

微生物에 의한 β -Galactosidase의 生産 및 利用에 관한 연구

(第 1 報) *Penicillium* sp.로 부터 효소의 生産조건 및 정제

吳平洙, 梁漢喆
高麗大學校 農科大學 食品工學科
(1981년 11월 2일 수리)

Studies on the Production of β -Galactosidase by Microorganism and its Application

(Part 1) Conditions for the Production and Purification of the Enzyme from *Penicillium* SP.

Pyong-Su O, Han-Chul Yang

Department of Food Technology, College of Agriculture, Korea University

(Received November 2, 1981)

Abstract

A strain of *Penicillium* sp. which produces considerable amount of β -galactosidase was selected from extracellular β -galactosidase-producing fungi isolated from soil. The enzyme was found to be very stable in neutral pH range. Maximum enzymatic activity was reached after 72 hr of incubation in a wheat bran medium at 30°C. Productivity of the enzyme appeared not to be affected by the addition of carbon sources to the medium but the activity of the enzyme was increased from 14% to 85% by the addition of various nitrogen sources. The enzyme extracted from the wheat-bran culture of the *Penicillium* sp. was purified to 5050-fold by ammonium sulfate fractionation, SP-Sephadex C-50 chromatography, Ultrogel Aca 44 filtration and hydroxyapatite chromatography. The purified β -galactosidase was homogeneous on ultracentrifugation and disc electrophoresis.

서 론

β -Galactosidase (β -D-galactoside galactohydrolase, EC3,2,1,23)는 자연계에 널리 분포되어 있는 효소로서 동물, 식물 및 미생물등으로부터 분리, 정제 및 효소의 물리화학적 성질과 그 이용에 관한 연구가 많이 보고되어 있다.^{1,2,3,4}

β -Galactosidase는 우유중에서 탄수화물의 주성분인 lactose를 단당류인 glucose와 galactose로 가수분해하는 효소로서 특히 乳糖不耐症에 대한 防止策으로써 이 β -galactosidase의 이용에 관한 연구가 이루어졌다.

미생물을 起源으로 하는 β -galactosidase에 있어서 Feniksova⁽⁵⁾등과 Tikhomirova⁽⁶⁾등은 배양실험에서 酵素生成力에 관해 보고하였다. 효소정제에 있어서는 *Escherichia coli* K12⁽⁷⁾, *Kluyveromyces fragilis*⁽⁸⁾, *Aspergillus niger*^(9,10), *Aspergillus oryzae*^(11,12) 등에 관한 보고가 있다.

本 研究에서는 β -galactosidase의 산업적 생산 및 그 이용을 목적으로 토양에서 분리한 여러가지 곰팡이류 가운데 밀기울 固体培地에서 β -galactosidase 分泌力이 강하고 중성 부근에서 효소안정성이 높은 *Penicillium* sp. 균주를 생산균주로 선택하여 배양조건을 검토하고 이 효소를 정제하였다.

실험재료 및 방법

시 약

β -Galactosidase 활성測定을 위한 o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG)는 Nakari Chemicals 제품을 사용하였다. Column chromatography를 위한 Sephadex G-25 및 SP-Sephadex C-50은 Pharmacia Fine Chemicals 제품을, Duolite A-2 는 Diamond Shamrock Chemical Co. 제품을, Ultragel AcA44는 LKB 제품을, hydroxyapatite는 BDH Chemicals 제품을 각각 사용하였다. β -Galactosidase 활성band를 檢定하기 위한 6-bromo-2-naphthyl- β -D-galactopyranoside는 Sigma Chemical Co. 제품을 사용하였다.

균주의 선정

토양에서 분리되어 보관된 균주들 중에서 밀기울 固体培地上에서 β -galactosidase를 분비하는 곰팡이류를 검토균주들로 하였다.

배양방법

분리된 각 균주들의 β -galactosidase 활성測定을 위한 100ml Erlenmeyer's flask 배양은 밀기울 5g과 水道水 4ml를 혼합하여 멸균된 배지에, 미리 30°C에서 4일간 malt extract-agar slant에서 배양된 균주를 접종하여 30°C에서 3일간 배양하였다.

효소정제를 위한 tray 배양은 33×55×5cm 규격의 두께가 있는 aluminium plate에 밀기울 400g과, 水道水 320ml를 혼합하여 멸균된 배지에 미리 100 ml Erlenmeyer's flask에서 30°C, 3일간 배양하여 포자형성된 종균을 접종하여 30°C, 3일간 배양하였다.

β -Galactosidase의 활성測定法

효소의 활성單位 (unit)는 ONPG (o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside)를 기질로 하였다. 효소 및 5 mM ONPG를 함유하는 50mM acetate buffer (pH 4.5) 2 ml의 液을 40°C에서 15분동안 반응시킨 후 0.2M Na₂CO₃ 2 ml를 加하여 반응을 중지시키고 반응에 의해 생성된 o-nitrophenol을 410nm에서 比色 定量하였다. 이 반응조건에서 1분동안에 1 μ mol의 o-nitrophenol을 생성하는 효소량을 1單位로 하였다.

Ultracentrifugation

最終적으로 정제된 β -galactosidase는 超遠心法⁽¹³⁾에 따라 0.5M NaCl 용액 1ml에 6mg이 함유되게 하고 Hitachi Model 282 analytical ultracentrifuge

를 사용하여 20°C, 60000rpm에서 酵素蛋白 純度를 檢定하였다.

Electrophoresis

酵素蛋白純度를 檢定하기 위한 disc electrophoresis는 Davis法⁽¹⁴⁾에 의해서 정제된 β -galactosidase 70 μ g을 사용하여 pH 8.3, 3.75% polyacrylamide gel column (0.5×7 cm)에서 column 1 본당 2 mA로 4°C에서 3시간 동안 電氣泳動하였다. 電氣泳動된 蛋白은 Coomassie brilliant blue로 染色하였다. 酵素活性部位를 檢定하기 위해서 泳動된 β -galactosidase의 gel은 Erickson法⁽¹⁵⁾과 같이 6-bromo-2-naphthyl- β -D-galactopyranoside (40mM) 용액에 40°C에서 3시간동안 작용한 후 Fast blue salt B로 染色하였다.

蛋白質 定量

蛋白質은 bovine serum albumin을 標準蛋白으로 하여 Lowry 등의 方法⁽¹⁶⁾에 의해 定量하였다. 정제 과정에서는 280nm의 吸光度로 측정하였다.

실험결과 및 고찰

균주의 선정

밀기울 固体培地에서 균주들은 30°C, 3일간 배양한 후 여기에 10배의 水道水を 加하고 30°C에서 2시간동안 추출한 후 酵素活性를 測定하였다. 각 균주들의 酵素活性는 原料 1g당의 活性으로 나타내었다. Table 1에서와 같이 pH 4.5 및 pH 6.5에서 β -galactosidase 活性이 높은 *Penicillium* sp.을 β -galactosidase 생산균주로 선정하였다.

Table 1. Extracellular β -Galactosidase Activity of Screened Fungi.

Microorganisms	Extracellular β -galactosidase activity (u/g solid culture)	
	at pH 4.5	at pH 6.5
<i>Penicillium</i> sp.	14	10
<i>cyclopium</i>	10	6
<i>Aspergillus</i>		
<i>awamori</i>	9	2
<i>flavus</i>	12	6
<i>niger</i> 1	13	2
<i>niger</i> 2	23	4
<i>oryzae</i> 1	11	5
<i>oryzae</i> 2	20	5
<i>oryzae</i> 3	13	3
<i>usamii</i>	48	5
<i>Rhizopus</i>		
<i>niveus</i>	2	1
<i>delemar</i>	2	1

배양시간과 酵素活性

밀기울 固体培地에서 30°C, 72시간 배양 하였을 때 Fig. 1 에서와 같이 β -galactosidase 생성이 제일 높았다.

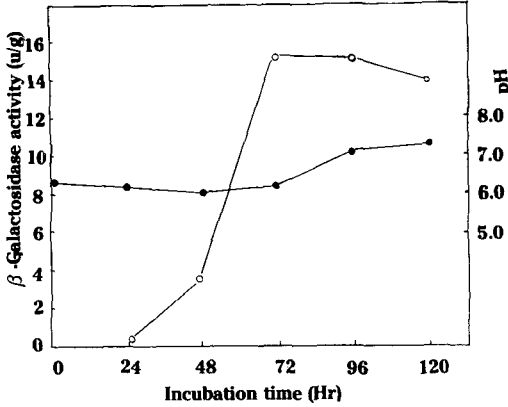


Fig. 1. Time Course of β -Galactosidase Production in Wheat Bran Culture by *Penicillium* sp.
o—o, β -galactosidase; ●—●, pH.

탄소원의 영향

밀기울 固体培地에서 여러가지 탄소원을 첨가하여 배양 하였을때 β -galactosidase 생성은 Table 2 에서와 같다. Feniksova 등⁽⁵⁾은 細菌, 酵母 및 곰팡이 液体培地에서 lactose 첨가에 의해 β -galactosidase 생성이 증가 되었다고 하였지만 밀기울 固体培地에서는 밀기울에 함유된 탄소원 외에 더 이상의 탄소원첨가는 β -galactosidase 의 생성을 증가시키지 못하였다.

Table 2. Effect of Carbon Source on β -Galactosidase Production

Carbon source	β -Galactosidase activity (%)
Control (no addition)	100
Galactose 1%	96
Glucose 1%	96
Lactose 1%	97
Sucrose 1%	102
Soluble starch 1%	106

질소원의 영향

밀기울 固体培地에서 여러가지 질소원을 첨가하여 배양하였을때 β -galactosidase 생성은 Table 3 에서와 같다. Tikhomirova 등⁽⁶⁾은 細菌 및 곰팡이 液体培地에서 NH_4NO_3 를 질소원으로서 첨가하였을때 β -galactosidase 생성이 증가 되었다고 한 바와 같이 밀기울 固体培地에서도 질소원의 종류에 따라 β -galactosidase 생성이 14%~85%까지 증가되었다.

Table 3. Effect of Nitrogen Source on β -Galactosidase Production

Nitrogen source	β -Galactosidase activity (%)
Control (no addition)	100
NH_4Cl 1%	155
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1%	135
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1%	135
$(\text{NH}_4)_2\text{CO}$ 1%	155
NH_4NO_3 1%	114
Peptone 1%	120
Yeast extract 1%	134
Defatted soybean flake extract 5%	185

β -Galactosidase의 정제

Tray培地에서 얻어진 酵素抽出液은 Table 4 와 같은 과정으로 정제를 하였다.

Table 4. Purification Procedure of β -Galactosidase

Crude extraction	
35% saturation of ammonium sulfate	
100% saturation of ammonium sulfate	
Sephadex G-25 gel filtration	
Duolite A-2 chromatography	
100% saturation of ammonium sulfate	
Sephadex G-25 gel filtration	
SP-Sephadex C-50 chromatography	
Concentration by ultrafiltration	
Ultrogel AcA 44 filtration	
Dialysis and concentration by dialysis membrane, ultrafiltration and collodion bag	
Hydroxyapatite chromatography	
Dialysis and concentration by collodion bag	
Hydroxyapatite chromatography	
Purified enzyme solution	

抽出: Tray에서 배양완료된 培養物을 마쇄한 후 培養物에 대해 5배량의 水道水를 加하여 실온에서 2시간동안 抽出한 다음 여과하였다.

Ammonium sulfate fractionation: 여과된 培養抽出液에 ammonium sulfate를 35% 飽和되게 가한 후 침전물질은 여과하여 제거하고 이 여과액에 ammonium sulfate를 첨가하여 100% 飽和되게 하여 酵素를 침전시켰다. 침전물은 celite層上에서 여액을 제거하고 증류수로 용해하였다.

Sephadex G-25 gel filtration: 효소침전 용액은 미리 0.1M acetate buffer (pH5.6)로 緩衝된 Sephadex G-25 gel column (7.5×75cm)을 사용하여 脱塩하였다.

Duolite A-2 chromatography: 脱塩된 酵素液은 2M acetate buffer (pH 5.6)로 0.5M이 되게 조절하고 미리 0.5M acetate buffer (pH5.6)로 緩衝된 Duolite A-2 column (3.0×66cm)을 통과시켜 脱色하였다.

SP-Sephadex C-50 column chromatography: 脱色된 酵素液에 ammonium sulfate를 100% 飽和되게 加하여 酵素를 침전시키고 침전된 酵素는 0.01M acetate buffer (pH5.6)로 용해하여 미리 이 buffer로 緩衝된 SP-Sephadex C-50 column (3.0×66cm)에 吸着시켰다. 吸着된 酵素는 0.05M acetate buffer (pH5.6)에 NaCl을 加해서 NaCl의 濃度を 0에서 0.4M까지 linear gradient로 上昇시켜 溶出시켰다. 流速은 30ml/hr로 각 fraction은 10ml씩 하였다. 그 결과는 Fig. 2와 같다. 이 酵素活性

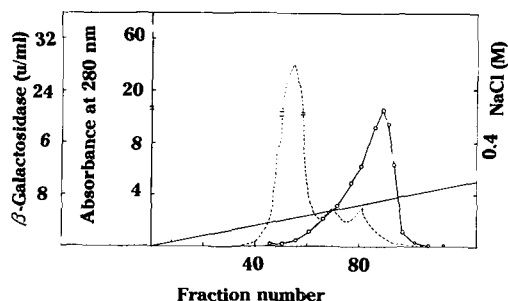


Fig. 2. SP-Sephadex C-50 Column Chromatography of β -Galactosidase.

Fractions of 10 ml were collected at a flow rate of 30 ml per hr. \circ - \circ β -galactosidase activity; —, protein; —, NaCl.

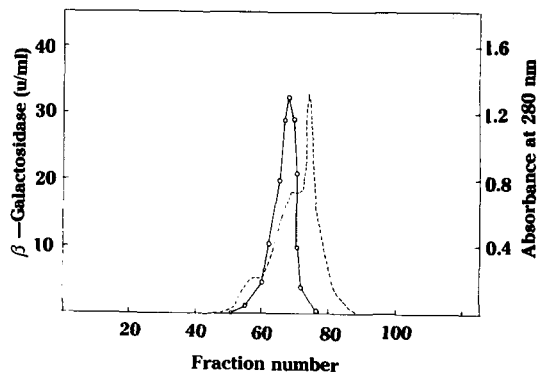


Fig. 3. Ultrigel AcA 44 Filtration of β -Galactosidase.

Fractions of 10 ml were collected at a flow rate of 30 ml per hr. \circ - \circ , β -galactosidase activity; —, protein.

fraction들 (fraction No. 72~95)은 합하여 Diafilter G-10T membrane ultrafiltration에 의해 濃縮하였다.

Ultrigel AcA44 filtration: Ultrafiltration에 의해 濃縮된 酵素液은 미리 0.1M NaCl을 함유한 0.01M acetate buffer (pH5.6)로 緩衝된 Ultrigel AcA44 column (3.5×130cm)을 통해 여과하였다. 流速은 30ml/hr.로 각 fraction은 10ml씩 하였다. 그 결과는 Fig. 3과 같다. 이 여과된 酵素活性 fraction들 (fraction No. 59~70)은 pH7.0, 0.005M phosphate buffer를 透析液으로 하여 dialysis membrane에 의해 透析한 후 ultrafiltration과 collodion bag에 의해 濃縮하였다.

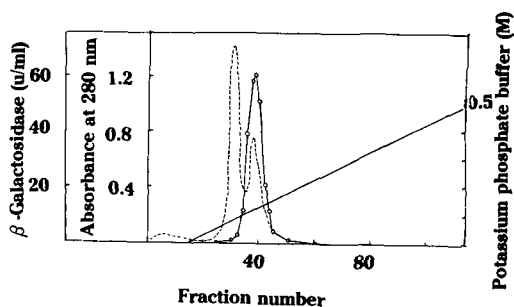


Fig. 4. Hydroxyapatite Chromatography of β -Galactosidase.

Fractions of 5 ml were collected at a flow rate of 30 ml per hr. \circ - \circ , β -galactosidase; —, protein; — potassium phosphate buffer (pH 7.0).

Table 5. Purification of β -Galactosidase

Stage	Total activity (u)	Specific activity (u/mg)	Recovery (%)
Crude extraction	8954	0.02	100
35-100% saturation of $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	8757	0.07	97
Sephadex G-25 gel filtration	7881	0.13	88
Duolite A-2 chromatography	6308	0.29	70
100% saturation of $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	5416	0.29	60
Sephadex G-25 gel filtration	4674	0.29	52
SP-Sephadex C-50 chromatography	2947	17.00	33
Ultrogel AcA 44 filtration	1802	32.10	20
Hydroxyapatite chromatography	1625	89.10	18
Hydroxyapatite chromatography	941	101.00	11

Hydroxyapatite chromatography : 透析 및 濃縮된 酵素液은 미리 pH7.0, 0.005M phosphate buffer로 緩衝된 hydroxyapatite column (2.6×15cm)에 吸着시켰다. 吸着된 酵素는 0.005M phosphate buffer (pH7.0)에서 0.5M phosphate buffer (pH7.0)까지 linear gradient로 上昇시켜 溶出시켰다. 流速은 30ml/hr로 각 fraction은 5 ml씩 하였다. 그 결과는 Fig. 4와 같다. 이 酵素活性 fraction들 (fraction No. 36~45)을 합하여 0.005M phosphate buffer (pH7.0)로 collodion bag에 의해 透析 및 濃縮하여 재차 같은 조건으로 hydroxyapatite chromatography를 하였다. 그 결과는 Fig. 5와 같다. 이때 酵素活性 fraction들 (fraction No. 37~45)을 합하여

0.0 acetate buffer (pH 5.6)로 dialysis membrane에 해 透析하였다.

각 , 제과정에서의 결과는 Table 5와 같다. 최종적으로 Fig. 5에서 얻어진 β -galactosidase의 比活性은 101u/mg protein으로 5050배 정제되었으며 収率は 11%이었다.

β -Galactosidase의 純度檢定

Analytical ultracentrifuge에서 최종적으로 정제

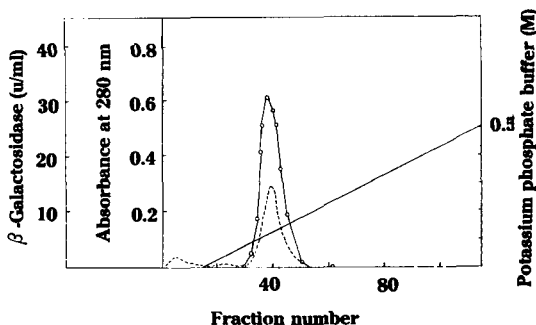


Fig. 5. Hydroxyapatite Chromatography of β -Galactosidase.

Fractions of 5 ml were collected at a flow rate of 30 ml per hr. o—o, β -galactosidase; —, protein; —, potassium phosphate butter (pH 7.0).

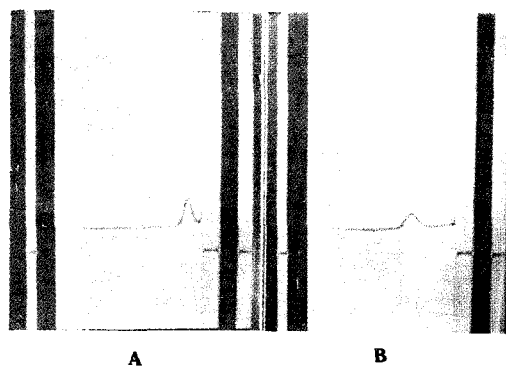


Fig. 6. Ultracentrifugal Patterns, Obtained in the Hitachi Model 282 Analytical Ultracentrifuge, of β -Galactosidase after Purification on Hydroxyapatite Chromatography (2nd).

Sample protein, 6 mg per ml of 0.5 M NaCl solution; ultracentrifugation, 60000 rpm at 20°C; photographs, at 10 minutes (A) and 40 minutes (B).

된 β -galactosidase는 Fig. 6 과 같이 單一蛋白으로서 對稱인 Schlieren pattern을 나타내었다. Disc electrophoresis에서는 Fig. 7 과 같이 單一band로서 電氣泳動되었고 泳動된 β -galactosidase 活性band와 일치하였다.

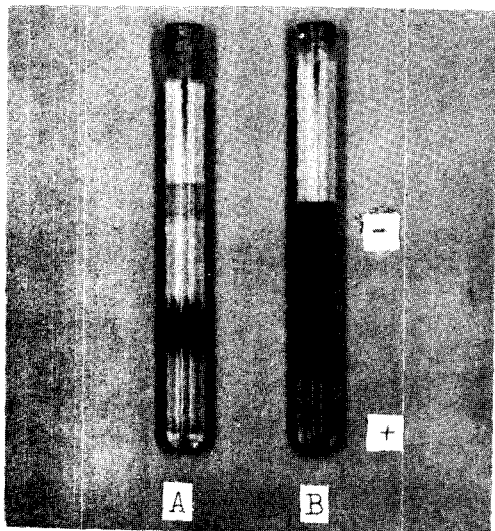


Fig. 7. Disc Electrophoresis of Purified β -Galactosidase and Localization of Enzymatic Activity.

Column, 3.75% polyacrylamide gel (0.5 x 7 cm); buffer, pH 8.3 buffer system; sample protein, 70 ug; electrophoresis, 2 mA per column for 3 hr at 4°C; A, stained with coomassie brilliant blue; B, stained with 6-bromo-2-naphthyl- β -D-galactopyranoside and fast blue salt B.

요 약

토양에서 분리된 여러가지 곰팡이류 가운데 β -galactosidase 分泌力이 강하고 中性부근에서 酵素安定性이 높은 *Penicillium* sp. 균주를 β -galactosidase 생산균주로 선정하였다.

이 균주는 밀기울 固体培地에서 30°C 72시간 배양에서 β -galactosidase 分泌力이 가장 높았으며 질소원 첨가배지에서 질소원의 종류에 따라 14%~85%까지 증가되었다.

固体培地에서 얻은 酵素抽出液을 ammonium sulfate fractionation, SP-Sephadex C-50 chroma-

tography, ultrogel AcA44 filtration, hydroxyapatite chromatography 등에 의하여 比活性度는 101 units/mg protein으로 5050배 정제되었다.

최종적으로 정제된 β -galactosidase는 analytical ultracentrifuge에서 單一蛋白으로 Schlieren pattern을 나타냈고 Disc electrophoresis에서는 單一band로서 電氣泳動되었으며 泳動된 β -galactosidase 活性band와 일치하였다.

참 고 문 헌

- 1) Pomeranz, Y. : *Food Technol.*, **88**, 682 (1964)
- 2) Pomeranz, Y. : *Ibid.*, **96**, 690 (1964)
- 3) Shukla, T.P. : *Crit. Rev. Fd. Technol.*, **5**, 325 (1975)
- 4) Woychik, J.H. and V.H. Holsinger : *Am. Chem. Soc. Symp. S.S.R.*, **47**, 67 (1977)
- 5) Feniksova, R.V., A.S. Tikhomirova, A.N. Kulikova and V.D. Kuzenezov : *Micorbiol.*, **37**, 836 (1968)
- 6) Tikhomirova, A.S., A.K. Kulikova and R.V. Feniksova : *Microbiol.*, **43**, 212 (1974)
- 7) Craven, G.R., E. Steers Jr. and C.B. Anfinsen : *J. Biol. Chem.*, **240**, 2468 (1965)
- 8) Mahoney, R.R. and J.R. Whitaker : *J. Food Sci.*, **43**, 584 (1978)
- 9) Lee, Y.C. and V. Wacek : *Arch. Biochem. Biophys.*, **138**, 264 (1970)
- 10) Widmer, F. and J.L. Leuba : *Eur. J. Biochem.*, **100**, 559 (1979)
- 11) Tanaka, Y., A. Kagamiishi, A. Kiuchi and T. Horiuchi : *Technol.*, **58**, 115 (1980)
- 12) Ogushi, S., T. Yoshimoto and D. Tsuru : *J. Ferment. Technol.*, **58**, 115 (1980)
- 13) 日本生化学編, 酵素研究法(下), 東京化学同人, 343 (1976)
- 14) Davis, B.J. : *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404 (1964)
- 15) Erickson, R.P. and E. Steers Jr. : *J. Bacteriol.*, **102**, 79 (1970)
- 16) Lowry, O. H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall : *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)