

유청의 갈락토올리고당을 이용한 *Bifidobacteria*의 생육 촉진

김 창 렬

서강정보대학 식품영양과

Use of Galactooligosaccharides from Cheese Whey for Growth of *Bifidobacteria*

Chang-Ryoul Kim

Dept. of Food Science and Nutrition, Seo Kang College, Kwangju 500-742, Korea

Abstract

Effect of galactooligosaccharides produced by the β -galactosidase from *Aspergillus niger* CAD 1 on the growth of *Bifidobacterium infantis* KCTC 3127, *Bifidobacterium longum* KCTC 3128, and *Bifidobacterium bifidum* ATCC 11863 were investigated. *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*, and *Bifidobacterium bifidum* were in the logarithmic growth phase after 6hr incubation at 37°C. *Bifidobacterium infantis* was in the stationary phase after 24hr incubation at 37°C. *Bifidobacterium longum* and *Bifidobacterium bifidum* were in the stationary phase after 48hr incubation at 37°C. The growth rate of *B. bifidum* containing galactooligosaccharides and raffinose in MRS broth increased up to 18%, 8%, and 7% compared to glucose, galactose, and lactose during 48hr incubation. The growth rate of *B. infantis* and *B. longum* containing galactooligosaccharides and raffinose in MRS broth increased up to both 6% and 8% and both 13% and 10% compared to glucose and galactose during 48hr incubation.

Key words : galactooligosaccharide, β -galactosidase, growth, *Bifidobacteria*.

서 론

β -Galactosidase(β -D-galactoside galactohydrolase, EC.3.2.1.23)는 유당의 β -1,4-결합을 가수분해하여 글루코스와 갈락토스를 생산하며 유당의 가수분해로 생성된 갈락토스는 대부분 단당류나 다당류 및 알콜분자와 새로운 글리코시드 결합을 형성하여 올리고당을 생성한다. 이러한 반응을 갈락토스 전달 반응(transgalactosidation)이라고 한다. 생성되는 올리고당의 수와 형태는 효소, 기질농도, 반응시간, pH, 반응온도, 무기이온의 영향을 받는다²⁾. 이를 올리고당은 소장에서 분해되지 않고 대장까지 가서 장내 유용세균인 *Bifidobacterium*의 증식인자로 작용하여 장내의 대장균, 장구균 및 부패성세균의 증식을 억제한다. 뿐만 아니라 영양소의 합성, 신진대사의 촉

진, 면역기능의 증진과 장의 운동 촉진에 따른 변비의 개선효과를 나타낸다. 그래서 당뇨 등으로 당 섭취가 제한되는 사람에게 유용하고, 조제분유, 음료수, 아이스크림, 빵등의 식품소재, 의약품 및 가축사료로 이용되고 있다^{3,4)}. 우유에서 β -galactosidase의 작용으로 생성되는 올리고당은 3~11개로 보고되어 있고^{5,6)}, Wierzbicki와 Kosikowski⁷⁾는 유청에서 생성되는 올리고당은 총 유당함량의 1~2%라 하였다. 치즈제조의 부산물인 유청에는 유당이 70% 이상 들어 있기 때문에 β -galactosidase를 이용하여 올리고당을 생산하면 부산물의 이용성을 높여 경제적으로 유효할 것이다.

본 연구는 *Aspergillus niger* CAD 1의 β -galactosidase 전달반응에 의하여 생성된 치즈 유청의 갈락토올리고당(galactooligosaccharide)을 이용하여 *Bi-*

Corresponding author : Chang-Ryoul Kim

Bifidobacterium infantis, *Bifidobacterium longum* 및 *Bifidobacterium bifidum*의 성장에 미치는 영향을 분석한 결과이다.

재료 및 방법

1. 사용균주 및 배지

β -Galactosidase의 생산균주는 *Aspergillus niger* CAD 1⁸⁾을, 갈락토올리고당이 비피도박테리아의 성장에 미치는 영향을 조사하는데 사용한 균주는 한국 과학기술원 유전공학센터에서 분양받은 *Bifidobacterium infantis* KCTC 3127, *Bifidobacterium longum*, KCTC 3128, 강원대학교 낙농학과에서 분양받은 *Bifidobacterium bifidum* ATCC11863을 사용하여, Teraguchi 등⁹⁾의 방법에 의한 혐기적 조건에서 증식하였다. 비피도박테리아의 성장 측정용 배지는 0.005% L-cysteine이 함유된 MRS 배지를 사용하였다⁹⁾.

2. 유청의 구입

전북 임실읍 소재 임실치즈 공장으로부터 치즈 제조시 부산물로 나오는 유청을 갈락토올리고당의 생산 기질로 사용하였다.

3. *Aspergillus niger* CAD 1의 배양방법

이 등⁸⁾이 사용한 방법을 수정하여 실시하였다. 즉 1ℓ의 삼각플라스크에 내포된 밀기울 배지상에서 30℃, 3일간 계대배양후 형성된 *A. niger* CAD 1의 포자를 멸균 증류수에 혼탁하여 포자수가 10⁷ spore/ml 되게 조성된 균체에 20ml를 접종하였다. 그후 이 등 (1986)의 방법에 따라 이 균주의 효소 생산 최적 배양조건인 30℃에서 72시간 정차배양하였다.

4. 효소의 추출

배양 완료후 배지 중량 2배의 멸균 증류수를 첨가하여 용해하고 실온에서 2시간 진탕한 다음 여과포로 여과하여 얻은 용액을 4℃, 3,350×g에서 10분간 원심분리 (Beckman, England) 하였다. 원심분리하여 얻은 상정액에 1.5배량의 아세톤 (-10℃) 을 서서히 첨가하여 교반기로 혼합한 다음에 -10℃의 저온 냉장고에서 1시간 보관하여 침전된 단백질을 재차 원심분리 (3,350×g, 4℃ /10min) 하였다. 침전된 단백질은 0.1M sodium acetate buffer (pH 4.5)에 용해하여 모은 후, 동결건조기 (Edwards, England)로 동결건조한 다음 분말화하여 얻은 조효소 (1.83unit/mg)를 0℃에 보관하면서 사용하였

다.

5. 효소의 정제

김¹⁰⁾의 방법에 따라 조효소 2g을 40ml의 0.1M sodium acetate buffer (pH 4.5)에 녹인 다음, DEAE-cellulose 이온교환 크로마토그래피 (Sigma Chemical Co., USA)로 1차 정제하였다. 컬럼사이즈는 2.5×30cm, 완충액은 50mM Tris-malate buffer (pH 7.0) 이었다. 조효소 15ml를 컬럼의 상부에 흡착시키고 동일한 완충액 500ml와 0.5M NaCl이 함유된 완충액 500ml의 직선기울기로 1시간 당 25ml의 속도로 용출하고 5ml씩 분획하였다. 그후 Sephadex G-100 gel 컬럼 (2.5×80cm, Pharmacia Chemical Co.)에 50mM sodium acetate buffer (pH 4.5)를 사용하여 1시간당 15ml의 속도로 5ml씩 분획하였다. 각 분획액의 단백질 농도와 β -galactosidase의 활성을 측정하였다. 효소의 순도는 Laemmli¹¹⁾의 SDS-polyacryamide gel 전기영동법으로 분석하였다. 분자량 측정용 표준단백질 (Bio-Rad Chemical Co., USA)은 bovine serum albumin (MW; 66,200), phosphorylase b (MW; 97,400), *Escherichia coli* β -galactosidase (MW; 116,250) 및 myosine (MW; 200,000)을 사용하였다.

6. 효소의 활성측정

β -galactosidase의 활성은 Dickson 등¹²⁾의 방법으로 측정하였다. 효소의 활성단위는 1분동안 1 μ mole의 ONP를 생산하는 효소량을 1unit로 하였다.

7. 단백질의 정량

β -Galactosidase의 단백질 함량은 bovine serum albumin (BSA, Sigma Chemical Co., USA)을 표준단백질로 하여 Lowry 등¹³⁾의 방법으로 정량하였다.

8. 갈락토올리고당의 조제

김의 방법¹⁰⁾에 따라 *Aspergillus niger* CAD 1의 β -galactosidase (2.0unit/ml)를 20%의 유당이 함유된 치즈 유청에 넣고, 45℃에서 4시간 배양하였다. 유청에서 생산된 갈락토올리고당은 이 등⁸⁾의 방법에 따라 HPLC (Model R401, Waters-Associates, Co., USA)로 분석하였다. Water사 제품을 이용하여 굴절률검출기, carbohydrate column (Waters Milford, MA, USA), acetonitrile : water (70:30, v/v) 용매로 1.5/min의 유출속도에서 당을

분취하였다. 그후 Pazur 등¹³⁾의 방법으로 단당 및 유당을 제거하고, Toba와 Adachi¹⁵⁾의 여지크로마토그래피 방법으로 n-butanol : pyrine : water (6:4:3)를 전개용매로 하여 같은 완충액으로 5번 전개하여 올리고당을 확인하였다.

9. 비피도박테리아의 생육측정

정제된 갈락토올리고당을 0.2%씩 0.005% L-cysteine이 함유된 MRS 배지에 첨가한 다음 37°C에서 일정시간 간격으로 48시간 배양하면서 pH 변화 및 성장을 조사하였다. pH는 pH meter (Kent Industrial, Model 7020, British England)로 측정하였다. 균의 성장상태는 각 배양액을 5ml씩 취하여 3,000×g에서 15분 동안 원심분리한 다음 침전된 세포를 회석하여 650nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다.

결과 및 고찰

갈락토올리고당이 비피도박테리아의 성장에 미치는 영향을 조사하기 위하여 L-cysteine이 함유된 MRS 배지에 갈락토올리고당, 글루코스, 갈락토스 및 유당을 0.2% 씩 첨가하였다. 이를 혼합물에 0.1ml의 *B. infantis* KCTC 3127, *B. longum* KCTC 3128, *B.*

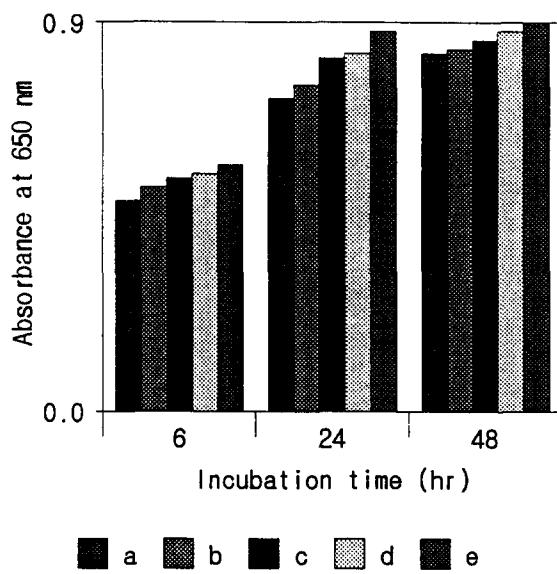


Fig. 1. Growth of *Bifidobacterium infantis* KCTC 3127 in MRS broth containing several sugars. a = glucose, b = galactose, c = lactose, d = galactooligosaccharides, e = raffinose.

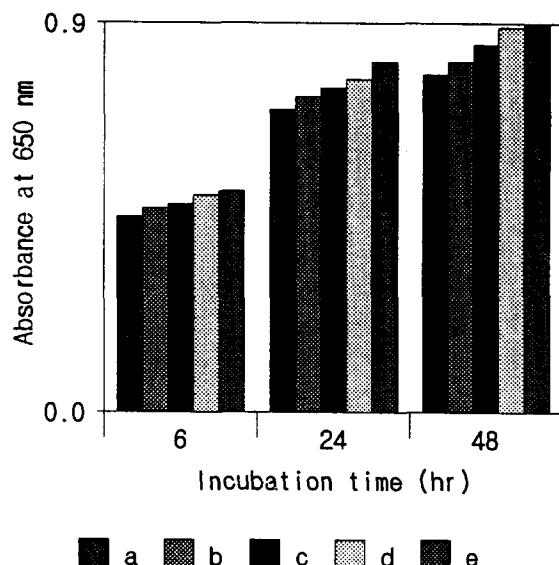


Fig. 2. Growth of *Bifidobacterium longum* KCTC 3128 in MRS broth containing several sugars. a = glucose, b = galactose, c = lactose, d = galactooligosaccharides, e = raffinose.

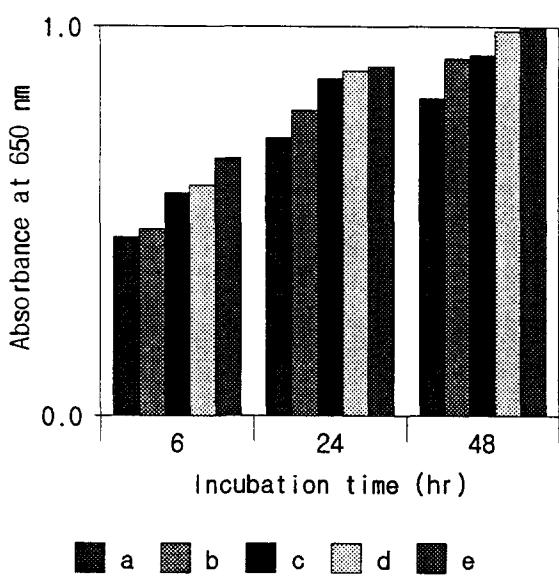


Fig. 3. Growth of *Bifidobacterium bifidum* ATCC 11863 in MRS broth containing several sugars. a = glucose, b = galactose, c = lactose, d = galactooligosaccharides, e = raffinose.

bifidum ATCC 11863을 접종한 다음 37°C에서 48시간 배양하면서 비피도박테리아의 성장 및 pH 변화를 조사한 결과는 Fig. 1, 2 및 3과 같다. *B. infantis*,

B. longum, 및 *B. bifidum*은 배양 6시간 이후부터 대수적 성장을 나타내었다. *B. longum*과 *B. bifidum*은 배양 48시간 까지 지속적으로 증식되었다. 그리고 *B. infantis*는 배양 24시간후 정지기에 도달하였다.

pH 분석은 *B. infantis*, *B. longum*, 및 *B. bifidum*의 증식에 따라 배양 48시간 이후 크게 감소하였다 (Table 1). *B. bifidum* ATCC 11863은 갈락토올리고당과 라피노스를 첨가한 배지에서 48시간 후 글루코스를 첨가한 배지보다 성장률이 높았고 pH도 현저하게 감소하였다. *B. infantis* 및 *B. longum*은 48시간 후 갈락토올리고당 및 라피노스를 첨가한 배지에서 성장이 양호한 반면 글루코스와 유당을 첨가한 배지에서는 성장이 저하되었다. 이 결과는 박 등¹⁷⁾이 올리고당 중 라피노스와 stachyose를 *B. longum*과 *B. infantis*가 이용할 수 있다고 보고한 결과와 유사하다. 비피도박테리아의 균체 증식율에도 글루코스, 갈락토스 및 프룩토스 등의 단당류보다 올리고당인 lactulose, 라피노스 및 stachyose가 더 증가시켰다고 하였다. 고¹⁸⁾는 *B. bifidum*을 우유에서 발효시킨 다음 *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* 및 *Lactobacillus thermophilus*와 탄수화물의 변화를 비교한 결과 *B. bifidum*의 발효유 산생성 능력은 다른

Table 1. Mean pH values¹ in MRS broth containing several sugars after incubation of *B. infantis* KCTC 3127, *B. longum* KCTC 3128, and *B. bifidum* ATCC 11863. GL = glucose, GA = galactose, LA = lactose, OL = galactooligosaccharides, RA = raffinose.

Treatment	Storage time (hr)		
	6	24	48
GL / <i>B. infantis</i>	6.2	6.1	6.0
GA / <i>B. infantis</i>	6.0	5.9	5.2
LA / <i>B. infantis</i>	6.2	5.7	5.9
OL / <i>B. infantis</i>	6.2	5.9	5.2
RA / <i>B. infantis</i>	6.2	5.5	5.0
GL / <i>B. longum</i>	6.3	5.7	5.7
GA / <i>B. longum</i>	6.3	5.5	5.3
LA / <i>B. longum</i>	6.3	5.3	6.0
OL / <i>B. longum</i>	6.3	5.7	5.6
RA / <i>B. longum</i>	6.3	6.0	5.0
GL / <i>B. bifidum</i>	5.9	5.8	5.7
GA / <i>B. bifidum</i>	5.8	5.7	5.6
LA / <i>B. bifidum</i>	5.8	5.7	5.3
OL / <i>B. bifidum</i>	5.7	5.6	5.1
RA / <i>B. bifidum</i>	5.6	5.5	5.0

¹ Means of 3 replications

세균보다 감소하지만 유당의 감소는 가장 많았다고 하였다. 고¹⁸⁾는 유아 조제분유에 올리고당을 첨가하거나 발효유제품에 비피도박테리아를 첨가하여 장내 유용 세균총인 비피도박테리아가 나타내는 영양소의 합성, 면역기능의 증진, 독성물질의 중화와 병원성균의 감염 억제 및 변의 완화작용에 유익한 것으로 보고한 바 있다.

이 같이 본 결과에서 *Aspergillus niger* CAD 1의 β -galactosidase에 의하여 형성된 갈락토올리고당이 장내 유용세균총인 비피도박테리아의 성장에 효과적으로 이용될 수 있다는 사실을 밝혔다.

요 약

Aspergillus niger CAD 1의 정제된 β -galactosidase를 이용하여 치즈 유청으로부터 갈락토올리고당을 생산한 다음 장내 유용세균총인 *B. infantis* KCTC 3127, *B. longum* KCTC 3128 및 *B. bifidum* ATCC 11863의 증식 촉진 물질로서의 영향을 조사하였다. *B. infantis*, *B. longum* 및 *B. bifidum*은 37°C에서 배양 6시간 이후부터 대수적 성장에 도달하였다. *B. infantis*는 배양 24시간 후 대수기말에 도달하였으며, *B. longum* 및 *B. bifidum*은 배양 48시간 이후 대수기말에 도달하였다. pH는 배양 6시간 이후에 크게 감소하였다. *B. bifidum*은 48시간 반응 후 갈락토올리고당과 raffinose 첨가 배지에서 글루코스, 갈락토스 및 락토오스를 첨가한 배지보다 18%, 8% 및 7% 씩 성장이 증가하였다. *B. infantis*와 *B. longum*은 갈락토올리고당과 라피노스 첨가 배지에서 48시간 후 글루코스와 갈락토스를 첨가한 배지보다 성장이 6%와 8% 및 13%와 10% 씩 성장이 증가하였다.

감사의 말

본 연구를 위하여 지도해 주신 고 이용규 박사님의 은혜에 깊이 감사드리며, 영전에 올린다.

참고문헌

- Clamp, J. R., Hough, L., Hickson, J. L. and Whistler, R. L. : Lactose, In Advances in Carbohydrate Chemistry. Wolfrom, M. L. Ed., Academic Press, New York. p. 159~206 (1961).
- Kwak, H. S. and Jeon, I. J. : Effect of various conditions on the formation of oligosaccharides in milk treated with β -galactosidase. *J. Dairy Sci.* 69,

- 2785~2790 (1986).
3. 고준수 : *Bifidobacteria*의 특성과 발효유 제조. 한국유가 공연구회지. 5, 75~84 (1988).
 4. 강국희, 김상희 : *Kluveromyces fragilis*의 β -galactosidase에 의한 oligosaccharides의 생성. 한국식품위생 학회지. 2, 67~73 (1987).
 5. Robert, H. R. and Pettinati, J. D. : Concentration effects in the enzymatic conversion of lactose to oligosaccharides. *J. Agri. Chem.*, 5, 130~134 (1957).
 6. Toba, T. Y., Tomita, Y., Itoh, T. and Adachi, S. : β -Galactosidase of lactic acid bacteria : Characterization by oligosaccharides formed during hydrolysis of lactose. *J. Dairy Sci.*, 64, 185~192 (1981).
 7. Wierzbicki, L. E. and Kosikowski, F. V. : Formation of oligosaccharides during β -galactosidase action on lactose. *J. Dairy Sci.*, 55, 1400~1404 (1972).
 8. 이용규, 전순배, 최원기, 정기철, 배석, 김관천 : β -Galactosidase의 고정화 및 응용에 관한 연구. *Aspergillus niger CAD 1*의 효소 생산 조건 및 효소학적 성질. 한국 영양식량학회지. 24, 326~331 (1985).
 9. Teraguchi, S., Uehara, M., Ogasa, K. and Mitsuoka, T. : Enumeration of *bifidobacteria* in dairy products. *Jpn. J. Bacteriol.*, 33, 753~758 (1978).
 10. 김창렬 : 고정화 β -galactosidase에 의한 갈락토올리고당의 생산 및 특성. 전남대학교 박사학위 논문. p. 70~71 (1990).
 11. Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature*, 277, 680~685 (1970).
 12. Dickson, R. C., Dickson, L. R. and Markin, J. S. : Purification and properties of inducible β -galactosidase isolated from the yeast *Kluveromyces lactis*. *J. Bacteriol.*, 137, 51~61 (1979).
 13. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Fandall, F. J. : Protein measurement with the Folin-phenol reagents. *J. Biol. Chem.*, 193, 265~275 (1951).
 14. Pazur, J. H., Tipton, C. L., Budovich, T., and Marssh, J. M. : Structural characterization of products of enzymatic disproportionation of lactose. *J. Am. Chem. Soc.*, 80, 119~127 (1958).
 15. Toba, T. and Adachi, S. : Hydrolysis of lactose by microbial β -galactosidase. Formation of oligosaccharides with special references to 2-O- β -galactopyranosyl-D-glucose. *J. Dairy Sci.*, 61, 33~38 (1978).
 16. Toba, T., Yokota, A. and Adachi, S. : Oligosaccharide structures formed during the hydrolysis of lactose by *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. *Food Chemistry*, 16, 147~162 (1985).
 17. 박신인, 이호근, 강국희 : 올리고당의 장내 세균증식에 미치는 영향에 관한 연구. 한국유가공연구회지. 10, 159~169 (1988).
 18. 고준수 : *Bifidobacteria*의 특성과 발효유 제조. 한국유가 공연구회지. 5, 75~84 (1988).

(1999년 1월 13일 접수)