

*Enterobacter agglomerans*에 의한 D-Galactose로부터 D-Tagatose 생산조건의 최적화

오덕근* · 노회진¹ · 김상용¹ · 노봉수²

우석대학교 식품공학과, ¹동양제과(주) 기술개발연구소, ²서울여자대학교 식품·미생물공학과

Optimization of Culture Conditions for D-Tagatose Production from D-Galactose by *Enterobacter agglomerans*. Oh, Deok-Kun*, Hoe-Jin Roh, Sang-Yong Kim, and Bong-Soo Noh. Department of Food Science and Technology, Woosuk University, Cheonju 565-800, Korea, ¹Tong Yang Confectionary Co., R&D Center, Seoul 140-715, Korea, ²Department of Food and Microbial Technology, Seoul Women's University, Seoul 139-774, Korea - D-Tagatose production from D-galactose was investigated using 35 type strains of American Culture Type Collection (ATCC) and Korean Collection for Type Cultures (KCTC) which have potential to produce D-tagatose. *Enterobacter agglomerans* ATCC 27987 was selected as a D-tagatose producing strain due to its short fermentation time and high production of D-tagatose. Optimization of the culture conditions for D-tagatose production by *E. agglomerans* ATCC 27987 was performed. Among various carbon sources, D-galactose was the most effective carbon source for D-tagatose production. As the D-galactose concentration was increased, cell growth and D-tagatose production increased. Effect of nitrogen sources on D-tagatose production was studied. Of inorganic nitrogen sources, ammonium sulfate was effective one for D-tagatose production and yeast extract was the most suitable organic nitrogen nutrient. The concentrations of inorganic compounds such as KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ were also optimized for D-tagatose production. The optimal medium was determined to contain D-galactose of 20 g/l, yeast extract of 5.0 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ of 2.0 g/l, KH_2PO_4 of 5.0 g/l, K_2HPO_4 of 5.0 g/l, and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ of 5 mg/l. The optimal environmental conditions in a 250-ml flask were found to be pH of 6.0, temperature of 30°C, and agitation speed of 150 rpm. D-tagatose of 0.41 g/l could be obtained in 24 h from 20 g/l D-galactose at the optimal culture condition without induction and cell concentration.

Key words: D-tagatose, D-galactose, culture conditions, *Enterobacter agglomerans*

설탕의 0.92배의 감미도를 지닌 육탄당 tagatose는 설탕과 가장 유사한 물리적, 화학적 성질을 가지고 있다 [15]. 또한, tagatose는 체내에 흡수과정 중에 거의 대사되지 않아 열량에 기여를 하지 않는 비열량 감미료이다. 쥐의 식이 실험에서 설탕을 30%투여한 실험 쥐는 중량이 20% 이상 증가한데 비하여 같은 양의 tagatose 투여한 실험 쥐는 오히려 중량이 15% 감소된 보고로부터도 알 수 있듯이 tagatose는 diet 감미료이다 [9, 10].

Tagatose의 생산은 화학적, 효소적 및 미생물학적 방법으로 모두 가능하다. 화학적 방법으로는 유당(lactose)을 가수분해하여 나온 저가의 galactose를 calcium 등을 촉매로 하여 tagatose-calcium-hydroxide 복합체를 만들어 이성화시켜 tagatose를 생산한다 [1]. 효소적 방법에 의한 tagatose의 생산은 D-tagatose-3-epimerase를 이용하여 L-sorbose로부터 생산한 경우와 [4] arabinose

-ketol-isomerase를 이용하여 galactose로부터 생산한 경우 [2] 그리고 ducitol dehydrogenase를 이용하여 dulcitol로부터 생산한 보고가 있다 [7]. 미생물 발효에 의한 방법은 dulcitol을 기질로 하여 *Pseudomonas* sp. [3], *Enterobacter agglomerans* [11], *Arthrobacter globiformis* [6], *Klebsiella pneumoniae* [13], *Mycobacterium smegmatis* [7] 등에서 tagatose가 생산된다고 보고되었다. 유제품인 유청(whey)이나 유당에서 유래한 값싼 galactose를 기질로 tagatose를 생산한다면 dulcitol을 기질로 하는 경우보다 더 경제적일 것이다. 그러나, D-galactose를 사용하여 D-tagatose를 생산한 것은 *Mycobacterium phlei*와 *Lactobacillus gayonii*에서 보고되었으나 그 생산성이 매우 낮게 나타나고 있다 [2]. 최근 본 실험실에서 자연에서 분리한 *Enterobacter agglomerans*는 발효시간 14시간만에 3.0 g/l의 D-tagatose를 생산하였으나 몇가지 문제점이 존재하고 있다 [8]. 첫 번째는 D-tagatose를 생산하기 위하여서는 반드시 비싼 arabinose로 induction을 시켜야만 하는 비경제적인 단점이 있고 두

*Corresponding author

Tel. 82-652-290-1441, Fax. 82-652-290-9312
E-mail: deokkun@unitel.co.kr

번재는 높은 생산성을 얻기 위하여 균체를 원심분리하여 10배 이상 농축하여야 한다는 것이다.

그러므로, 본 연구에서는 induction 과정과 균주의 농축 과정 없이 D-galactose로부터 D-tagatose를 생산하는 균주를 선별하고 생산조건을 최적화 하고자 한다.

재료 및 방법

미생물 및 배지

사용한 미생물은 미국 중균협회(ATCC)와 한국 유전자은행(KCTC)에서 구입한 *Enterobacter agglomerans* (ATCC 27987, ATCC 29000, ATCC 49014, KCTC 2564, KCTC 2578), *E. aerogenes*(KCTC 2190), *E. cloacae*(KCTC 1684, KCTC 1685, KCTC 1943, KCTC 2361, KCTC 2519), *Lactobacillus acidophilus*(KCTC 2182), *L. amylophilus*(KCTC 3160), *L. agilis*(KCTC 3158), *L. arabinosus*(KCTC 1048), *L. brevis*(KCTC 3102), *L. bulgaricus*(KCTC 3188), *L. casei*(KCTC 3189), *L. coryniformis*(ATCC 3159), *L. delbruekii* (KCTC 1058), *L. lactis*(KCTC 2181), *L. fermentum* (KCTC 3112), *L. pentosus*(KCTC 3120), *Bacillus cereus* (KCTC 1013), *B. megaterium*(KCTC 1366), *Arthrobacter* sp.(KCTC 1781), *Arthrobacter globiformis*(KCTC 9101), *Actinoplanes missouriensis*(KCTC 1780), *Erwinia rhapsontici*(KCTC 2567), *E. carotova*(KCTC 2496), *Flavobacterium devorans*(KCTC 1870), *Klebsiella pneumoniae*(KCTC 1560), *Streptomyces olivochromogenes* (KCTC 9090) *Mycobacterium* sp.(KCTC 1466) 및 *M. smegmatis*(KCTC 1057)이었다. 성장배지로는 ATCC[14]와 KCTC[12]가 추천하는 배지를 사용하였고 특히, 선별된 *E. agglomerans* ATCC 27987의 성장 배지는 beef extract 3.0 g/l와 peptone 5.0 g/l로 구성된 NB배지를 사용하였다. D-Tagatose 생산배지로는 사용한 균주들 모두 galactose 20 g/l 질소원으로 yeast extract 5.0 g/l, (NH₄)₂SO₄ 5.0 g/l 무기염으로 KH₂PO₄ 5.0 g/l와 K₂HPO₄ 5.0 g/l로 구성된 배지를 사용하였고 선별된 *E. agglomerans* ATCC 27987는 이 배지를 기본으로 하여 배지 최적화를 수행하였다[8].

배양조건

종배양은 agar 배지(성장배지+agar 15 g/l)의 colony를 pH가 6.0으로 조절된 성장배지 50 ml가 들어있는 250 ml 플라스크에 접종한 후 진탕 배양기에서 240 rpm, ATCC[14]와 KCTC[12]가 추천하는 온도로 탁도계에서 600 nm의 현탁도가 1.0에 도달할 때까지 수행하였다. 본배양은 종배양액 2.5 ml를 D-tagatose 생산배지 50 ml가 들어있는 250 ml 플라스크에 접종하여 배양온

도는 30℃, 초기 pH는 7.0, 교반속도는 100 rpm으로 하여 24시간 동안 수행하였다. 이때, 배양 중 pH는 조절하지 않았다.

분석방법

D-Galactose와 D-tagatose의 농도는 Carbohydrate column(Waters, USA)이 장착된 HPLC(Shimadzu C-R6A, Japan)의 refractive index detector(Shimadzu RID-6A)를 이용하여 측정하였다. 이때, 용매는 75%(v/v) acetonitrile와 15% 물(v/v)의 혼합용액을 사용하였고, 온도는 30℃이고, 유속은 2.0 ml/min이었다. 최종 선별된 *E. agglomerans* ATCC 27987의 균체농도는 탁도계를 이용하여 파장 600 nm에서 현탁도를 측정하여 미리 측정된 표준곡선을 이용하여 건조중량으로 환산하였다.

결과 및 고찰

D-Tagatose 생산을 위한 균주 선정

D-Galactose나 D-dulcitol로부터 D-tagatose를 생산하였다는 보고가 있는 균주들과 glucose isomerase를 생산하는 균주들을 미국 중균협회(ATCC)와 한국 유전자은행(KCTC)으로부터 구입하였다. 구입한 35 종류의 균주를 이용하여 D-galactose를 기질로 하여 D-tagatose를 생산 유무를 조사하였다. 여러 균주 중에 D-tagatose를 생산한 균주는 7종류로서 Table 1에 정리하였다. 크게 구분하면 *Arthrobacter globiformis*, *Enterobacter agglomerans*, *Lactobacillus* group으로 나눌 수 있었다. *Arthrobacter globiformis*는 D-tagatose를 비교적 낮은 수준으로 생산하였고 *Lactobacillus* group들은 *Arthrobacter globiformis*보다 높은 수준으로 생산하였으나 발효시간이 길게 나타났다. *E. agglomerans*는 크게 호기성 type과 혐기성 type으로 구분되는데 호기성 type에서는 D-tagatose가 생성되지 않았고 혐기성 type에서는 D-tagatose가 생성되었다. 이 중에서도 *E. agglomerans* ATCC 27987은 다른 균들보다 발효시간도 짧고 D-tagatose 생산량도 높아 이 균을 D-galactose로부터 D-tagatose를 생산하는

Table 1. D-Tagatose production from D-galactose by various microorganisms

Microorganism	D-Tagatose (g/l)	Time (h)
<i>Arthrobacter globiformis</i> KCTC 9101	0.05	48
<i>Enterobacter agglomerans</i> ATCC 27987	0.20	24
<i>Enterobacter agglomerans</i> ATCC 49014	0.07	24
<i>Enterobacter agglomerans</i> KCTC 2564	0.01	24
<i>Lactobacillus coryniformis</i> ATCC 3159	0.09	120
<i>Lactobacillus brevis</i> KCTC 3102	0.12	130
<i>Lactobacillus delbruekii</i> KCTC 1058	0.15	180

Table 2. Effect of various carbon sources on D-tagatose production

Carbon source (g/l)	Cell mass (g/l)	D-Tagatose (g/l)	Time (h)	
Galactose	5	0.72	0.06	8
	10	1.08	0.11	12
	20	1.32	0.21	24
	30	1.57	0.32	30
	50	2.16	0.54	48
Glucose	20	1.33	-	24
Fructose	20	0.45	-	24
Mannose	20	1.30	-	24
Sorbose	20	0.05	-	24
Dulcitol	20	0.08	0.03	24
Sorbitol	20	0.20	0.06	24

균으로 선정하였다.

탄소원이 D-Tagatose의 생산에 미치는 영향

배지 성분 최적화 실험들에서의 배양환경 조건으로서 배지의 초기 pH와 온도는 각각 7.0과 30°C로 하였으며 플라스크의 교반속도는 100 rpm으로 하였다.

Yeast extract 5.0 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5.0 g/l, KH_2PO_4 5.0 g/l, K_2HPO_4 5.0 g/l를 기본배지로 하여 여러 가지 탄소원이 균체성장과 D-tagatose의 역가에 미치는 영향을 조사하였다(Table 2). D-Galactose의 농도별 시간에서는 D-galactose가 고갈하는 배양시간에서 분석하였다. D-Galactose가 증가할수록 균체농도와 D-tagatose의 생산량이 증가함을 보여주었다. 탄소원으로 다른 육탄당을 사용하였을 경우 D-tagatose는 전혀 생성되지 않았고 glucose, fructose, mannose의 경우는 잘 이용하였으나 sorbose의 경우에는 잘 이용되지 않아 균체 성장이 적게 일어났다. 탄소원으로 dulcitol이나 sorbitol 같은 육탄당 알콜을 사용한 경우에는 D-tagatose는 생성되었으나 당

Table 3. Effect of various nitrogen sources on D-tagatose production by *Enterobacter agglomerans* ATCC 27987

Nitrogen source	Cell mass (g/l)	D-tagatose (g/l)
Beef extract	1.30	0.10
Corn steep liquor	0.69	0.01
Peptone	1.03	0.12
Soy bean flour	1.17	0.00
Tryptone	1.43	0.11
Polypeptone	1.12	0.10
Yeast extract	1.35	0.17
Urea	0.15	0.06
NH_4Cl	0.46	0.04
NH_4HCO_3	0.10	0.08
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.32	0.13

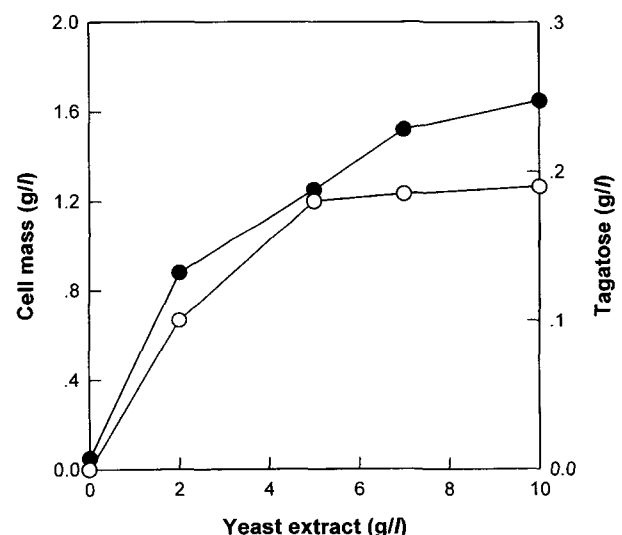
알콜을 잘 이용하지 못하여 균체농도가 낮게 나타났다.

질소원이 D-Tagatose의 생산에 미치는 영향

Galactose 20 g/l, 질소원 5.0 g/l, KH_2PO_4 5.0 g/l, K_2HPO_4 5.0 g/l로 구성된 발효배지에서 여러 가지 질소원을 달리 첨가하여 24시간 동안 배양한 후 질소원이 균체농도와 D-tagatose의 생산에 미치는 영향을 살펴보았다(Table 2). 균체농도는 유기 질소원을 질소원으로 사용하였을 때 높아 tryptone의 경우 가장 높았다. 무기 질소원의 사용한 경우의 균체농도는 유기 질소원보다 낮았고 이 중 NH_4Cl 을 사용한 경우가 가장 높았다. D-Tagatose의 생산은 질소원 중에서는 유기 질소원의 경우 yeast extract가 가장 높았고 무기 질소원의 경우 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 가 높게 나타났다.

D-Tagatose의 생산량이 가장 높게 나타난 질소원인 yeast extract를 선택하여 yeast extract의 농도가 균체농도와 D-tagatose의 생산량에 미치는 영향을 플라스크에서 24시간 수행하여 조사하였다(Fig. 1). 균체농도는 yeast extract의 농도가 증가할수록 증가하였지만 D-tagatose는 yeast extract 농도가 5.0 g/l까지는 급격히 증가하였으며 그 이상의 농도에서는 거의 일정하였다. 그러므로, tagatose 생산을 위한 최적 yeast extract의 농도는 5.0 g/l로 결정하였다.

무기 질소원 중 D-tagatose의 생산량이 가장 높은 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 yeast extract 5.0 g/l가 함유된 배지에 첨가하여 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 첨가가 D-tagatose에 미치는 영향을 살펴보았다. 약 2.0 g/l의 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 첨가한 경우 D-

**Fig. 1. Effect of yeast extract on D-tagatose production and cell growth of *Enterobacter agglomerans* ATCC 27987.**

Cell mass (●), D-tagatose production (○). Medium consisted of galactose 20 g/l, yeast extract, KH_2PO_4 5.0 g/l, and K_2HPO_4 5.0 g/l.

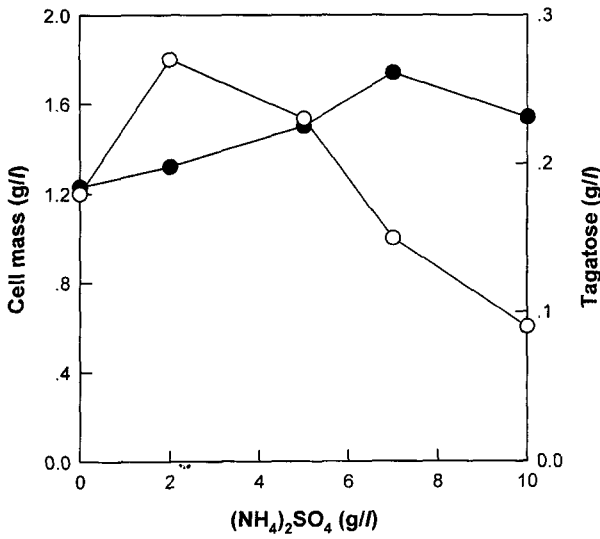


Fig. 2. Effect of (NH₄)₂SO₄ on D-tagatose production and cell growth of *Enterobacter agglomerans* ATCC 27987. Cell mass (●), D-tagatose production (○). Medium consisted of galactose 20 g/l, yeast extract 5.0 g/l, (NH₄)₂SO₄, KH₂PO₄ 5.0 g/l, and K₂HPO₄ 5.0 g/l.

tagatose의 농도가 증가하였지만 그 이상의 농도에서는 D-tagatose의 생산량이 급격히 감소하여 최적 (NH₄)₂SO₄의 농도는 2.0 g/l로 결정하였다.

무기염이 D-Tagatose의 생산에 미치는 영향

Galactose 20 g/l, yeast extract 5.0 g/l, (NH₄)₂SO₄ 2.0 g/l로 구성된 발효배지에 KH₂PO₄와 K₂HPO₄를 각각

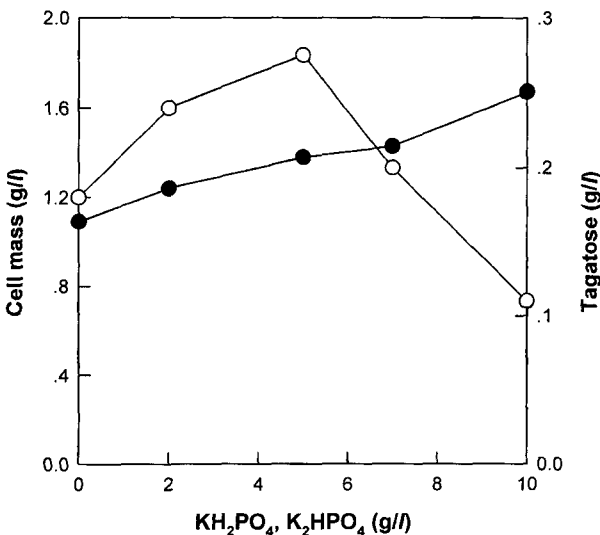


Fig. 3. Effect of phosphate on D-tagatose production and cell growth of *Enterobacter agglomerans* ATCC 27987. Cell mass (●), D-tagatose production (○). Medium consisted of galactose 20 g/l, yeast extract 5.0 g/l, (NH₄)₂SO₄ 2.0 g/l, KH₂PO₄, and K₂HPO₄.

배양환경 최적화 실험들은 galactose 20 g/l, yeast extract 5.0 g/l, (NH₄)₂SO₄ 2.0 g/l, MgSO₄ · 7H₂O 5.0 mg/l로 구성된 최적 배지를 사용하여 플라스크에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 환경 인자 중 배지의 초기 pH가 균체농도와 D-tagatose의 생산에 미치는 영향을 살펴본 결과 Fig. 5에 나타내었다. 균체농도와 D-tagatose의 생산은 초기 pH를 6.0으로 조절하였을 때 최대값을 나타내어 최적 pH를 6.0으로 선정하였다. 초기 pH가 6.0 이하에서는 균체농도보다 D-tagatose의 생산량이 더

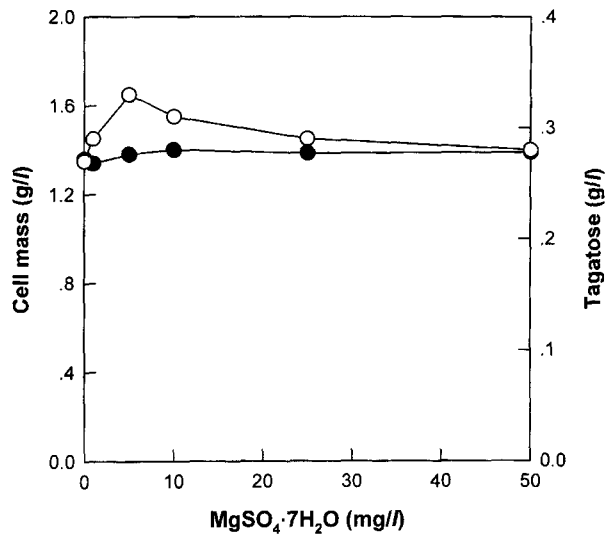


Fig. 4. Effect of MgSO₄ · 7H₂O on D-tagatose production and cell growth of *Enterobacter agglomerans* ATCC 27987. Cell mass (●), D-tagatose production (○). Medium consisted of galactose 20 g/l, yeast extract 5.0 g/l, (NH₄)₂SO₄ 2.0 g/l, KH₂PO₄ 5.0 g/l, and K₂HPO₄ 5.0 g/l.

같은 농도로 첨가하여 인산염의 농도가 균체농도와 D-tagatose 생산량에 미치는 영향을 살펴보았다. Fig. 3에서 나타난 것처럼, 균체농도는 KH₂PO₄와 K₂HPO₄의 농도가 증가할수록 증가하였다. D-Tagatose의 생산량은 KH₂PO₄와 K₂HPO₄의 농도가 각각 5.0 g/l일 때 최대값을 나타내어 최적 KH₂PO₄와 K₂HPO₄의 농도는 D-tagatose의 생산성을 기준으로 하여 5.0 g/l로 결정하였다.

Galactose 20 g/l, yeast extract 5.0 g/l, (NH₄)₂SO₄ 2.0 g/l, KH₂PO₄ 5.0 g/l, K₂HPO₄ 5.0 g/l로 구성된 발효배지에 MgSO₄ · 7H₂O의 농도를 달리 첨가하여 MgSO₄ · 7H₂O의 농도가 균체농도와 D-tagatose 생산량에 미치는 영향을 살펴보았다(Fig. 4). 균체농도는 MgSO₄ · 7H₂O의 농도에 관계없이 비교적 일정하였으나 D-tagatose의 생산량은 비교적 저 농도인 5.0 mg/l의 MgSO₄ · 7H₂O에 최대값을 나타내어 최적 MgSO₄ · 7H₂O의 농도는 5.0 mg/l로 결정하였다.

배양 환경이 D-Tagatose의 생산에 미치는 영향

배양환경 최적화 실험들은 galactose 20 g/l, yeast extract 5.0 g/l, (NH₄)₂SO₄ 2.0 g/l, MgSO₄ · 7H₂O 5.0 mg/l로 구성된 최적 배지를 사용하여 플라스크에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 환경 인자 중 배지의 초기 pH가 균체농도와 D-tagatose의 생산에 미치는 영향을 살펴본 결과 Fig. 5에 나타내었다. 균체농도와 D-tagatose의 생산은 초기 pH를 6.0으로 조절하였을 때 최대값을 나타내어 최적 pH를 6.0으로 선정하였다. 초기 pH가 6.0 이하에서는 균체농도보다 D-tagatose의 생산량이 더

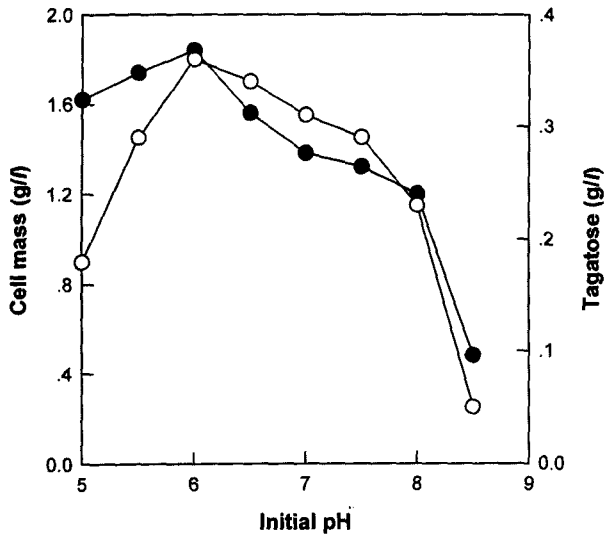


Fig. 5. Effect of initial pH on D-tagatose production and cell growth of *Enterobacter agglomerans* ATCC 27987. Cell mass (●), D-tagatose production (○). Culture temperature was 30°C and agitation speed of flask was 100 rpm.

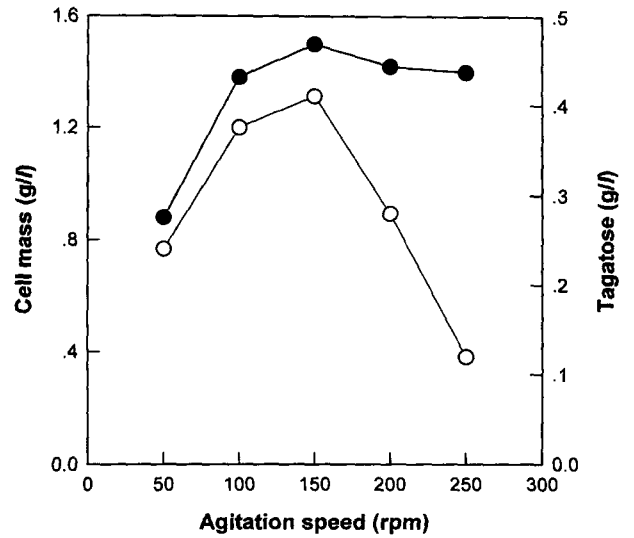


Fig. 7. Effect of agitation speed on D-tagatose production and cell growth of *Enterobacter agglomerans* ATCC 27987. Cell mass (●), D-tagatose production (○). Initial pH and temperature of medium were 6.0 and 30°C, respectively.

급격히 감소하였고 초기 pH가 8.0 이상에서는 균체농도와 D-tagatose의 생산량 모두 급격히 감소하였다.

최적배지에서 초기 pH를 6.0으로 하여 배양온도가 균체증식 및 D-tagatose의 생산에 미치는 영향에 대하여 살펴보았다(Fig. 6). 균체농도는 30°C까지 큰 변화가 없었으나 그 이상에서는 급격히 감소하여 34°C에서는 성장이 일어나지 않았다. D-Tagatose의 생산은 30°C에서 최대였고 그 이상의 온도에서는 급격히 감소하여 34°C에서는 전혀 생성되지 않았다. 그러므로, D-tagatose의 생

산을 위한 최적온도를 30°C로 결정하였다.

최적배지에서 초기 pH를 6.0, 배양온도를 30°C로 하여 플라스크 배양과정 동안 산소의 친화 정도를 간접적으로 나타내는 교반속도를 변화시켜 균체증식 및 D-tagatose의 생산에 미치는 영향에 대하여 살펴보았다. Fig. 7에 나타난 것처럼 균체증식은 150 rpm까지 급격히 증가하였으나 그 이상의 교반속도에서는 큰 변화가 없었다. 150 rpm 이하인 미세 혐기적(micro-anaerobic) 조건에서는 단위 균체농도 당 D-tagatose 생성량이 일정하게 나타나 균체농도가 증가할수록 D-tagatose 양이 증가하였고 호기적인 정도가 클수록(교반속도가 높을수록) D-tagatose의 생성량이 급격히 감소하였다. 그 결과 D-tagatose의 생산은 150 rpm에서 0.41 g/l로 최대값을 보여주었다. 이에 비하여 비교 실험으로 *E. agglomerans* ATCC 27987와 같은 배양조건에서 arabinose의 induction 과정과 균체의 원심분리 과정 없이 *E. agglomerans* TY-25[8]를 20 g/l의 D-galactose 배지에 배양한 결과 0.04 g/l의 D-tagatose가 생성되었다.

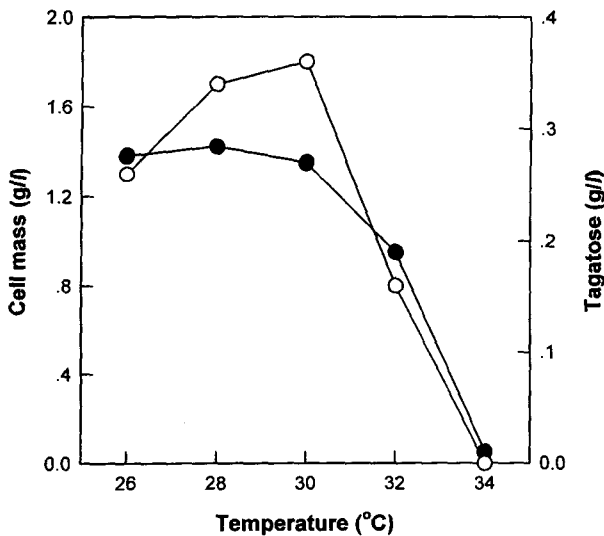


Fig. 6. Effect of temperature on D-tagatose production and cell growth of *Enterobacter agglomerans* ATCC 27987. Cell mass (●), D-tagatose production (○). Initial pH of medium were 6.0 and agitation speed of flask was 100 rpm.

최적배지와 최적배양조건에서 시간에 따른 균체 성장, D-galactose의 이용 및 D-tagatose의 생성을 살펴보았다(Fig. 8). 배양 24시간에 균체농도는 1.50 g/l까지 증가하였고 D-tagatose의 생산은 0.41 g/l까지 증가하였고 D-galactose도 거의 이용되었다.

지금까지 D-galactose로부터 D-tagatose를 생산한 균들은 *Mycobacterium phleii*, *Lactobacillus gayonii* 및 *Enterobacter agglomerans* TY-25가 문헌보고 전부이다[2, 8]. *Mycobacterium phleii*와 *Lactobacillus gayonii* 균주는 D-galactose 배지에서 induction을 시킨 후 D-galac-

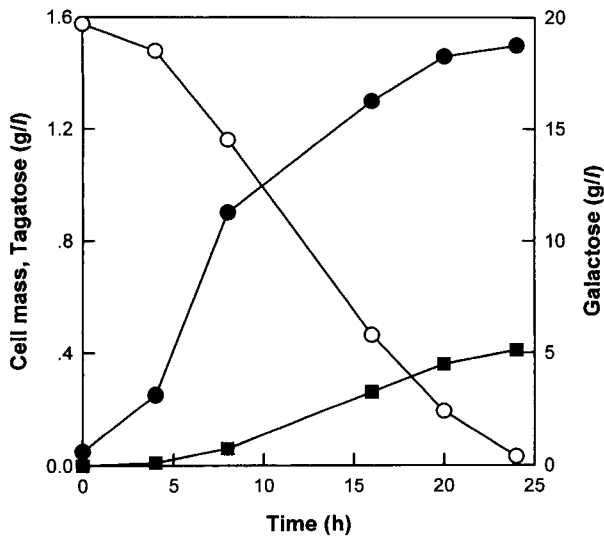


Fig. 8. Conversion of D-galactose to D-tagatose by *Enterobacter agglomerans* ATCC 27987.

Cell mass (●), D-tagatose production (○). D-galactose consumption (■). Initial pH and temperature of medium were 6.0 and 30°C, respectively, and agitation speed of flask was 150 rpm.

tose를 첨가하여 D-tagatose로 전환시키는 방법을 사용하였고 D-tagatose의 생산성이 0.001~0.002 g/l·h로 매우 낮게 나타났다[2]. 또한, *E. agglomerans* TY-25는 생산성과 수율이 높으나 D-tagatose를 생산하기 위하여서는 반드시 비싼 arabinose로 induction을 시켜야만 하고 균체를 원심분리를 통하여 10배 이상 농축하는 단점이 있다. 그러나, 본 실험에서는 *E. agglomerans* ATCC 27987을 사용하여 균체농축과 induction 과정 없이 20 g/l의 D-galactose로부터 배양시간 24시간에 생산성 0.017 g/l·h에 해당되는 0.41 g/l의 D-tagatose를 얻었다.

요 약

D-Tagatose의 생산 가능성이 있는 미국 종균협회(ATCC)와 한국 유전자은행(KCTC)에서 구입한 균주 35 종류를 사용하여 D-galactose로부터 D-tagatose를 생산을 조사하였다. 여러 균주 중에 발효시간이 짧고 D-tagatose의 생산량이 높은 *Enterobacter agglomerans* ATCC 27987을 D-tagatose 생산 균주로 선정하였다. 선정된 균을 사용하여 D-tagatose의 생산에 영향을 주는 배양 조건을 최적화 하였다. 여러 가지 탄소원 중에서 D-galactose가 D-tagatose의 생산량이 가장 높게 나타났고 그 농도를 달리하였을 때 D-galactose의 농도가 증가할수록 D-tagatose의 생산량과 균체농도가 증가하였다. 20 g/l의 D-galactose 배지에서 여러 가지 질소원이 D-tagatose의 생산에 미치는 영향을 살펴본 결과 D-tagatose의 생산량은 유기 질소원의 경우 yeast extract가 가장

높았고 무기 질소원의 경우 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 가 높게 나타났다. D-Tagatose의 생산량이 가장 높게 나타난 질소원인 yeast extract를 선택하여 농도별 실험을 수행하여 최적 yeast extract의 농도를 5.0 g/l로 결정하였다. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 yeast extract 5.0 g/l가 함유된 배지에 농도별로 첨가하여 2.0 g/l에서 최대 D-tagatose의 생산량을 얻었다. 또한, 무기염의 영향을 조사하여 KH_2PO_4 5.0 g/l, K_2HPO_4 5.0 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5.0 mg/l의 최적 D-tagatose 생산 조건을 결정하였다. 배지최적화를 통하여 최적 배지로 D-galactose 20 g/l, yeast extract 5.0 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0 g/l, KH_2PO_4 5.0 g/l, K_2HPO_4 5.0 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 mg/l를 선정하였다. 최적 배지에서 배양 환경이 D-tagatose의 생산에 미치는 영향을 조사하여 초기 pH 6.0, 배양 온도 30°C, 교반속도 150 rpm의 최적 배양 조건을 결정하였고 이 조건에서 배양시간 24시간에 D-galactose 20 g/l로부터 D-tagatose의 0.41 g/l를 얻을 수 있었다.

감사의 글

본 논문은 보건복지부 보건의료 기술연구과제비 지원에 의해 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Beadle, J. R., J. P. Saunders, and T. J. J. Wajda. 1991. Process for manufacturing tagatose. *U.S. Patent* 5,002, 612.
2. Cheetham, P. S. J. and A. N. Wootton. 1993. Bioconversion of D-galactose into D-tagatose. *Enzyme Microbiol. Technol.* **15**: 105.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Izumori, K. and K. Tsuzaki. 1988. Production of D-tagatose from D-galactitol by *Mycobacterium smegmatis*. *J. Ferment. Technol.* **66**: 225-227.
7. Kim, S. Y., H. J. Roh, and D. K. Oh. 1997. Production of D-tagatose from D-galactose *Enterobacter agglomerans* TY-25. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 490-494.
8. Livesey, G. and J. C. Brown. 1996. D-Tagatose is a bulk

- sweetener with zero energy determined in rats. *J. Nutr.* **126**: 1601–1609.
10. Mazur, A. W. 1989. Functional sugar substitutes with reduced calories. *Eur. Patent* 0341062A2.
 11. Muniruzzaman, S., H. Tokunaga, and K. Izumori. 1994. Isolation of *Enterobacter agglomerans* strain 221E from soil, a patent D-tagatose producer from galactitol. *J. Ferment. Bioeng.* **78**: 145–148.
 12. Park, Y. H. and K. S. Bae. 1992. *Catalogue of Strains*, pp. 161–184. 3rd ed. Korean Collection for Type Cultures.
 13. 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.
 14. Song S. C. and M. J. Edwards. 1995. *ATCC Bacteria*, pp. 108–126. 19th ed. American Type Culture Collection, Maryland.
 15. Zehener L. R. 1988. D-Tagatose as a low-calories carbohydrates sweeteners and bulking agent. *U.S. Patent* 4,786,722.

(Received January 20, 1998)