, xylose, glucose, galactose, sorbose), yeast extract 5.0 g/l, (NH₄)₂SO₄ 5.0 g/l, KH₂PO₄ 5.0 g/l로 구성된 배지를 사용하였고 D-tagatose 전환배지는 0.05 M phosphate buffer(pH 7.5)에 yeast extract 1.0 g/l가 첨가된 배지이었다.

배양 방법

2% TSB agar에서 자란 *E. agglomerans* TY-25의 single colony를 1% TSB배지 100 ml가 들어있는 500 ml의 플라스크에 접종하여 진탕 배양기에서 240 rpm, 30°C로 8시간 성장시킨 후, 배양액 1 ml를 유도배지 100 ml가 들어있는 500 ml의 플라스크에 접종하여 균체를 170 rpm, 30°C로 약 16시간동안 성장시켰다. 성장된 균체를 5,000×g로 10분간 2회 원심분리하여 세척하고 농축하여 균체의 농도가 600 nm에서 30이 되게 하여 D-tagatose 전환배지에서 D-galactose가 고갈될 때까지 60 rpm, 30°C로 반응시켰다.

Tagatose의 동정

Sigma D-tagatose를 표준물질로 하여 배양액에서 정제한 D-tagatose와 비교하여 동정하였다. 정제한 산물은 HPLC분석, infrared spectroscopy, specific opticales rotation, 및 녹는점으로 동정하였다. 사용한 기기는 carbohy-

drate column(Waters, USA)이 장착된 HPLC(Shimadzu C-R6A, Japan)와 KBr powder를 시약으로 사용된 FT-IR spectrophotometer(MIDAC Co. M series)이었다.

분석방법

D-Galactose와 D-tagatose의 농도는 carbohydrate column(Waters, USA)이 장착된 HPLC(Shimadzu C-R 6A, Japan)의 refractive index detector(Shimadzu RID-6A)를 이용하여 측정하였다. 이때, 용매는 75%(v/v) acetonitrile과 15% 물(v/v)의 혼합용액을 사용하였고, 온도는 30°C이고, 유속은 2.0 ml/min 이었다. 균체농도는 탁도계를 이용하여 600 nm에서 현탁도를 측정하였다.

결과 및 고찰

분리균주의 동정

Table 1. Microbiological characteristics of the isolated strain TY-25

Growth at	5°C~45°C		
	pH 4~8		
Gram reaction	-		
Spore formation	-		
Acid fastness	-		
Indole production	-		
H ₂ S production	-		
Voges-Proskauer test	+		
Methyl red test	+		
Decarboxylases	Ornithine	-	Arginine -
	Lysine	-	
Urease	-		
Oxidase	+		
Catalase	+		
Gelatinase	+		
β-Xylosidase	-		
Assimilation of carbon source			
	D-Glucose	+	D-Galactose +
	Sucrose	+	Dulcitol +
	D-Xylose	+	L-Arabinose +
	Citrate	+	Glycerol +
	D-Rhamnose	+	Erythritol +
	Ribitol	+	Galactitol +
	D-Mannitol	+	Inulin -
Acid production			
	D-Xylose	+	D-Mannitol +
	L-Arabinose	+	Maltose +
	L-Rhamnose	+	Lactose -
	Sucrose	-	myo-Inositol -
	Glycerol	-	Sorbose -
	Sorbitol	-	Raffinose -
Reaction to O ₂	Facultative anaerobes		

분리균주 TY-25의 생리적 특성을 조사한 결과 Table 1과 같았다. 분리한 균주는 40℃까지 생육할 수 있었고 45℃에서는 생육하지 못하였으며 생육 가능한 pH범위는 4에서 8까지 이었다. 효소 활성을 살펴본 결과 decarboxylases, urease, oxidase의 역가는 나타나지 않았지만 catalase와 gelatinase의 활성은 나타났다. 여러 가지 탄소원의 자화능을 조사해본 결과 D-glucose, D-galactose, D-xylose, D-mannitol, L-arabinose, sucrose, citrate, glycerol, D-rhamnose, erythritol, ribitol, galactitol, D-mannitol, dulcitol 등에서는 양성을 나타내었으나 inulin에서는 음성을 나타내었다. D-Xylose, D-mannitol, L-arabinose, maltose, L-rhamnose에서 배양한 경우 산을 생성하였지만 lactose, sucrose, myo-inositol, glycerol, sorbose, sorbitol, raffinose에서는 산을 생성하지 않았다. 이러한 결과로부터 본 균주를 *Enterobacter agglomerans*으로 동정하였다(11). *E. agglomerans* KCTC 2564를 대조균주로 사용하여 동정한 균주가 *E. agglomerans*임을 확인하였다.

Inducer에 의한 tagatose의 생산

여러 가지 inducer가 첨가된 배지에서 증식시킨 균체를 농축하여 전환배지에 첨가하여 14시간동안 배양하여 D-tagatose생산을 시도하였다(Table 2). Carbon 3번과 4번의 OH group이 다른 방향으로 존재하는 화합물인 xylose, glucose 및 sorbose로 induction시킨 경우 tagatose가 생산되지 않았으나 carbon 3번과 4번의 OH group이 같은 방향으로 존재하는 화합물인 erythrose, arabinose 및 ribose로 induction시킨 경우에는 tagatose를 생산되었다. 이것은 galactose를 tagatose로 전환하는데 관여하는 효소인 arabinose-ketol-isomerase는 carbon 3번과 4번의 OH group이 같은 방향으로 존재하는 화합물만 전환할 수 있는 기질 특이성을 갖기 때문이다(2). Galactose 첨가에 의한 induction 효과가 낮게 나타났고 arabinose 첨가에 의한 induction 효과가 높게 나타난 것은 galactose로부터 tagatose를 생산할 때 작용하는 효소가 arabinose-ketol-isomerase이기 때문으로 생각된다.

Arabinose로 induction시킨 균체를 tagatose 전환배지

Table 2. D-Tagatose production of *Enterobacter agglomerans* TY-25 cells grown on different carbohydrate

Carbon source	D-Tagatose (g/l)
Erythrose	2.6
Arabinose	3.0
Ribose	1.8
Xylose	-
Galactose	0.3
Glucose	-
Sorbose	-

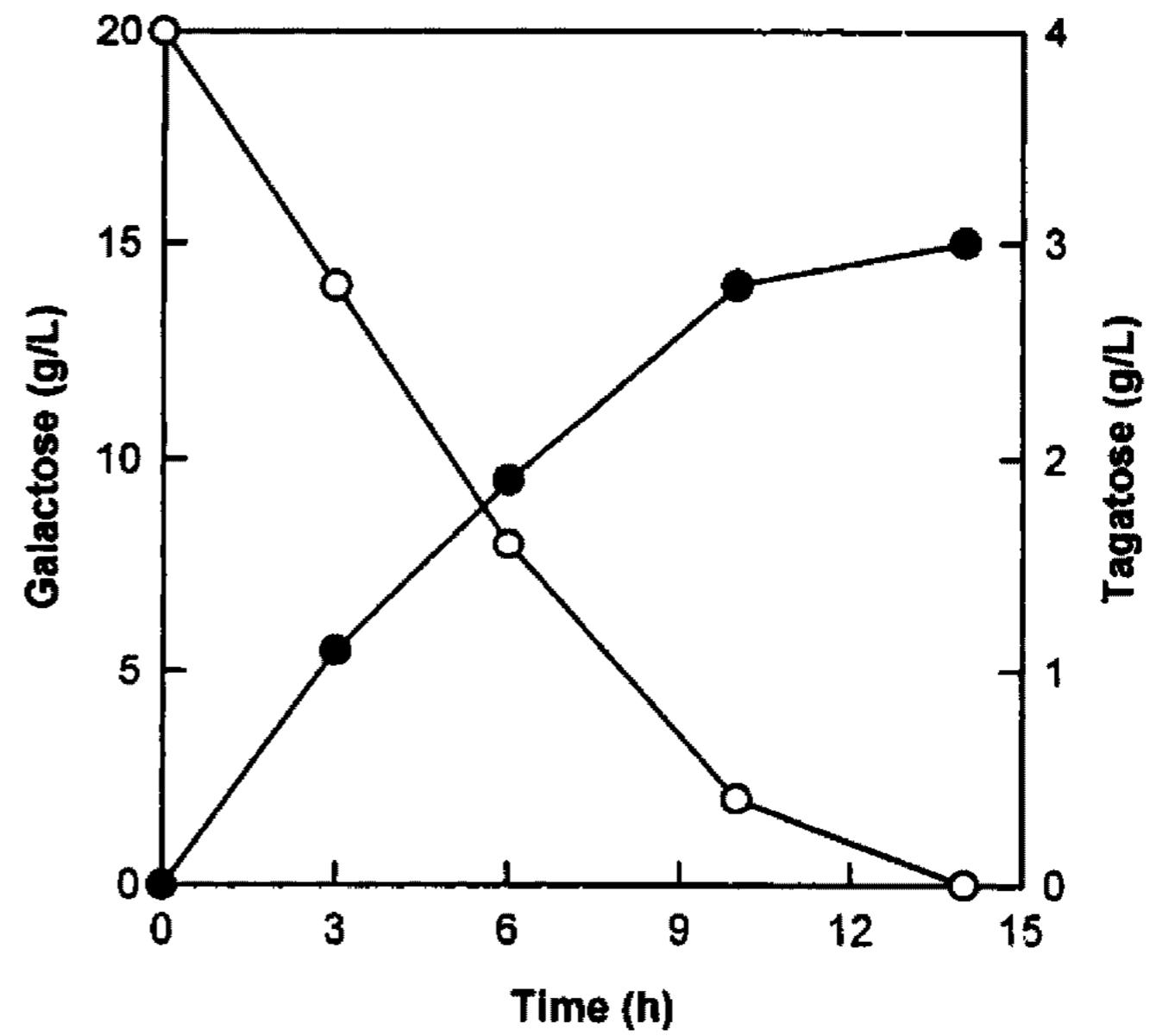


Fig. 2. Conversion of D-galactose to D-tagatose by *Enterobacter agglomerans* TY-25 grown on arabinose. D-Galactose(○) and D-tagatose(●)

에서 galactose로부터 tagatose를 생산되는 과정을 살펴 보았다(Fig. 2). 초기에 첨가해준 20 g/l의 galactose는 배양 14시간에서 모두 고갈되었고 3.0 g/l의 tagatose가 생산되었다. 이것은 전환수율 15%에 해당되는 것이다. Tagatose 전환배지에 yeast extract를 첨가하지 않은 경우에는 전환시간이 오래 걸리고 yeast extract를 고농도로 첨가한 경우에는 전환수율이 감소하기 때문에 배지중 yeast extract 1.0 g/l를 첨가하였다.

지금까지 D-galactose로부터 D-tagatose를 생산한 균들은 *Mycobacterium phleii*와 *Lactobacillus gayonii* 문헌 보고의 전부이다(3). 이들 균주는 D-galactose배지에서 induction을 시킨 후 D-galactose를 첨가하여 D-tagatose로 전환시키는 방법을 사용하였고 그 수율과 생산성이 매우 낮게 나타나고 있다(Table 3). 그러나, 본 연구에서는 arabinose배지에서 induction을 시킨 후 D-galactose를 D-tagatose로 전환시키는 방법을 사용하였고 사용된 *E. agglomerans* TY-25의 D-tagatose의 생산성은 *M. phleii*와 *L. gayonii*의 생산성보다 각각 100배와 200배 이상 높게 나타났다. 또한 수율 역시 이들 균주들보다 각각 7배와 12배 높게 나타났다. 비교실험을 위하여 *E. agglomerans* KCTC 2564를 사용하여 같은 방법으로 D-tagatose 생산을 수행하였다. 그 결과 *E. agglomerans* TY-25와 달리 배양 24시간에 0.1 g/l의 적은량이 생산되어 낮은 생산성을 보여주었다.

본 실험의 의의는 D-galactose로부터 D-tagatose를 생산할 수 있는 새로운 균주인 *E. agglomerans* TY-25를 선별한 것과 선별된 균의 수율과 생산성이 기존의 *E. agglomerans* 및 D-tagatose의 생산이 알려진 다른 균들

Table 3. D-Tagatose production from D-galactose by various microorganisms

Microorganism	Galactose (g/l)	Tagatose (g/l)	$Y_{P/S}^a$ (%)	Q_p^b (g/l-h)	Time (h)	Ref.
<i>Mycobacterium phlei</i> NCIMB 8573	40	0.9	2.25	0.002	504	(2)
<i>Lactobacillus gayonii</i> NCIMB 7230	40	0.5	1.25	0.001	504	(2)
<i>Enterobacter agglomerans</i> TY-25	20	3.0	15.0	0.214	14	this study
<i>Enterobacter agglomerans</i> KCTC 2564	20	0.1	0.50	0.004	24	control

^aTagatose yield from galactose, ^bVolumetric tagatose production rate.

보다 매우 우수하다는 것에 있다고 할 수 있다.

산물의 정제 및 확인

D-Tagatose의 정제 및 확인은 Izumori 등에 의한 방법으로 수행하였다(9). 배양액을 5,000×g로 원심분리하여 균체를 제거하였다. 균체가 제거된 상등액에는 시약 D-tagatose(Sigma, USA)를 표준물질로 하여 HPLC분석을 수행한 결과 D-tagatose로 추정되는 물질이 3.0 g 존재하였다. 이 상등액에 활성탄을 첨가하여 30분간 반응시킨 후 여과하여 활성탄을 제거하여 D-tagatose로 추정되는 물질 2.8 g을 얻었다. 이 용액에 Dowex 50W-X2 (H⁺)와 Dowex 1-X2(CO₃²⁻)의 column을 통과시켜 이온성분을 제거하였다. 이온이 제거된 용액의 D-tagatose로 추정되는 물질의 양은 2.4 g이었다. 이 용액을 40℃에서 진공증발을 점액성 물질이 생길 때까지 하였다. 이 점액성 물질에 99.9% ethanol을 첨가하여 2.2 g의 흰색의 결정을 얻었다. 이 결정을 ethanol로 재결정한 후 desiccator안에 넣고 진공 건조시켜 건조결정을 얻었다. 정제과정을 통하여 20 g/l의 D-galactose 배지 1 l로부터 2.1 g의 건조결정을 얻었다.

건조결정이 D-tagatose임을 증명하기 표준 D-tagatose(Sigma, USA)와 비교하였다. 표준 D-tagatose의 녹는온도는 130~131℃임에 비하여 건조결정의 녹는 온도는 131~132℃을 나타내었다. 비선광도(specific optical rotation)를 측정된 결과 표준 D-tagatose와 건조결정 모두 5.8°를 나타내었다. 건조결정과 표준 D-tagatose를 HPLC로 각각 분석한 결과 모두 동일시간의 peak로 검출되었고 또한 함께 분석한 결과도 동일시간의 peak로 검출되어 건조결정이 D-tagatose임을 확인할 수 있었다. 건조결정의 구조를 알아보기 위하여 infrared spectrum를 살펴보았다(Fig. 3). Infrared spectrum에서는 여러 가지 peak가 검출되었고, 이중 3000~3500 cm⁻¹의 peak는 -OH peak이었고, 2500~3000 cm⁻¹의 peak는 -CH결합의 stretching peak이었고, 1500~2000 cm⁻¹의 peak는 C=O peak로 생각되었으나 D-tagatose가 furan ring이 형성되면서 peak가 작아진 것 같았다. 건조결정의 infrared spectrum과 표준 D-tagatose의 infrared spectrum, HPLC, 비선광도와 녹는점을 비교하

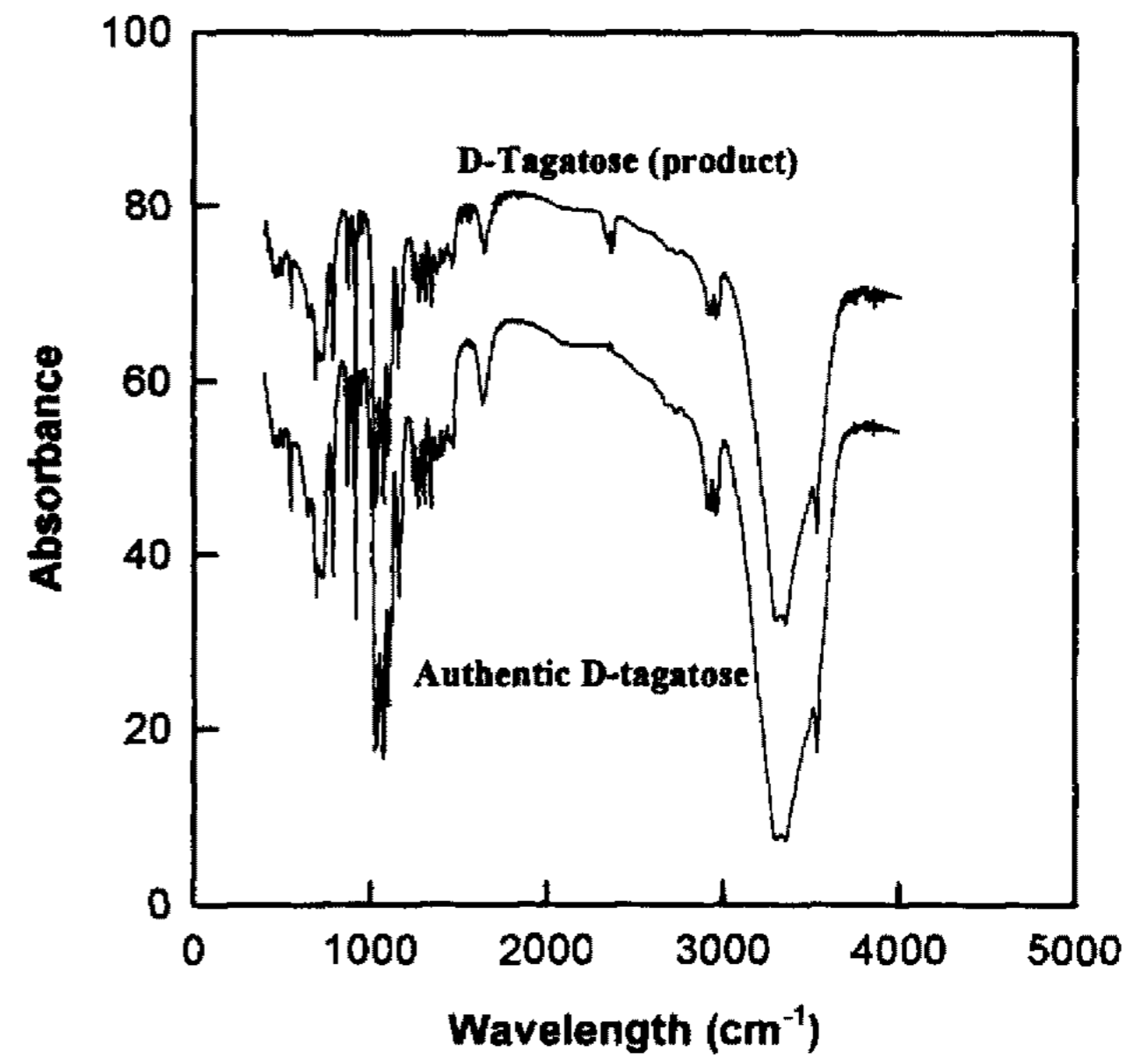


Fig. 3. Infrared spectra of the authentic D-tagatose and the product.

여 건조결정이 D-tagatose임을 증명할 수 있었다.

요 약

토양에서 분리한 많은 균들을 조사하여 D-galactose에서 D-tagatose를 전환하는 능력을 지닌 TY-25 균주를 분리하여 동정한 결과 *Enterobacter agglomerans*로 확인할 수 있었다. Inducer로 사용한 여러 가지 탄소원중 arabinose의 배지에서 자란 균체가 전환능력이 가장 좋았고, 이 균체를 20 g/l galactose 배지에 접종하여 배양한 결과 전환수율은 15%이었다. 배양액을 이온수지의 처리, 결정과 진공건조의 정제과정을 통하여 백색결정을 얻었다. 이 결정을 infrared spectrum과 HPLC의 비교 분석을 통하여 D-tagatose임을 증명하였다.

참고문헌

1. Mazur, A. W. 1989. Functional sugar substitutes with

- reduced calories. *Eur. Patent* 0341062A2.
2. Zehener L. R. 1988. D-Tagatose as a low-calories carbohydrates sweeteners and bulking agent. *Eur. Patent* 257626 (*US Patent* 4,786,722).
 3. Cheetham, P. S. J. and A. N. Wootton 1993. Bioconversion of D-galactose into D-tagatose. *Enzyme Microb. Technol.* **15**: 105-107.
 4. Beadle, J. R., J. P. Sauders and T. J. J. Wajda 1991. Process for manufacturing tagatose. *US Patent* 5,002, 612.
 5. Itoh, H., T. Sato, T. Takeuchi, A. R. Khan and K. Izumori 1995. Preparation of D-sorbose from D-tagatose by immobilized D-tagatose-3-epimerase. *J. Ferment. Bioeng.* **79**: 184-187.
 6. Izumori, K. and K. Tsuzaki 1988. Production of D-tagatose from D-galactitol by *Mycobacterium smegmatis*. *J. Ferment. Technol.* **66**: 225-227.
 7. Itoh, H., H. Okaya, A. R. Khan, S. Tajima, S. Hayakawa and K. Izumori 1994. Purification and characterization of D-tagatose-3-epimerase from *Pseudomonas* sp. ST-24. *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**: 2168-2171.
 8. Muniruzzaman, S., H. Tokunaga and K. Izumori 1994. Isolation of *Enterobacter agglomerans* strain 221E from soil, a patent D-tagatose producer from galacitol. *J. Ferment. Bioeng.* **78**: 145-148.
 9. Izumori, K., T. Miyoshi., S. Tokuda and K. Yamabe 1984. Production of D-tagatose from ducitol by *Arthrobacter globiformis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**: 1055-1057.
 10. Shimonishi, T., Y. Okumura and K. Izumori 1995. Production of L-tagatose from galactitol by *Klebsiella pneumoniae* strain 40b. *J. Ferment. Bioeng.* **79**: 620-622.
 11. Sneath, P. H. 1986. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 2. Willams and Wilkins Co., Baltimore.

(Received 28 March 1997)