

beta-Galactosidase의 고정화 및 응용에 관한 연구

제2보: *Aspergillus niger* CAD 1의 효소 고정화 조건 및 고정화 효소의 성질

이용규 · 전순배* · 최원기** · 정기철 · 배석* · 김관천*

전남대학교 농과대학 낙농학과
*전남대학교 자연과학대학 생물학과
**전남대학교 자연과학대학 화학과
(1986년 12월 10일 접수)

Studies on immobilization and application of beta-galactosidase

II. Preparation and properties of the immobilized enzyme from *Aspergillus niger* CAD 1

Yong-Kyu Lee, Soon-Bae Chun,* Won-Ki Choi**, Ki-Chul Chung, Suk Bae*
and Kwan-Chun Kim*

Department of Dairy Science, College of Agriculture, Chonnam National University
**Department of Biology, College of Natural Sciences, Chonnam National University*
***Department of Chemistry, College of Natural Sciences, Chonnam National University*
(Received December 10, 1986)

Abstract

The beta-galactosidase of *Aspergillus niger* CAD 1 described in previous report was immobilized to cellulose triacetate. The optimal conditions for immobilization of the enzyme were obtained when 13%(v/v) of the soluble enzyme (349 unit/ml) was entrapped in fiber prepared from 10%(w/v) cellulose triacetate in methylene chloride. The optimal temperature and pH for the activity of the immobilized enzyme were 45°C and 4.5, respectively, which showed the same values as those of the soluble enzyme. It was found that K_m of the immobilized enzyme for lactose exhibited high value compared with that of the soluble enzyme. The immobilized enzyme showed good storage stability, reusability, and also hydrolysis of lactose when introduced into skim milk and acidic whey.

서 론

일반적으로 효소는 그 활성이 불안정하고 효소 반응은 반응후 생성물과 효소의 분리가 매우 어려우며 많은 시간과 노력을 통하여 얻은 값비싼

효소의 재사용이 불가능하여 이 결과 연속반응공정을 어렵게 한다. 이와 같은 문제점을 해결하는 방법중 효소의 고정화가 매우 유용한 방법으로 인정되어 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.^{1~5)}

beta-galactosidase의 고정화는 우유 및 유제품 중의 유당을 분해하는데 이용하므로써 경제성, 연속반응의 자동화, 안정성 및 불순물 혼입방지 등을 목적으로 연구되어 왔다.⁶⁾ 제1보에서는 토양으로부터 beta-galactosidase를 균체의로 다량 생산하는 *Aspergillus niger* CAD 1을 선별하여 이 균주의 기본성질에 관하여 보고한 바 있다.⁷⁾ 본 연구에서는 선별한 균주로 부터 정제한 효소를 저유당유·제조에 효과적으로 이용하기 위한 기초 자료로 활용하기 위하여 효소의 고정화 조건 및 고정화 효소의 특성에 관하여 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 공시 효소

본 실험에서 사용한 beta-galactosidase는 제1보에서⁷⁾ 얻은 *Aspergillus niger* CAD 1의 정제된 효소를 사용 하였다.

2. 효소의 고정화

Morishi⁸⁾의 방법에 따라 Fig. 1과 같은 기구를 사용하여 다음과 같이 고정화 효소를 제조하였다.

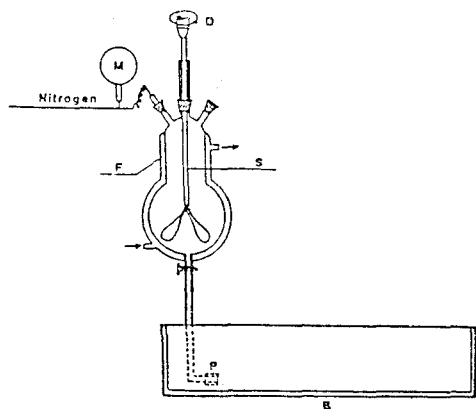


Fig. 1. Diagram of apparatus for entrapping enzyme in fiber.

- D: variable-speed motor
- M: pressure control
- F: jacked round-bottom flask
- S: stirrer
- P: spinneret
- B: coagulating bath

다. 즉 둥근바닥 후라스크에 20g의 cellulose triacetate를 200ml의 methylene chloride에 넣고 실온에서 서서히 용해시킨 후에 0℃로 냉각하였다. 여기에 30% glycerol 0.1M acetate buffer (pH 5.0)에 용해시킨 효소를 조금씩 첨가하면서 교반속도를 서서히 증가시켜 400rpm이 될때까지 30분간 교반후 균일한 현탁액이 되도록 실온에서 약 30분간 방치한 다음에 질소가스 압력을 가하여 현탁액을 사출기(spinneret)를 통하여 toluene 조에서 응고시켜 섬유상의 고정화 효소를 조제하였다. 또한 고정화 효소는 유기용매를 제거하기 위하여 실온에서 약 1시간 놓아둔 다음에 4℃로 보관하면서 실험에 사용하였다.

3. 효소활성의 측정

수용성 효소는 제1보⁷⁾의 방법에 따라 측정 하였으며, 고정화 효소는 고정화 효소 0.1g에 0.1M Na-acetate buffer (pH 5.0) 2ml와 4mM ONPG 2ml를 혼합하여 45℃에서 30분간 진탕하면서 반응시킨후 1M Na₂CO₃ 0.4ml를 가하여 효소반응을 중지시킨 다음에 반응액을 취하여 수용성 효소와 같은 방법으로 측정 하였다. 효소 활성단위는 1 분동안에 1 micromole의 ONP를 생산하는 효소량을 1단위로 하였다.

4. 단백질의 정량

Lowry등⁹⁾의 방법에 따라 bovin serum albumin을 표준단백으로 하여 정량 하였다.

5. 유당 분해율의 측정

500ml flask에 고정화 효소 1.0g(275 unit)를 50ml의 탈지유(4.8% 유당, pH 6.8), 4.8% 유당액(pH 6.8), 유청(4.0% 유당, pH 4.6)등에 각각 넣은후 45℃에서 10시간 동안 반응 시키면서 생성된 glucose의 양을 2시간 간격으로 Raabo와 Terkildsen¹⁰⁾의 방법에 의하여 측정 하였다.

결과 및 고찰

1. 효소 고정화 조건

- 1) 담체 및 효소 농도의 영향
- methylene chloride를 용매로 사용하여 cellu-

lose triacetate의 농도에 따른 섬유형성을 조사한 결과는 Table 1과 같이 10% cellulose triacetate를 사용하였을 때에 가장 좋은 결과를 나타내었다. 또한 위의 담체 최적 조건하에서 효소 농도가 섬유 형성에 미치는 영향을 검토 하였던 바 Table 2와 같이 첨가한 효소의 농도가 15% 이상에서는 섬유 형성이 되지 않았으며 13%에서 가장 좋은 결과를 나타내었다.

2) 포괄반응 시간, 섬유 절단길이 및 진탕 속도의 영향

효소와 담체의 포괄반응 시간, 섬유 절단길이, 진탕속도등이 효소활성에 미치는 영향을 조사한 바는 각각 Table 3, 4, 5와 같다. 포괄반응 시간을 10분에서 50분까지 조사 하였던 바 30분 반응 시간이 가장 좋았으며, 섬유의 절단길이는 효소활성에 거의 영향을 미치지 않았다. 또한 진탕속도를 30 stroke/min에서 300 stroke/min까지 조절 하면서 효소 활성을 조사하였던 바 150 stroke/min이 최적조건 이었다.

Table 1. Effect of cellulose triacetate concentration on filament formation.

Cellulose triacetate (g/100ml of methylene chloride)	Filament formation*
5	++
10	+++
15	+
20	-
25	-

* +: good, ++: better,
+++ best, -: no formation.

Table 2. Effect of enzyme concentration on filament formation.

Enzyme concentration(%)	Filament formation*
5	+
10	++
13	+++
15	++
20	-
25	-

* +: good, ++: better,
+++ best, -: no formation.

Table 3. Effect of entrapping reaction time on the activity of immobilized enzyme.

Reaction time(min)	η (%)*
10	38
20	45
30	58
40	51
50	46

* Percentage of enzyme activity entrapped in fiber compared to the soluble enzyme.

Table 4. Effect of fiber-length on the activity of immobilized enzyme.

Fiber-length(cm)	η (%)*
1	57
3	59
5	58
7	58
10	58

* Percentage of enzyme activity entrapped in fiber compared to the soluble enzyme.

Table 5. Effect of shaking rate on the activity of immobilized enzyme.

Shaking rate(stroke/min)	η (%)*
90	46
120	55
150	63
180	58
200	58

* Percentage of enzyme activity entrapped in fiber compared to the soluble enzyme.

2. 고정화 효소의 특성

1) 온도 및 pH의 영향

고정화 효소의 활성에 미치는 온도의 영향을 검토하기 위하여 온도 25℃에서 70℃까지 검토한 결과는 Fig. 2와 같으며 최적온도는 45℃로서 수용성 효소와 같았다. 또한 pH의 영향을 검토하기 위하여 pH3.0에서 pH8.0까지 pH별로 검토 하였다. Fig. 3에 나타낸 바와 같이 최적 pH는 4.5로서 수용성 효소와 동일하였다. Weetall등¹¹⁾은 다

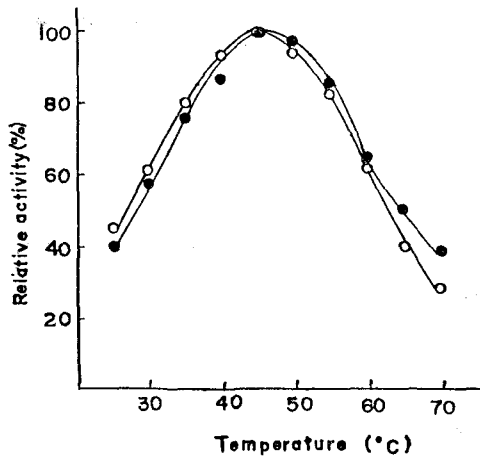


Fig. 2. Effect of temperature on the activity of immobilized enzyme.

○—○: soluble enzyme
●—●: immobilized enzyme

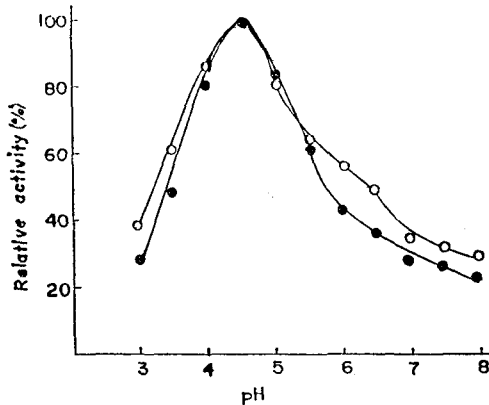


Fig. 3. Effect of pH on the activity of immobilized enzyme.

pH 3.0~6.5: 0.1M McIlvaine buffer
pH 7.0~8.0: 0.1M sodium phosphate buffer

○—○: soluble enzyme
●—●: immobilized enzyme

공성 유리를 사용하여 *Aspergillus niger*의 beta-galactosidase를 고정화 했을때 최적 pH가 4.5에서 3.5로 변함을 보고한 바 있는데, 효소를 고정화 했을때에 최적 pH의 변화는 바람직하지 않음을 고려해 볼때 담체로서 cellulose triacetate를 이용하는 것이 다공성 유리보다 더 좋은 것으로 보여진다.

2) 열 안정성

온도가 고정화 효소의 안정성에 미치는 영향을

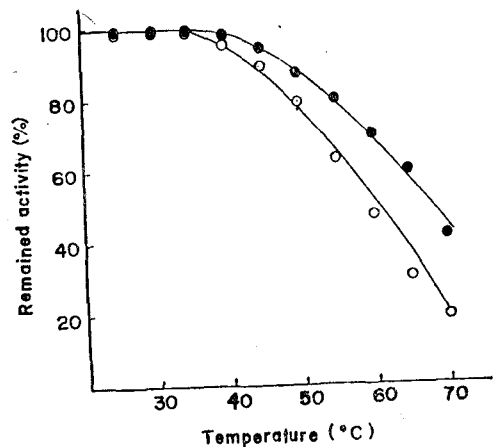


Fig. 4. Thermal stability of immobilized enzyme after 24 hr.

○—○: soluble enzyme
●—●: immobilized enzyme

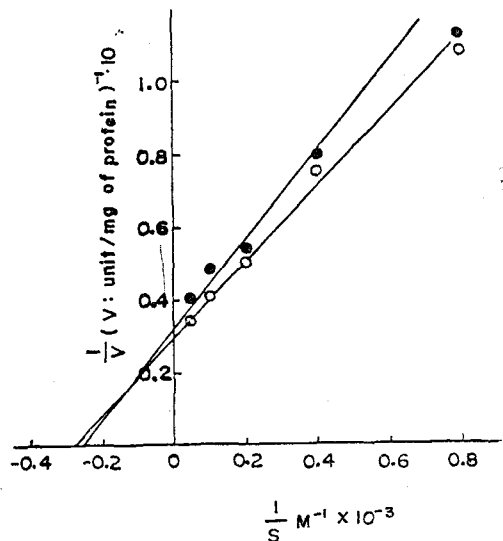


Fig. 5. Lineweaver-Burk plot of immobilized enzyme for ONPG as substrate.

○—○: soluble enzyme
●—●: immobilized enzyme

알아보기 위하여 온도 30°C에서 70°C까지 5°C 간격으로 각각 24시간 후의 잔존활성을 조사하였던 바 Fig.4에서 보여준 바와 같이 50°C에서 고정화 효소는 약 90%, 수용성 효소는 약 80%의 잔존활성을 나타내었는 바, 이것은 고정화에 의해서 열안정성이 증가되었음을 말해 주고 있다. 한편

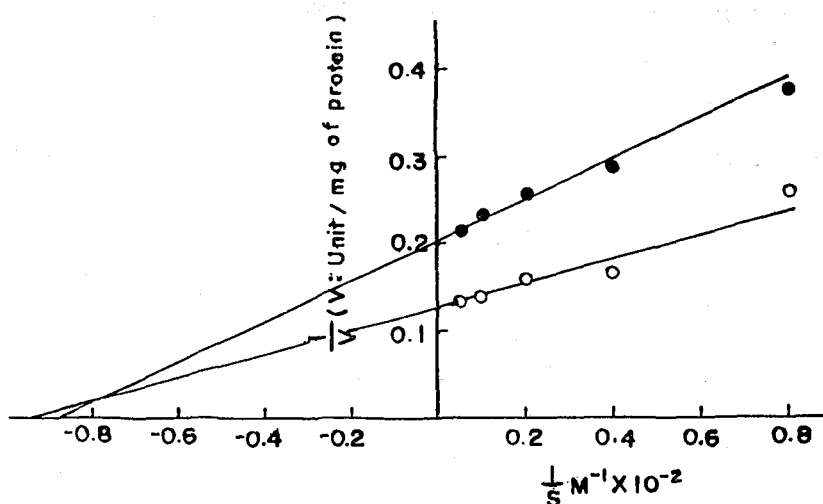


Fig. 6. Lineweaver-Burk plot of immobilized enzyme for lactose as substrate.

○—○: soluble enzyme
●—●: immobilized enzyme

Table 6. Kinetic parameters for the soluble and immobilized beta-galactosidase.

Enzyme	Substrate	Km(mM)	Vmax
Soluble beta-galactosidase	ONPG	3.57	33.0
Immobilized beta-galactosidase	ONPG	3.85	30.3
Soluble beta-galactosidase	Lactose	83.3	15.38
Immobilized beta-galactosidase	Lactose	117.0	5.0

○등¹²⁾은 *Penicillium* sp.에서 얻은 beta-galactosidase를 formaldehyde를 이용하여 고정화한 결과 50℃에서 24시간후에 80%의 잔존활성을 나타내었다고 보고한 바였다.

3) 효소의 반응속도

고정화 효소와 수용성 효소의 기질농도에 따른 반응속도를 비교하기 위하여 Lineweaver-Burk plot¹³⁾에 따라 ONPG는 Fig.5에서 유당은 Fig.6에서 Michaelis constant (Km)와 maximum velocity(Vmax)를 구하였던바 그 비교수치는 Table 1과 같다. Table 1에서 보여준 바와 같이 ONPG의 Km값은 거의 변화가 없으나 유당에서는 1.4배로 증가하였다. 이와 같은 결과는 *E. coli*의 beta-galactosidase를 나이론에 고정화한 Baik¹⁴⁾등의 결과와 유사하였다. 한편 유당에 대한 고정화 효소의 Vmax는 수용성 효소에 비하여 약 1/3배로

감소하였는데 이것은 Kilara¹⁵⁾등이 *Saccharomyces lactis*의 beta-galactosidase를 agarose에 고정화하였던 결과와 같은 경향을 보여 주었다.

4) 효소의 저장안정성

고정화 효소를 4℃에서 90일간 저장한 후에 잔존 효소활성을 조사한 결과는 Fig.7에서 보여준 바와 같이 약 90%의 효소활성을 유지하였는데, 이와같은 결과는 Morishi등⁸⁾이 cellulose triacetate에 고정화한 효소의 beta-galactosidase의 저장안정성과 비슷한 경향을 보여주었다.

5) 효소의 재이용성

고정화 효소를 반복사용함에 따른 효소활성 감소여부를 알아보기 위하여 4℃에 보관하면서 4.8%유당(pH 6.8)을 기질로 하여 45℃에서 1일 간격으로 5회까지 잔존활성을 측정하였던바 Fig.8과 같이 5회 사용후에도 70%의 잔존 효소활성을

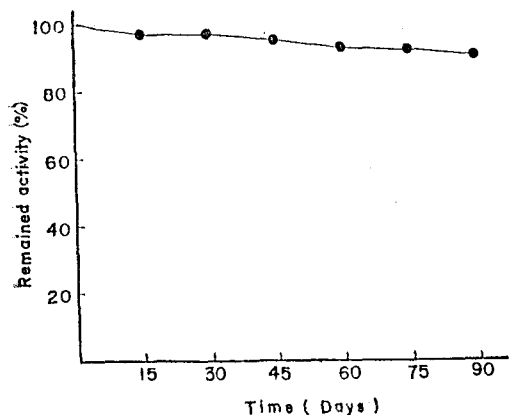


Fig. 7. Storage stability of immobilized enzyme at 4°C.

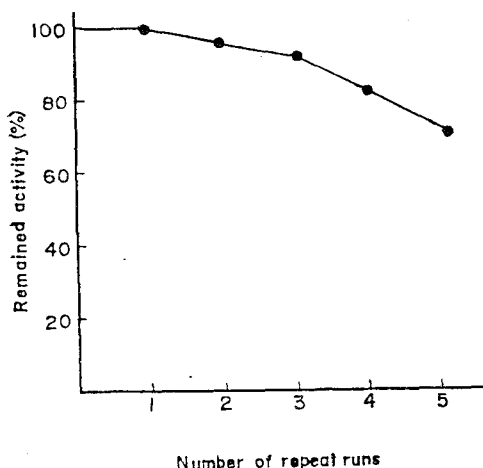


Fig. 8. Reusability of immobilized enzyme at 45°C for 5 days.

나타내었다. Baik등¹³⁾은 *E. coli*의 beta-galactosidase를 나이론에 고정화 하고 24시간 동안 5 회 연속사용후 50%의 잔존활성을, Giacini등¹⁴⁾은 앞서 Baik등¹⁴⁾의 방법에서 담체만 다르게 한 다음에 같은 조건에서 collagen에 고정화한 경우에는 24%의 잔존활성을 보였음과 비교해 볼때, 본 실험에 담체로 사용한 cellulose triacetate가 이 들보다 효과적임을 알 수 있었다.

5) 유당 분해율

고정화 효소를 이용하여 탈지유, 유당용액 그리고 유청을 대상으로 유당 분해율을 조사하였던

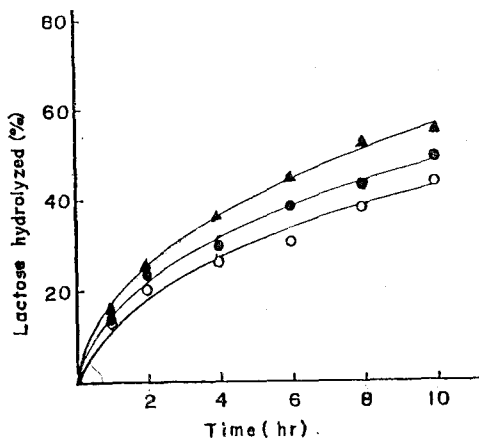


Fig. 9. Hydrolysis of lactose by immobilized enzyme (275 unit in 1g fiber) at 45°C.

○—○: skim milk (4.8% lactose, pH 6.8)
●—●: 4.8% lactose solution (pH 6.8)
▲—▲: acid whey (4% lactose, pH 4.6)

바 Fig.9에서 보여준 바와 같이 탈지유(유당 4.8%)에서 44%, 유당용액(유당 4.8%)에서 50%, 유청(유당 4.0%)에서 57%의 유당분해율을 나타내었다.

요 약

제1보⁷⁾에서 보고한 *Aspergillus niger* CAD 1의 beta-galactosidase를 cellulose triacetate를 담체로 하여 고정화조건을 검토하였던바, 13%(v/v)의 정제된 효소와 10%(w/v)의 cellulose triacetate를 30분간, 150stroke/min으로 진탕하면서 포팔시킨 고정화 효소의 활성이 가장 좋았다. 고정화 효소의 최적온도는 45°C, 최적 pH는 4.5로서 수용성 효소의 것과 같았다. 기질로서 ONPG와 유당에 대한 Km값은 각각 $8.3 \times 10^{-3}M$ 과 $117.0 \times 10^{-3}M$, Vmax값은 각각 $30.3 \times 10^{-3}M$ 과 $5.0 \times 10^{-3}M$ 이었다. 본 고정화 효소는 4°C에서 90일간 저장시에 90%, 45°C에서 5회 사용후에 70%의 잔존활성을 나타냈으며 유당분해율도 좋았다.

사 사

본 연구는 1985년도 문교부 지원의 유전공학 연구를 위한 학술연구 조성비에 의하여 수행되었으며 관계하신 여러분께 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. William Stanlly and A.C. Olson: *J. Food Sci.*, **39**, 660 (1974).
2. Olson, N.F. and T. Richardson: *J. Food Sci.*, **39**, 653 (1974).
3. Richmond, M.L., J.I. Gray, and C.M. Stine: *J. Dairy Sci.*, **64**, 1759 (1981).
4. Saburo Fukuti and Atsuo Tanaka: *Am. Rev. Microbiol.*, **36**, 145 (1982).
5. Herbert, O.H.: *Food Technol.*, **32**, 35 (1978).
6. Greenberg, N.A. and R.R. Mahony: *Process Biochemistry*, Feb./March 2 (1981).
7. Lee, Y.K., S.B. Chun, W.K. Choi, K.C. Chung, S. Bae, and K.C. Kim: *J. Kor. Society of Food and Nutrition*, **15**(4), in press (1986).
8. Morisi, F., M. Pastore, and A. Vigilla: *J. Dairy Sci.*, **59**, 1123 (1972).
9. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 205 (1951).
10. Raabo, E. and Terkildsen: *Scan. J. Clin. Lab. Invest.*, **12**, 402 (1960).
11. Weetal, M.M., Harewala, N.B., Pritcher, W.M. Jr., Detar, C.D., Vann, W.P.: *Biotech. Bioeng.*, **16**, 295 (1984).
12. O.P.S., Y.J. Choi, and H.C. Yang: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **11**(4), 219 (1983).
13. Segel, I.H.: John Wiley and Sons, Ins. pp.278~281 (1976).
14. Baik, O.R., R. Uy and S.M. Byun: *Kor. J. Food Sci. Technol.*, **12** (1) 45 (1980).
15. Kilara, A., K.M. Shahani and F.W. Wagner: *Labeusmi Hel-Wineschaft Technol.*, **10**, 84 (1977).
16. Giacin, J.R., J. Kabowski, J.C. Leader, S.G. Gilbert and D.H. Kleyn: *J. Food Sci.*, **39**, 751 (1974).