

갈락토올리고당 생산 효모 *Bullera singularis*의 최적 배양조건

신현재 · 박오진 · 양지원*
한국과학기술원 화학공학과

Optimum Culture Condition of *Bullera singularis* for Galactooligosaccharide Production

Hyun-Jae Shin, Oh-Jin Park and Ji-Won Yang*

Department of Chemical Engineering, KAIST, Kusung-dong, Yuseong-gu, Taejeon 305-701, Korea

Abstract — The cultural conditions of *Bullera singularis* were optimized for the efficient production of galactooligosaccharide (GOS). Optimum temperature was 25°C, pH was 6.0, inoculum size was over 5% (v/v), initial lactose concentration was over 5% (w/v). The GOS production increased with microbial growth. Maximum amount of 72% (w/w) GOS was obtained from the optimized medium (5% lactose and 0.75% yeast extract) in 70 hours. Seven types of GOS (3 of dimer, 2 of trimer, 1 of tetramer, and 1 of pentamer) were identified by two-dimensional TLC. A new mechanism of GOS production is proposed based on the metabolism of carbon source.

갈락토올리고당(Galactooligosaccharide, GOS)은 일 반식이 Gal-(Gal)_n-Glc(n=1-5)로 표시되는 기능성 올리고당으로서 최근 그 효용성이 주목을 받고 있다. 갈락토올리고당을 비롯한 기능성 올리고당을 섭취함으로써 얻게 되는 건강상의 이득은 장내유해균의 성장억제 및 비피더스균의 성장촉진, 설사억제, 변비에 방, 간기능 보호, 혈압의 하강, 항암효과와 영양분의 생산 등이 있으며, 한편 섭취시 발생하는 부작용은 일시적인 더부룩함 정도이다(1). 갈락토올리고당은 식품에 사용되는 용도 이외에도 화장품에 비롯한 여러 산업에 이용될 수 있는 가능성을 지닌 기능성 물질이다. 갈락토올리고당을 생산하는 방법은 크게 효소에 의한 방법과 미생물배양을 통한 생산으로 나눌 수 있으며 특별한 구조를 지닌 올리고당이 목적일 경우에는 화학적으로 합성하기도 한다. 효소에 의한 생산은 β-galactosidase의 역가수분해반응 활성화 혹은 갈락토실기 전이효소(galactosyl transferase)의 전이 활성을 이용하는 것으로 이미 여러종류의 효소가 분리되어 있다(2-7). 미생물 배양에 의한 갈락토올리고당의 생산은 효소의 정제없이 발효중에 올리고당을 생산할 수 있으며 효소를 이용한 합성에 비하여 부

산물의 생산이 적다는 장점이 있다. 효소에 의한 갈락토올리고당 생산과 미생물에 의한 생산 사이의 경제성을 단순히 비교하는 것은 힘들지만 적절한 효소원을 확보하지 못했을 경우는 미생물에 의한 배양법이 우선 고려될 수 있다. 갈락토올리고당의 생산에 사용되는 대표적인 미생물로는 *Bifidobacterium bifidum*, *Bullera singularis*(구 *Sporobolomyces singularis*), *Cryptococcus laurentii* OKN-4, *Enterobacter* sp., *Trichoderma harzianum*, *Penicillium chrysogenum* 등이 보고되어 있다(8-13). *Bullera singularis*는 *Tsuga heterophylla*라는 학명을 지닌 western hemlock에서 서식하는 곰팡이의 분변에서 분리된 효모(yeast)로서 yeast nitrogen base 배지에서 배양할 경우, 배지내의 유당(lactose)에서 포도당(glucose)만을 이용하고 갈락토스(galactose)는 이용하지 못하고 다른 당으로 전이시키는 특징을 지니고 있다(9). 문헌에 보고된 바에 따르면 *B. singularis*가 다른 균주와 비교하여 가장 높은 갈락토올리고당의 생산능을 나타낸다(Table 1)(9, 14). 그러나 *B. singularis* 최적 성장조건 및 성장과 올리고당 생산과의 관계에 대해서는 아직 체계적인 연구가 이루어지지 못하고 있다.

그러므로 본 연구는 경제적인 갈락토올리고당 생산을 위하여 필요한 미생물의 최적 성장조건의 확립 및 미생물의 성장과 올리고당 성장 사이의 관계를 규명하는 것을 그 목적으로 삼았다. 또한 기질의 농

Key words: *Bullera singularis*, cultivation optimization, galactooligosaccharide, oligosaccharide production

*Corresponding author

Table 1. GOS production by various microorganisms

| Strain | GOS % ^a | linkage ^b | media | reference |
|-------------------------------------|--------------------|----------------------|--|-----------|
| <i>Bifidobacterium bifidum</i> | 15< | β -1,3 | acetate buffer containing lactose | (8) |
| <i>Bullera singularis</i> | 50 | β -1,4 | 10% lactose, 0.75% yeast extract | (9) |
| <i>Cryptococcus laurentii</i> OKN-4 | 47 | β -1,4 | 10% lactose, 1.2% sodium phosphate 2% ammonium chloride 0.2% yeast extract | (10) |
| <i>Enterobacter</i> sp. | 23 | β -1,6 | 1% lactose, 1% peptone 0.5% NaCl, 0.1% beef extract | (11) |
| <i>Penicillium chrysogenum</i> | 10< | — | corn-steep media (5% lactose) | (12) |
| <i>Trichoderma harzinum</i> | 32 | β -1,6 | 15% lactose, 0.5% whey 0.25% ammonium nitrate 0.025% ammonium chloride | (13) |

도와 배양액의 pH, 배양 온도 등의 변화에 따른 미생물의 성장 및 올리고당 생산특성을 고찰하였다.

재료 및 방법

시약 및 재료

미생물 배양용 배지는 Difco사에서 구입한 galactose와 yeast extract를 사용하였으며 유당은 일본 TCI사의 것을 사용하였다. 분석에 사용한 용매는 Merck사의 것을, 당류 동정을 위한 기준물질은 Sigma사에서 구입한 것과 일본 Daiwa Kasei KK사에서 공급받은 갈락토올리고당 시료를 사용하였다. 그 외의 분석시약은 모두 특급시약을 사용하였다.

미생물배양 및 올리고당 합성

Bullera singularis ATCC 24193을 5%(w/v) 유당이 첨가된 yeast nitrogen base(Difco사) 배지를 제조원의 방법에 따라 준비하여 일주일간 배양하였다. 배양부피는 50 ml이었으며 shaking speed는 250 rpm, 온도는 25°C였다(14). 일주일간 배양한 미생물 5 ml를 새로운 배지에 접종하여 계대배양하였다. 올리고당의 합성을 위한 배지는 0.75%(w/v)의 yeast extract와 5%의 유당을 첨가한 배지의 pH를 3에서 7 사이의 값으로 조절한 후 121°C에서 15분간 멸균하여 사용하였다. 배양조건은 상술한 조건과 동일하였으며 최고 일주일간 배양하였다. 미생물의 성장은 Hewlett Packard사의 spectrophotometer(HP 8452A)를 이용하여 600 nm에서 흡광도를 측정함으로써 미생물의

상대적인 농도로 표시하였다. 미생물의 비증식속도는 시간에 따른 배양액의 흡광도를 측정하여 log(흡광도)의 변화율/시간의 변화율인 기울기로 나타내었다.

박층크로마토그래피(Thin Layer Chromatography, TLC)

Merck사의 TLC plate(Kieselgel 60, 20 by 20 cm)를 사용하였으며, developing solvent의 조성은 pyridine : *n*-butanol : water가 6 : 2.5 : 1.5였다. 1회 전개하는 시간은 1시간이었으며 3회 내지 5회 전개하여 anisaldehyde 용액을 뿌린 후 120°C에서 진한 갈색 spot이 성장될 때까지 가열하였다. 기준시료의 R_f 값과 성장된 올리고당의 R_f 값을 비교하여 올리고당의 크기(number of galactose moiety)를 추정하였다.

고속액체크로마토그래프(HPLC)

반응중에 성장된 당류는 Waters사의 Sugar pakI column이 장착된 HPLC system(501 pump, 401 Differential Refractometer)을 이용하여 분석하였다. 이동상은 고순도 증류수에 Ca-EDTA를 50 mg/l 농도로 첨가하여 사용하였으며, 유속은 0.5 ml/min, 컬럼의 온도는 90°C로 유지하였고 1회 분석에 소요된 시간은 25분이었다. Sugar pakI 컬럼은 양이온교환수지컬럼으로 이당류 이성질체의 분리가 되지 않아 본 실험에서는 이당류를 제외한 3당 이상을 갈락토올리고당으로 간주하였다. 당류의 분획별 체류시간은 4당 6.6분, 3당 7.3분, 유당 8.4분, 포도당 10분, galactose 11.1분이었으며 허용오차는 0.5%였다.

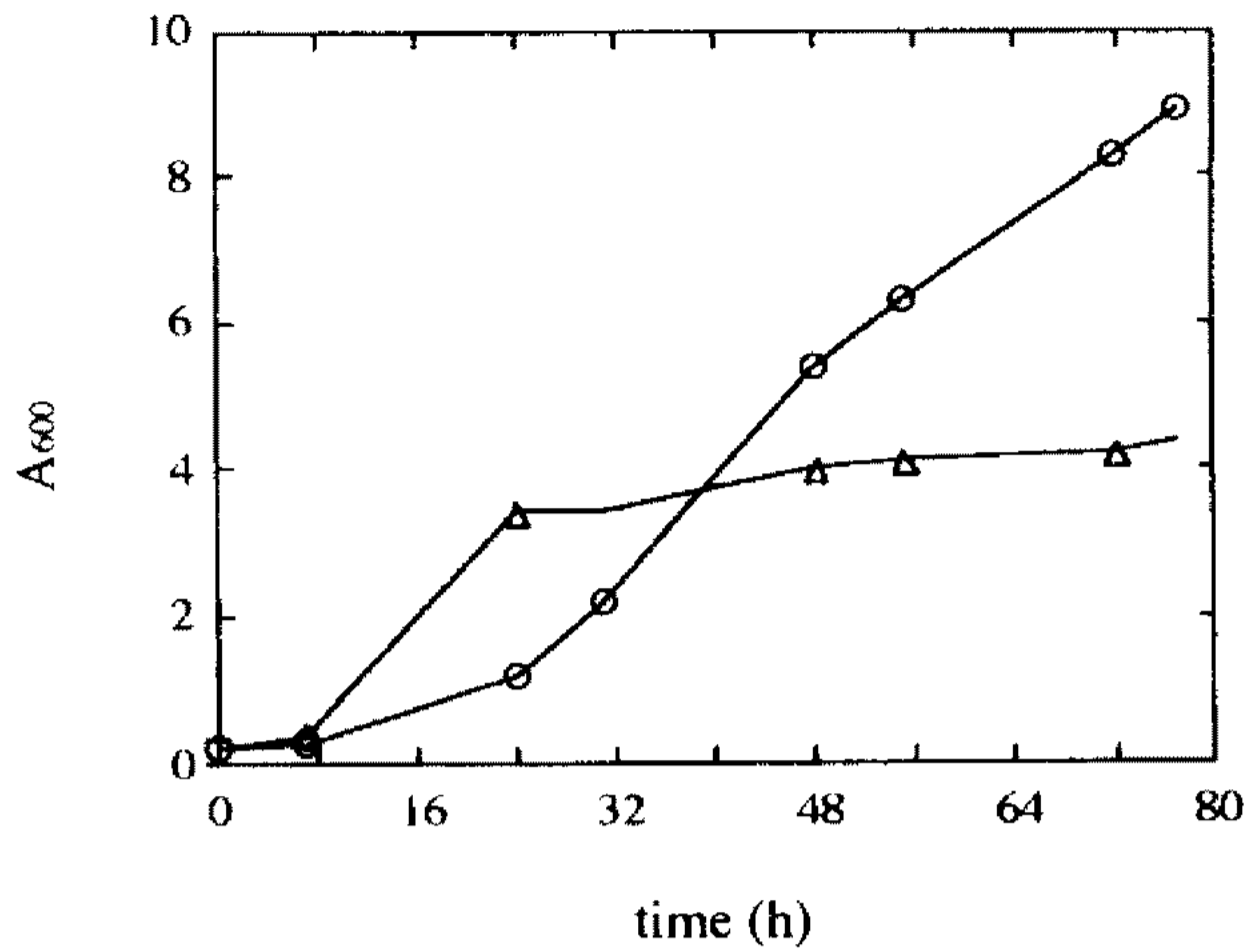


Fig. 1. Effect of temperature on the growth of *B. singularis*.
○: 25°C, △: 40°C

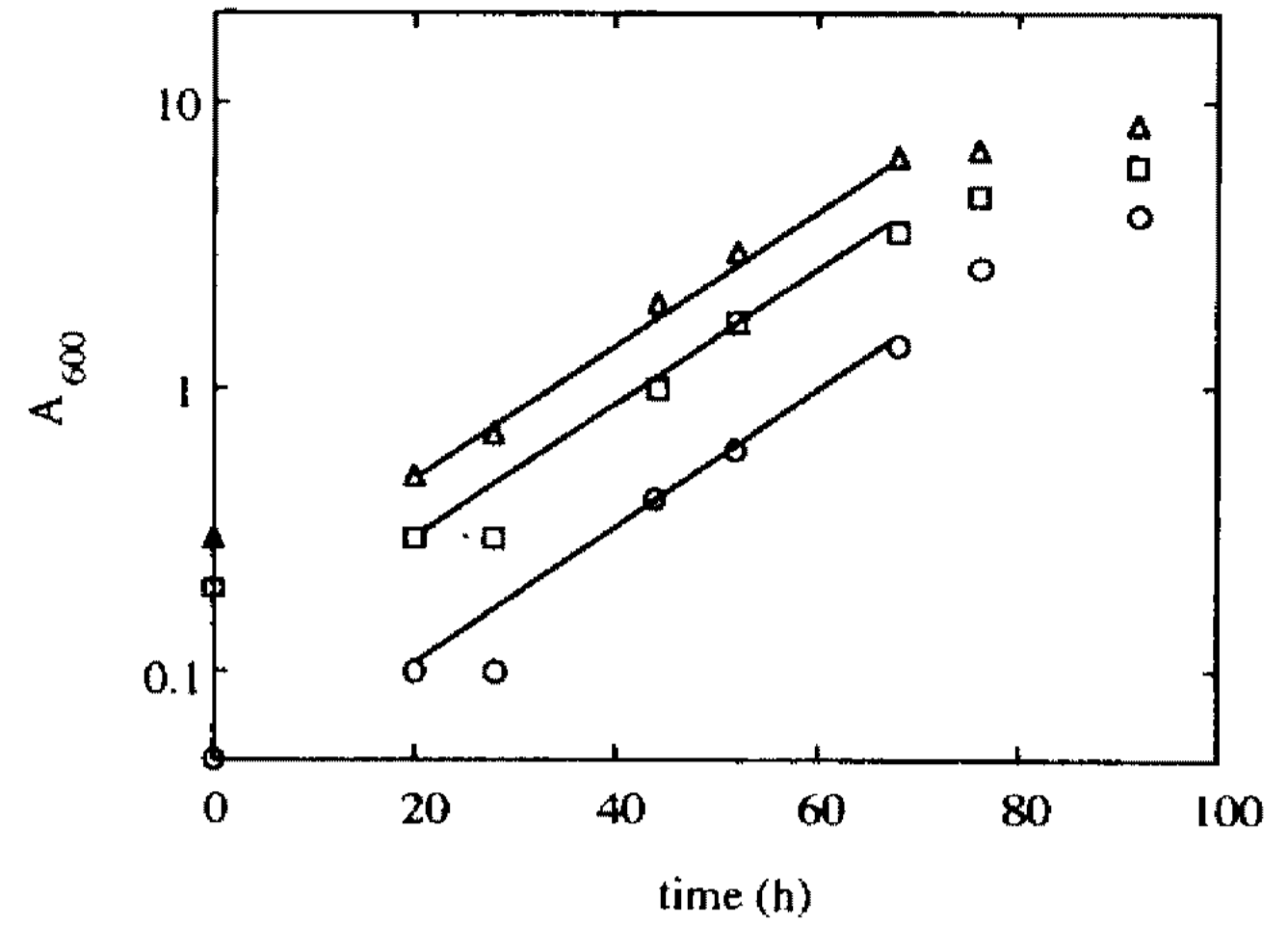


Fig. 3. Effect of inoculum size on the growth of *B. singularis*.
△: 10%, □: 5%, ○: 1%

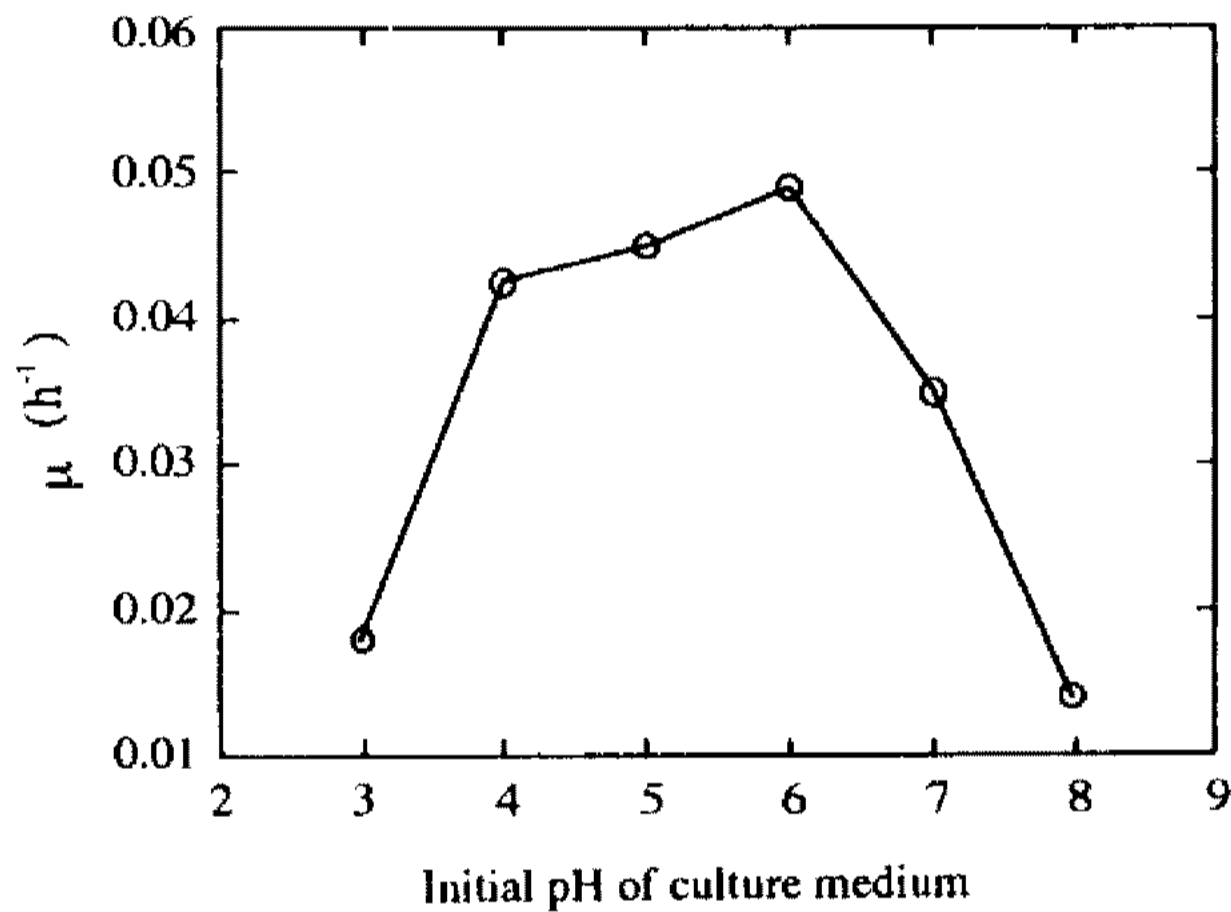


Fig. 2. Effect of medium pH on specific growth rate of *B. singularis*.

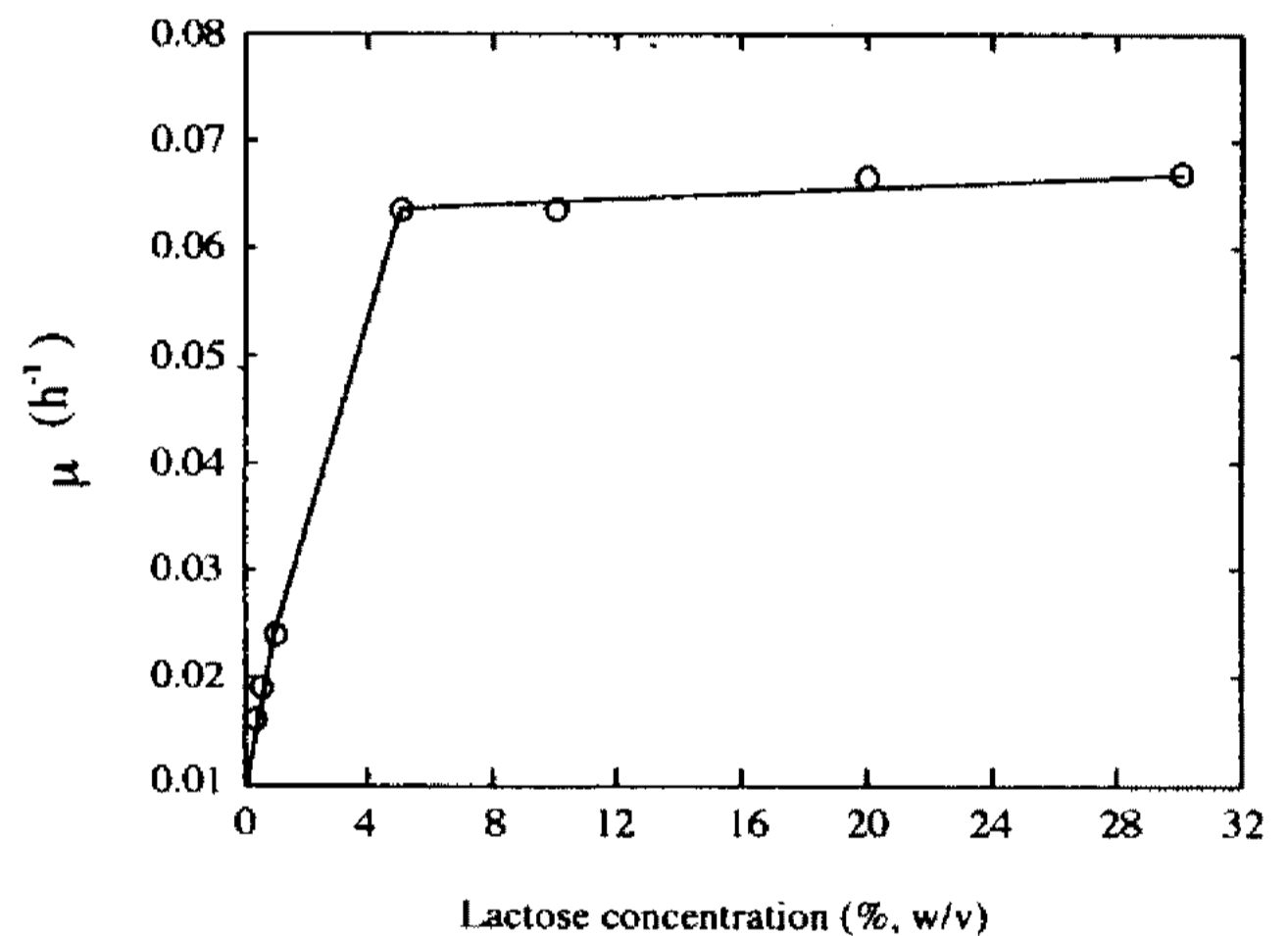


Fig. 4. Effect of initial substrate concentration on the specific growth rate of *B. singularis*

결과 및 고찰

온도, pH, 초기 접종농도의 영향

*B. singularis*는 25°C에서 가장 빠른 성장을 보였으며(Fig. 1), 온도가 40°C로 올라가면 초기의 성장속도는 빨랐으나 전체적인 성장이 그 한계치에 빨리 도달하는 것이 관찰되었다. 이 까닭은 미생물이 분리된 지역이 온도가 낮은 침엽수림 지대이기 때문인 것으로 사료된다(14). 미생물의 초기 접종농도가 새로운 배지의 부피 기준으로 1%(v/v)일 경우에, pH 6.0에서 가장 높은 성장률을 나타내었다(Fig. 2). Fig. 3은 pH를 6.0으로 고정시키고 초기 접종농도를 변화시켜가면서 미생물의 성장을 관찰한 것인데, 초기 접종농도가 증가할 수록 최종 미생물 농도는 증가하였으나 비증식속도는 일정한 값을 유지함을 알 수 있었다.

한편, *B. singularis*는 산소요구성이 매우 큰 호기성 효모이므로 플라스크배양의 경우는 shaker의 회전속도를 250 rpm 이상으로 유지하였다.

초기 유당농도의 영향

미생물 성장의 최적 유당농도를 확인하기 위하여 배지내의 초기 유당농도를 변화시켜가면서 미생물의 비증식속도를 관찰하였다. 유당농도 5%(w/v)까지는 유당농도에 따라서 비증식속도가 선형적으로 증가하였으며 그 이상에서는 일정한 값을 유지하는 경향을 나타내었다(Fig. 4). 유당농도가 5%(w/v) 이상일 경우, 비증식속도는 일정하였으나 최종 미생물농도는 계속 증가하는 경향을 보였다. 올리고당의 대량생산을 고려한다면 반응기내의 미생물의 농도가 중요한 변수가 되므로 5% 이상의 높은 기질농도를 유지하는 것이

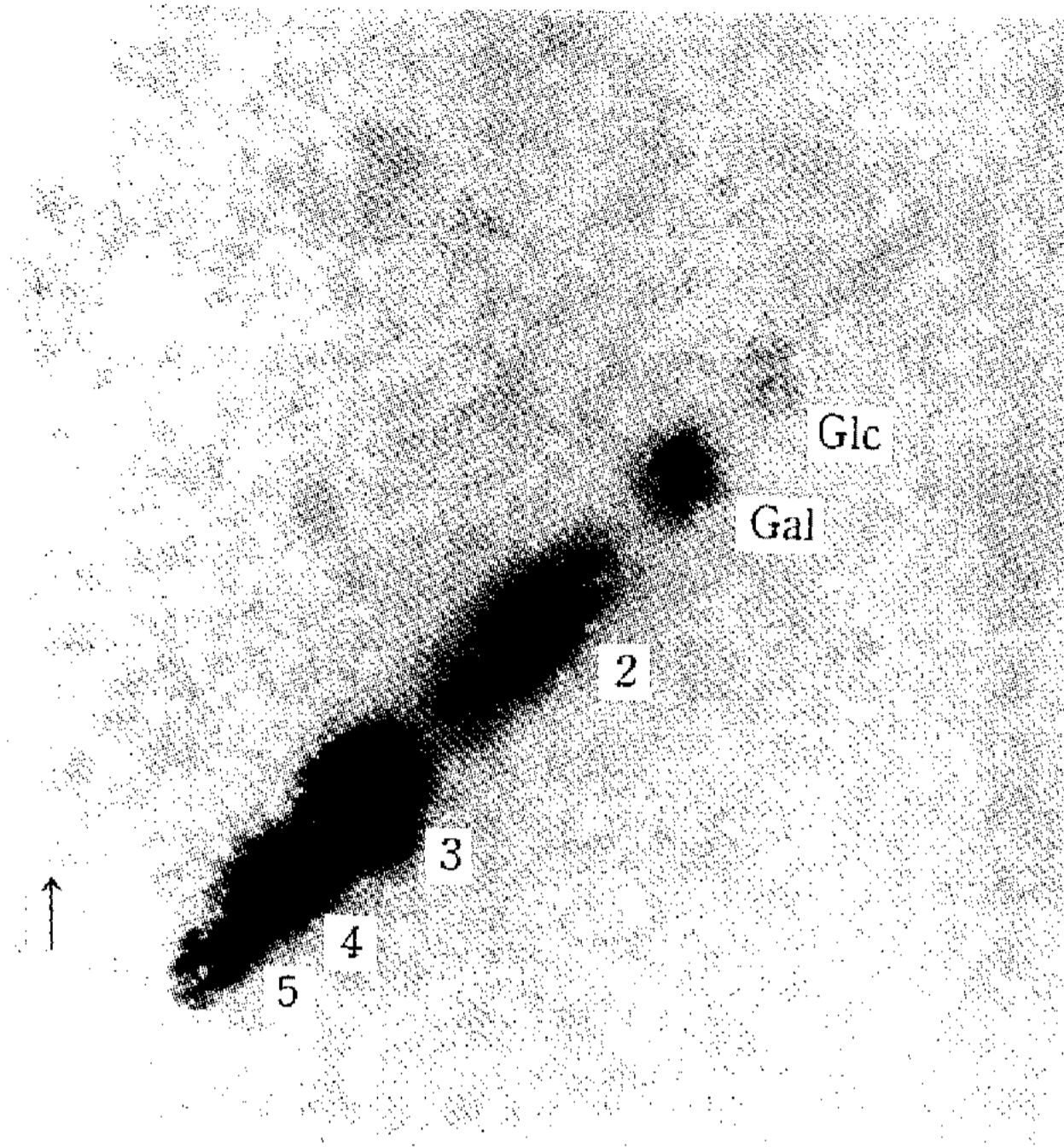


Fig. 5. 2-dimensional TLC chromatogram of culture broth after 80 hr-cultivation.

Numbers indicate the size of GOS (5: pentamer, 4: tetramer, and so on)

유리하리라 사료된다.

성장된 올리고당의 확인

미생물이 생산하는 올리고당의 종류를 알아보기 위하여 2차원 TLC를 사용하였다. 기준물질의 2차원 TLC의 값과 비교하여 성장된 spot의 올리고당 크기를 짐작하였다. 성장된 갈락토올리고당은 2당류가 세가지, 3당이 두가지 그리고 4당과 5당이 각 한가지로 추측된다(Fig. 5). Gorin 등(14)은 *B. singularis*가 생산하는 올리고당을 paper chromatography와 carbon cellite column chromatography를 이용하여 3당 두가지와 4당 한가지만을 분리하였다. 배양시간에 따라서 생산되는 올리고당의 비율이 달라졌으며 배양시간이 길수록 4당 이상의 올리고당 함량이 높아졌다 (data not shown). 시간에 따른 올리고당의 증가 경향을 HPLC chromatogram으로 Fig. 6에 나타내었다.

미생물의 성장과 올리고당 성장

최적 성장조건하에서 *B. singularis*를 5%(w/v) 유당과 0.75% yeast extract가 함유된 배지에서 배양하였다. 25°C에서 80시간 배양한 결과, 미생물의 성장과 갈락토올리고당의 성장은 비례하였으며 배지내의 pH는 점차 감소하여 배양 70시간 후에 4.5까지 감소하였다(Fig. 7). 배양 70시간 후의 올리고당 생산은 배지내의 고형당을 기준으로 72%에 육박하였다.

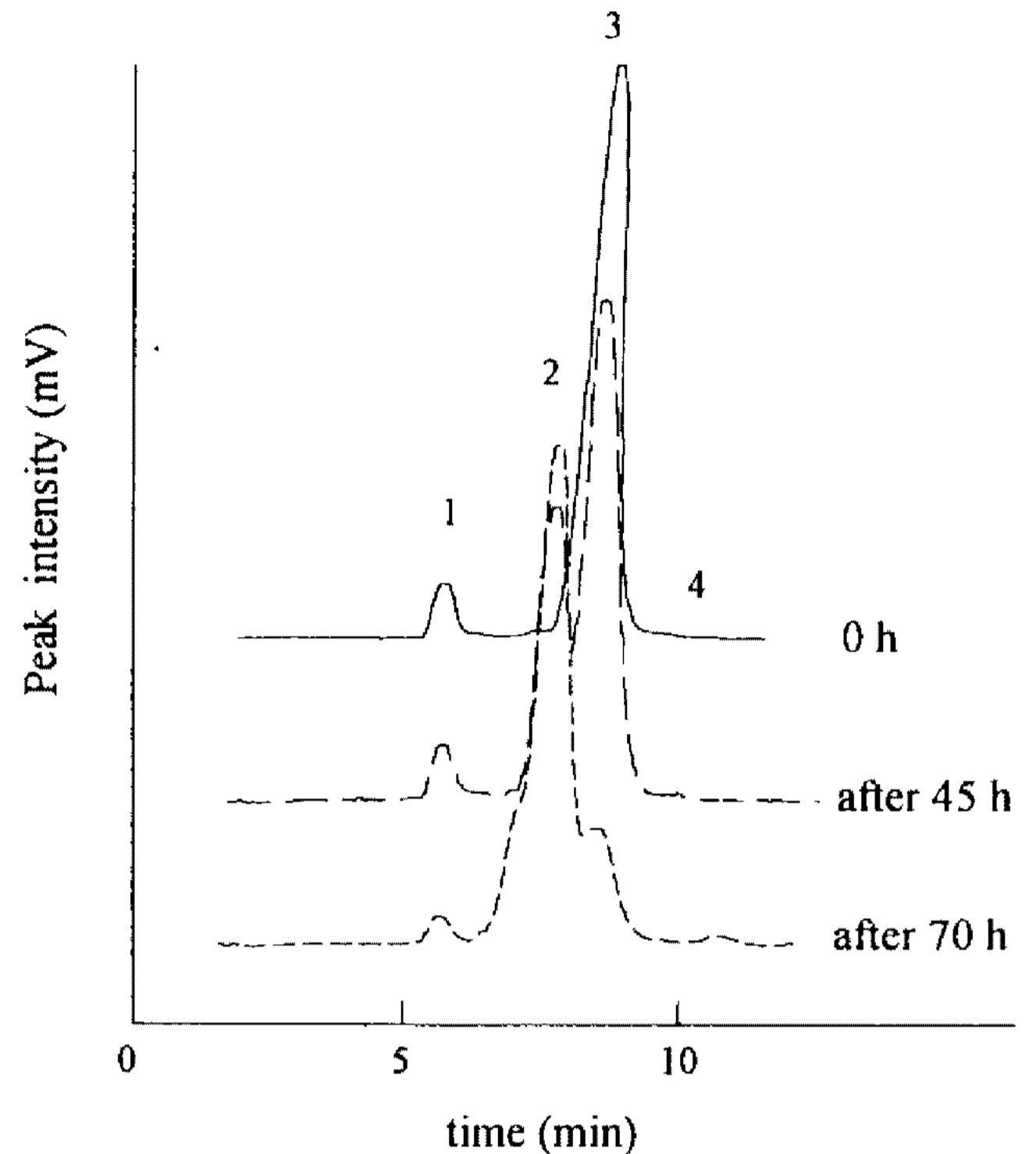


Fig. 6. HPLC chromatogram of culture broth with time.

1: buffer, 2: trimer (GOS), 3: lactose, 4: galactose

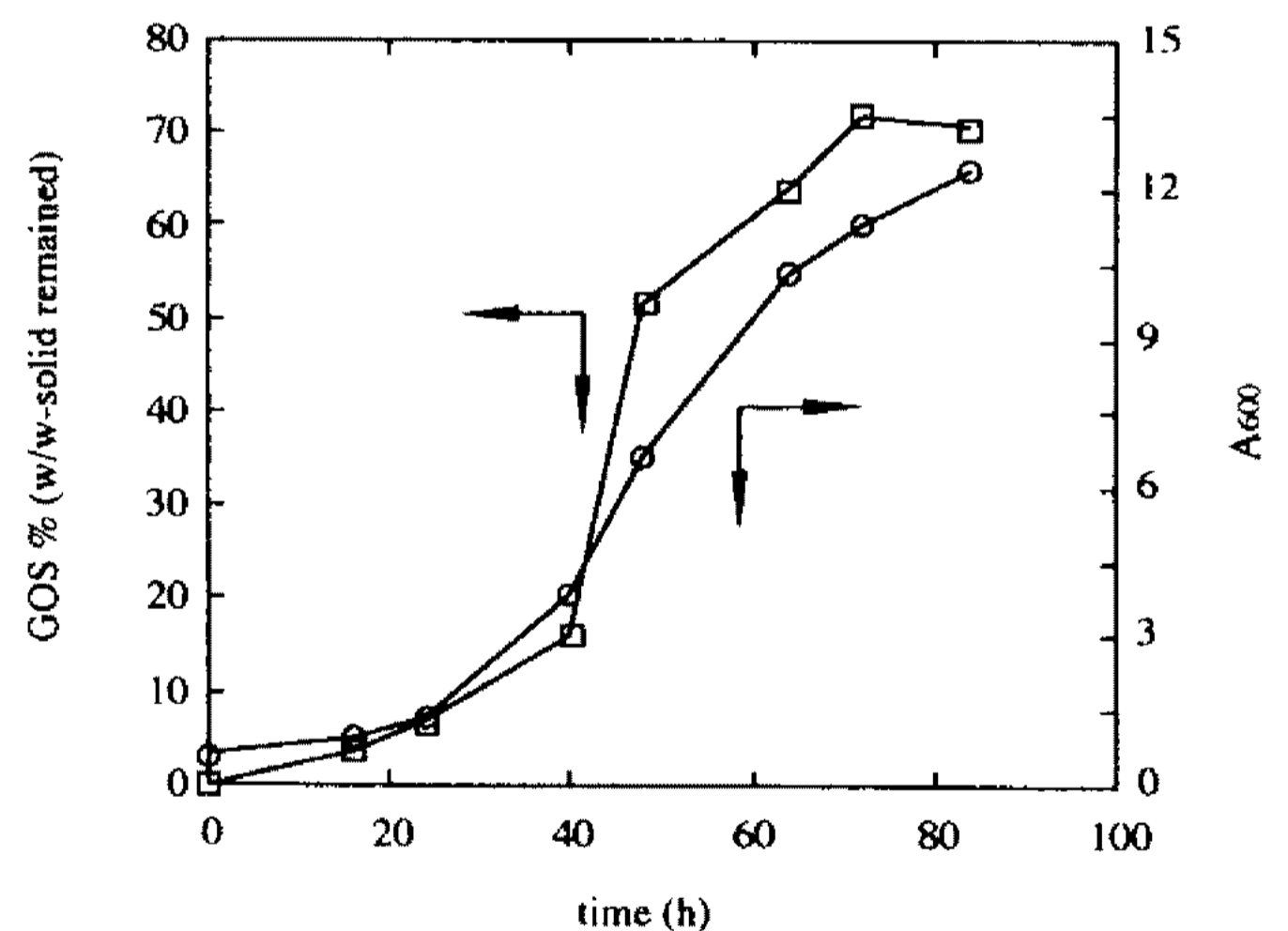


Fig. 7. Time course of cell growth and GOS production by *B. singularis*.

○: absorbance, □: GOS %

한편, *Bacillus circulans*-2에서 유래한 효소를 이용하여 생산된 갈락토올리고당 수율은 고형분을 기준으로 41%였으며, 반응매질(reaction media)를 유기용매로 변경하였을 경우 최고 45%의 수율이 보고되어 있다(4, 15). 이처럼 *B. singularis*에 의한 올리고당의 생산량이 효소반응의 그것보다 높은 이유는 이 미생물이 당을 대사하는 특별한 메커니즘을 가지고 있기 때문으로 풀이된다. 탄소원의 이용성을 조사하기 위

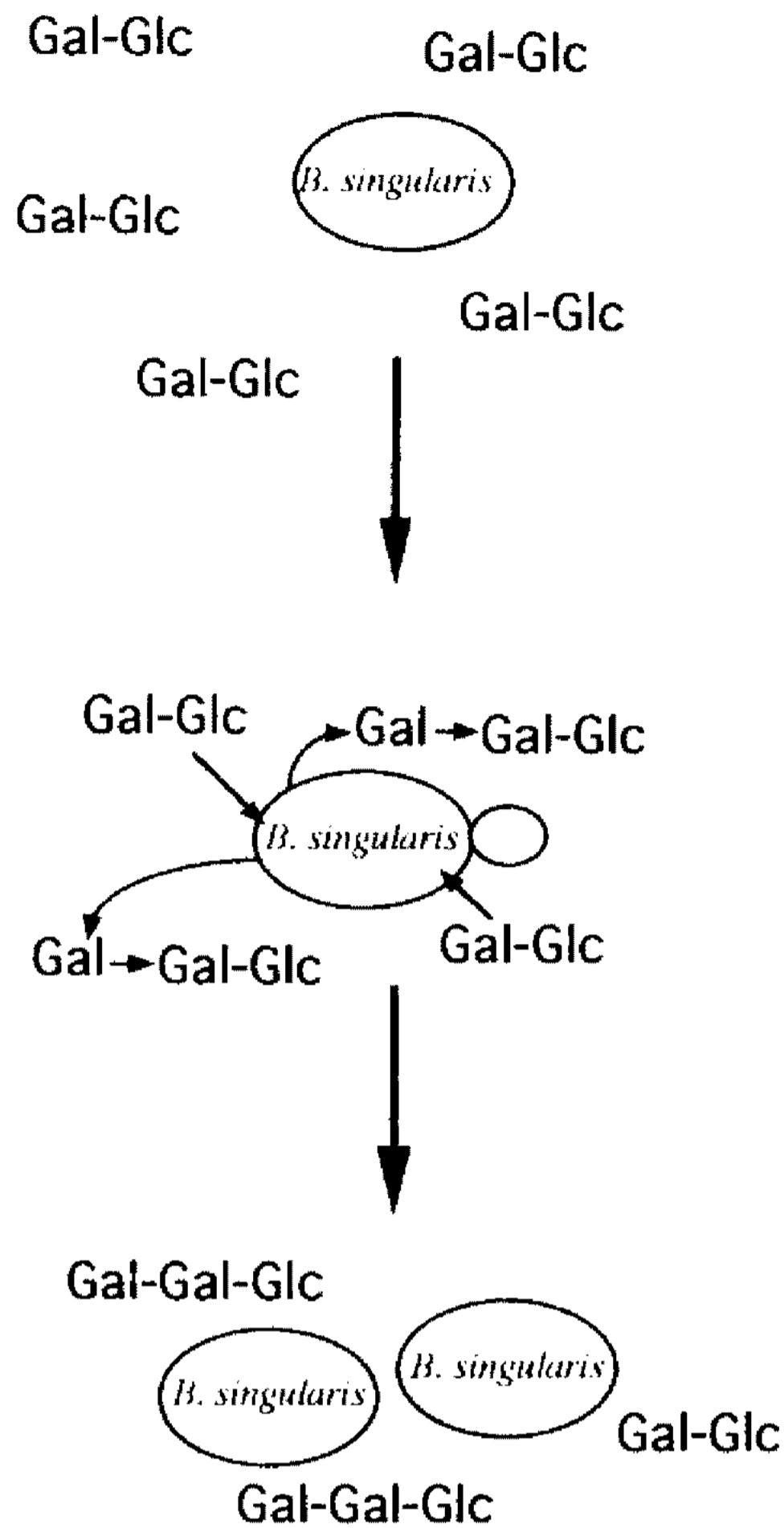


Fig. 8. Proposed mechanism of GOS production by *B. singularis*.

하여 배지내에 동일한 몰수의 유당과 포도당을 넣어 배양한 결과, 두 경우가 동일한 성장률 및 최고 성장치를 나타내었다. 탄소원으로 galactose만을 넣을 경우는 미생물의 성장이 매우 저해되었으며 올리고당의 생성도 관찰되지 못했다. 한편, 효소의 활성을 살펴보면, 배양액의 효소활성(o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside를 기질로 사용함)은 관찰되지 않았으며 미생물의 내부에서만 효소의 활성이 관찰되었다(data not shown). 이상의 결과를 정리하면, *B. singularis*는 미생물 내부에서 유당을 분해하여 포도당만을 탄소원으로 사용하고 galactose는 세포밖으로 방출한 후 다른 미분해 유당으로 전이하는 과정을 반복하는 것으로 보여진다(Fig. 8). 그러므로 이론적으로는 충분한 시간이 지나면 배지내에 갈락토올리고당만이 잔류하게 되는데, 실제의 경우는 그렇지 않다. 배지내의 유당이 고갈되면 성장된 올리고당을 다시 분해하여 탄소원으로 사용하기 때문이다. 한편 갈락토실기 전이 반응에 관여하는 효소는 membrane-bound 임이 알려져 있으나(9), cytoplasmic area에 존재하는지 peri-

plasmic area에 존재하는지는 현재까지 밝혀져 있지 않다. 일반적으로 *B. singularis*는 pH 6 부근에서 성장은 활발하게 이루어지지만 올리고당의 성장은 이루어지지 않는다고 알려져 있었으나 본 연구를 통하여 이 사실이 오류임을 실험적으로 증명하였다. 결론적으로 *B. singularis* 성장과 올리고당의 생산은 밀접한 비례관계가 있었으며 성장된 올리고당은 미생물이 쉽게 대사과정에 이용하지 못하였다.

요 약

갈락토올리고당 생산 효모인 *Bullera singularis*의 배양조건을 최적화 하였다. 최적 배양온도는 25°C, pH는 6.0, 초기 접종농도 5%(v/v) 이상, 초기 유당 농도 5%(v/w) 이상이었다. 미생물의 성장과 갈락토올리고당의 생산은 비례하였으며 5% 유당과 0.75% yeast extract를 함유한 배지에서 배양할 경우 배양 70시간만에 배지내에 고형분 기준으로 72%의 갈락토올리고당을 생산할 수 있었다. 생산된 올리고당은 2당류 3가지, 3당류 2가지, 4당과 5당이 각기 한가지씩이었으며, 탄소원의 대사작용을 고려하여 *B. singularis*에 의한 갈락토올리고당 생산 메카니즘을 새로이 제안하였다.

감사의 말

본 연구는 1995년 선도기술개발과제(G7 project)의 일부로 진행되었으며 과학기술처와 (주)미원의 연구비 지원에 감사드립니다. 또한 본 연구의 미생물배양과 당분석에 도움을 준 전진숙씨에게 감사드립니다.

참고문헌

1. Tomomatsu, H. 1994. Health effects of oligosaccharides. *Food Technol. Oct*: 61-65.
2. Pazur, J.H. 1953. The enzymatic conversion of lactose into galactosyl oligosaccharide. *Science* **177**: 355-356.
3. Nakanishi, K., R. Matsuno, K. Torii, K. Yamamoto, and T. Kamikubo. 1983. Properties of immobilized β-D-galactosidase from *Bacillus circulans*. *Enzyme Microb. Technol.* **5**: 115-120.
4. Prenosil, J.E., E. Stuker, and J.R. Bourne. 1987. Formation of oligosaccharides during enzymatic lactose: part I: state of art. *Biotechnol. Bioeng.* **30**: 1019-1025.
5. Ohtsuka, K., A. Kanoh, O. Ozawa, T. Kanematsu, T. Uchida, and R. Shinke. 1990. Purification and

- Properties of a β -galactosidase with high galactosyl transfer activity from *Cryptococcus laurentii* OKN-4. *J. Ferment. Bioeng.* **70**: 301-307.
6. Yun, J.W., T.K. Yoon, S.B. Han, and S.K. Song. 1994. Oligosaccharide formation and production of transfructosylase and transglucosylase by *Aureobasidium pullulans*. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **9**: 133-139.
 7. Nakao, M., M. Harada, Y. Kodama, T. Nakayama, Y. Shibano, and T. Amachi. 1994. Purification and characterization of a thermostable β -galactosidase with high transgalactosylation activity from *Saccharopolyspora rectivirgula*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**: 657-663.
 8. Dumortier, V., J. Montreuil, and S. Bouquelet. 1990. Primary structure of ten galactosides formed by transglycosylation during lactose hydrolysis by *Bifidobacterium bifidum*. *Carbohydrate Res.* **201**: 115-123.
 9. Gorin, P.A.J., J.F.T. Spencer, and H.J. Phaff. 1964. The synthesis of β -galacto- and β -gluco-pyranosyl disaccharides by *Sporobolomyces singularis*. *Can. J. Chem.* **42**: 2307-2317.
 10. Ohtsuka, K., S. Oki, O. Ozawa, and T. Uchida. 1988. Isolation and cultural conditions of galactooligosaccharide producing yeast *Cryptococcus laurentii*. *Hakkokogaku.* **66**: 225-233.
 11. Yang, J.W., H.J. Shin, S.P. Yeom, B.D. Yun, and M.H. Kim. 1994. Isolation and characterization of *Enterobacter* sp. producing galacto-oligosaccharides. *J. Microbiol. Biotechnol.* **4**: 343-348.
 12. Ballio, A. and S. Russi. 1960. Chromatographic fractionation and chemical characterization of some oligosaccharides synthesized from lactose by *Penicillium chrysogenum* THOM. *J. Chromatography* **4**: 117-129.
 13. Prakash, S., K. Suyama, T. Itoh, and S. Adachi. 1987. Oligosaccharide formation by *Trichoderma harzianum* in lactose containing medium. *Biotech. Lett.* **9**: 249-252.
 14. Gorin, P.A.J., J.F.T. Spencer, and H.J. Phaff. 1964. The structures of galactosyl-lactose and galactobiosyl-lactose produced from lactose by *Sporobolomyces singularis* **42**: 1341-1344.
 15. Shin, H.J. and J.W. Yang. 1994. Galacto-oligosaccharide production by β -galactosidase in hydrophobic organic media. *Biotechnol. Lett.* **16**: 1157-1162.

(Received 6 April 1995)