

β-Galactosidase를 생산하는 호알카리성 세균에 관한 연구

— 균주의 분리 및 배양조건 (I) —

* 윤성식 · 민도식 · 유주현

* 부천공업전문대학 식품영양과
연세대학교 식품공학과
(1988. 12. 22 수리)

A study on Alkalophilic Bacteria Producing β-Galactosidase. — Isolations and Cultural Characteristics (I) —

* Sung-Sik Yoon, Do-Sik Min, Ju-Hyun Yu

* Dept. of Food and Nutrition, Bucheon Technical College,
Bucheon, Kyunggi-do, Korea
Dept. of Food Engineering, Yonsei Univ., Seoul, Korea
(Received December 20, 1988)

Abstract

A strain of alkalophilic *Bacillus* sp. YS-309 has been isolated from domestic soil. It belongs to genus *Bacillus* from its morphological and biochemical characteristics. The strain grows better in the alkaline media rather than in the neutral media. The optimum pH and temperature for growth were observed at 8.5 and 40°C, respectively. Glucose, lactose and maltose were appeared as good carbon source but soluble starch and fructose were utilized uneffectively for growth. Concentrations of lactose had affected both the cellular growth and the enzyme productions. The maximum growth and the highest enzyme productions were obtained at 0.5%(w/v) of lactose added in the media.

β-Galactosidase from *Bacillus* sp. YS-309 was produced inducibly into the cell and total enzyme activities per ml were gradually decreased when the concentration of glucose increased.

I. 서 론

호알카리성세균은 1922년 *Nitromomas*와 *Nitrobacter*에 관한 보고¹⁾ 이래 관심과 흥미를 끌고있는 미생물로 최근 국내에서도 활발히 연구가 진행되고 있다.²⁻⁵⁾

이 세균은 정상적인 환경보다 높은 알카리 조건이라는 극한 환경에서 오히려 생육이 왕성하여 미생물이나 그 분비효소를 식품공업이나 생물화학 공업에 이용할 경우 잡균의 오염을 방지하고 공정을 단축시킬수 있는 장점이 있어 산업적으로 유용한 미생물이다. Alkaline protease에 관한 Horli-

koshi의 보고⁷⁾이후 호알카리성 세균이 생산하는 효소를 살펴보면 amylase⁸⁾, CGTase⁹⁾, pectinase¹⁰⁾, α -galactosidase¹¹⁾, xylanase¹²⁾, β -lactamase¹³⁾, cellulase 등 20여종이 발표된 바 있다.

β -Galactosidase는 일명 lactase로 불리며 자연계에는 milk중에 주로 존재하는 lactose의 β -1, 4-galactoside결합을 가수분해하는 효소로서 아시아나 아프리카인에 흔한 유당불내증(lactose intolerance)을 치료하거나 lactose의 감미를 향상 시키는데 사용될 수 있다.¹⁴⁾ 또 제빵이나 동결유제품 제조시 사용하여 품질을 개선시킬 수 있으며, whey부산물 처리에도 중요한 효소이다.¹⁵⁾

본 연구는 자연계에 널리 존재하며 유가공업에 중요한 효소인 β -galactosidase를 탐색하기 위하여 호알카리성 세균을 토양으로부터 1차 screening하고, 1차 분리균주중에서 β -galactosidase활성이 가장 우수한 균주를 선발하여 미생물학적, 생화학 특성을 조사하고 배양조건을 연구한 결과이다.

II. 실험재료 및 방법

1. 균주의 분리 및 배지조성

전국의 각지로부터 채집하여둔 토양시료를 사

Table 1. Medium composition for the isolation of alkalophilic bacteria producing β -galactosidase.

Ingredients	%
Raffinose(α -)	0.5
Lactose(β -)	0.5
Polypeptone	0.5
Yeast extract	0.5
KH ₂ PO ₄	0.1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.02
Na ₂ CO ₃	1.0
Agar	2.0
PNPG	mg/ml
pH	10.2

용하여 β -galactosidase생산능이 있는 세균을 분리하였다. 토양시료를 멸균증류수에 현탁시킨다음 이 현탁액을 알카리성 평판 기본 배지상에 도말하여 37°C에서 3일간 배양하였다.

생육된 colony중에서 외관상 상이한 균주들을 각각 사면배지 이식하여 4°C에서 보존하면서 효소생성능을 조사하였다. 분리배지 조성은 Table 1에 표시하였다. 단 α -galactosidase활성 유무는 lactose대신 탄소원을 raffinose를 첨가하여 관찰하였다.

2. 분리균의 동정

분리균의 동정은 전자 현미경 사진을 통하여 형태적 특징을 관찰한 다음 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology¹⁶⁾에 준하여 동정을 실시하였다.

3. 생육측정

분리균의 생육특성과 효소생산을 검토하기 위한 배지의 조성은 다음과 같다.

0.5%, glucose(lactose); 0.5%, polypeptone; 0.5%, yeast extract; 0.1%, KH₂PO₄; 0.02% MgSO₄·7H₂O와 별도로 멸균한 Na₂CO₃를 농도가 1%가 되게 첨가하여 최종 pH를 10.2로 조절하였다. 기본배지에서 하루밤 배양시킨 종 배양액을 0.2~0.5% 되게 접종한 다음 37°C에서 230 rpm으로 회전 진탕배양하였으며 균체생육은 550 nm파장에서 흡광도를 측정하여 균체 생육량으로 표시하였다.

건조 균체량은 원심분리한 균체를 80°C에서 4시간 건조한후 측정하였다.

4. 효소의 활성측정

β -Galactosidase활성측정은 Ito¹⁷⁾등의 방법을 변형하여 p-nitrophenyl- β -D-galactoside(PNPG, Fluka)로부터 유리되는 p-nitrophenol의 양을 측정하였다. 조효소액 0.1ml와 100mM Na-phosphate buffer(SPB, pH 7.5)을 0.8ml을 빈 시험관에 넣고 혼합한 다음 0.1% PNPG용액 0.1ml을 재빨리 가하여 vortexing한후 37°C water-bath중에서 반응시켰다. 10분후 0.4M Na₂CO₃용액 2ml을 가하여 반응을 중지시킨 다음 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

효소 1단위는 반응시간 분당 PNPg로 부터 생성되는 p-nitrophenol의 μmole 수로 정의하였다.

5. 조효소액의 조제

배양이 끝난 균체를 100mM Na-phosphate buffer (pH 7.5)로 2회 세척하였다.

이것을 동일 완충액에 재현탁시키고 Ice-bath중에서 Sonicator(Fischer Co)를 사용하여 10초 간격으로 3~5회 초음파 처리하여 균체를 파쇄하고 15,000 rpm으로 1분간 원심분리한 상등액을 조효소액으로 하였다.

6. 시약

PNPg는 Fluka AG제품을, lactose등의 당류는 Zunsei제품을 사용하였으며 기타 시약은 제조원별로 일급 시약을 사용하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 균주의 분리

토양으로부터 β -galactosidase활성을 가진 세균을 분리하기 위하여 알칼리 기본 한천배지(pH10.2) 상에 colony 형태와 색이 상이하다고 판단되는 균주를 1차로 516주 분리하고 이것을 PNPg가 함유된 한천 배지에 접종하여 colony주변에 노란색으로 강하게 착색되는 균주를 5주 분리하였다(Fig.1). 이 5균주에 대하여 형태, 색, 효소활성을 측정 한 결과는 Table 2와 같았다. YS-235와 YS-376은 동

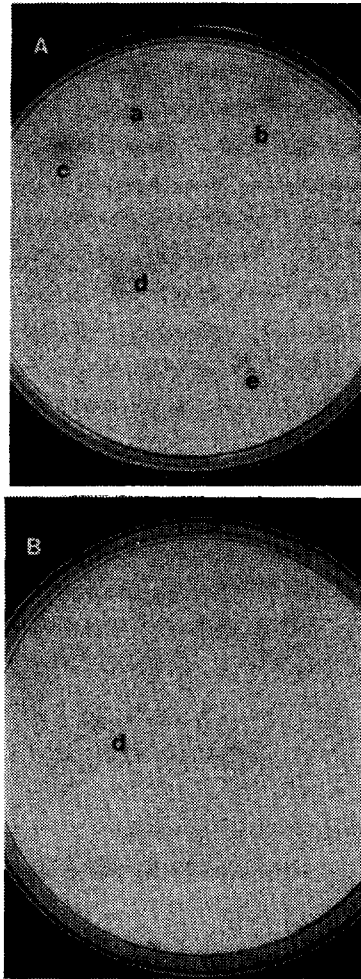


Fig. 1 Isolation of alkalophilic bacteria producing β -galactosidase from soil.

a : 7, b : 8, c : 235, d : 309, e : 376

Table 2. Morphology and enzyme production of alkalophilic isolates from soil.

Strains	Morphology	Color	β -galactosidase	α -galactosidase
YS-7	diplococcus	yellow	++	-
YS-8	rod	beige	++	+
YS-235	diplococcus	yellow	++	+
YS-309	rod	beige	+++	++
YS-376	diplococcus	yellow	++	+

+++ , strong ; ++ , moderate ; + , weak ; - , negative

일한 균주로 생각되었으며 이들 중에서 약한 α -galactosidase 활성이 존재하는 YS-309주가 가장 빠르고 진하게 착색되었으며 동일 조건의 액체배지에도 YS-309주의 효소활성이 가장 높았다. 이 분리균을 single colony isolation 과정을 거쳐 사면배지에 보존하면서 본 실험에 사용하였다.

2. 균주의 동정

분리균 YS-309의 형태적 특징을 조사하고자 위상차 현미경으로 spore의 유무를 확인한 다음 전자현미경사진을 촬영하였다. 이 균은 spore를 가지며 사진에 나타난 바와 같이 전형적인 rod 상을 하고 있었다(Fig. 2). 또 Table 3에 나타난 바와 같이

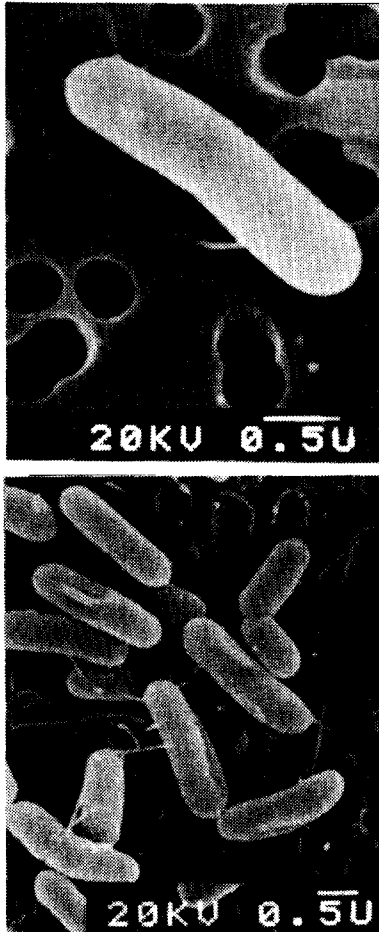


Fig. 2 Scanning electron microscopy of *Bacillus* sp. YS-309 isolated from soil.

Table 3. Cultural and biochemical characteristics of *Bacillus* sp. YS-309.

Morphological characteristics		
Form	rod (0.4-0.6 × 1.5-2.0 μ)	
Motility	+	
Gram stain	+	
Spore	+	
Cultural characteristics		
	Growth at pH 10.0	
	YS-309	C-125 ^a
Nutrient broth	++	++
Nutrient agar slant	++	++
Glucose nutrient broth	++	++
Nutrient broth plus 7% NaCl	+	++
Koser's citrate agar	++	++
Glucose nitrate agar	++	++
Growth temperature	up to 60 °C	
Biochemical characteristics		
Hydrolysis of gelatine	-	+
Hydrolysis of casein	-	+
Hydrolysis of starch	+	+
Voges-Proskauer test	-	-
Indole test	-	-
Urease test	-	-
Oxidase test	+	-
Catalase test	+	+
Utilization of sugars		
Arabinose	+	++
Xylose	+	++
Glucose	+	++
Fructose	+	++
Maltose	+	+
Sucrose	+	+
Lactose	+	++
Raffinose	+	+
Sorbitol	+	±
Mannitol	+	+
Inositol	+	+
Dextrin	+	+
Soluble starch	+	+

^a Ikura and Horikishi (1979)

이 균은 전형적인 *Bacillus*로 동정되었다. 기존에 Ikura와 Horikoshi가 유일하게 보고한 *Bacillus* sp. C-125와 그 특성을 상호 비교해 볼때 gelatine 액화력, casein가수분해능, oxidase test등이 상이한 것으로 관찰되었다. 크기도 $0.5 \sim 0.7 \times 4 \sim 10 \mu$ 인 C-125 주에 비해서 작았다.

따라서 *Bacillus* sp. YS-309주는 β -galactosidase 활성이 높은 새로운 미생물로 확인되었으며 정밀

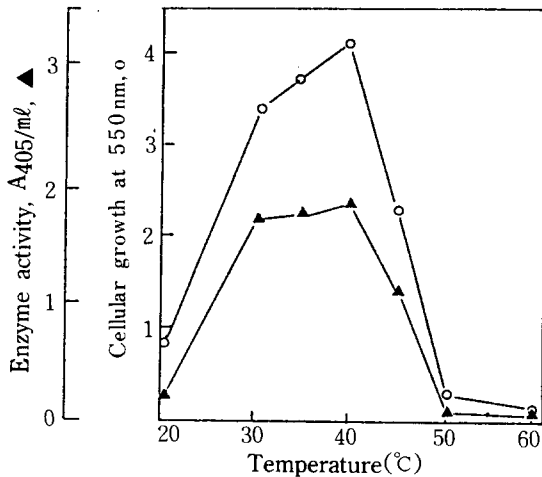


Fig. 3 Effect of temperature on the β -galactosidase production in the alkaline medium (pH 10.2).

한 동정절차를 통하여 species동정이 필요하다고 생각된다.

3. 분리균의 배양조건

온도 및 pH의 영향 : 배양온도를 20°C에서 60°C로 조절하여 알카리 배지에서 24시간동안 배양한 후 균체의 생육을 측정된 결과 40°C에서 가장 생육이 우수하였다(Fig.3). 또 배지에 lactose를 탄소원으로 첨가하고 초기pH를 4.0에서 11.0까지 조절하여 24시간동안 진탕배양한 후 균체의 생육을 측정된 결과 최적 pH는 8.5이상 9.0부근이었다(Fig.4).

탄소원 자화성 : glucose대신 탄소원으로 각종 당을 0.5%농도로 첨가한 알카리 배지에서 배양한 결과 glucose, lactose, maltose는 잘 자화하였으나 soluble starch, fructose는 잘 자화하지 못하였다. 효소생산은 lactose, maltose, soluble starch를 첨가하는 것이 다른 당을 첨가하는 것보다도 바람직한 것으로 나타났으며 특히 lactose의 첨가가 필수적으로 생각되었다 (Table 4).

효소생산에 미치는 lactose의 농도별 영향을 검토하기 위하여 알카리 배지에 lactose농도를 2.0%까지 첨가하여 측정된 결과는 Fig. 5와 같았다. 배지중에 lactose가 0.5%까지는 농도의 증가에 따라 균체생육이나 효소의 생산량이 증가하였으나 그

Table 4. Effect of sugars on the growth and β -galactosidase production in alkaline medium.

Sugars ^a	Dry cell weight (mg/100ml)	Enzyme activity (U/ml)
None	105	4.0
D-Glucose	365	2.5
D-Galactose	240	5.3
D-Xylose	225	7.5
D-Fructose	190	1.3
Sucrose	220	2.8
Maltose	260	13.4
Lactose	270	58.0
Soluble starch	180	9.4

^a Final concentration of sugars : 0.5%(w/v)

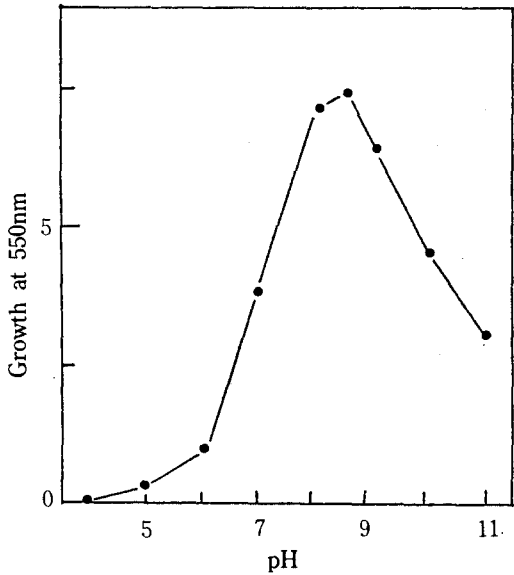


Fig. 4 Effect of initial pH on *Bacillus* sp. YS-309 with lactose as a carbon source.

이상에서는 생육 및 효소의 생산량이 모두 감소하는 경향을 나타냈다. 이것은 lactose자화에 따른 당류의 투과성과 당대사 mechanism과 관련된다고 생각되며 이 현상에 대한 연구를 진행중에 있다. Somkuti와 Steinberg²⁰⁾는 lactose에서 자란 *Streptococcus thermophilus*가 galactose첨가에 의해 생육이 지연되었다고 보고하였으며, 이것은 lactose의 세포막투과와 관련된 한개 이상의 catalytic protein을

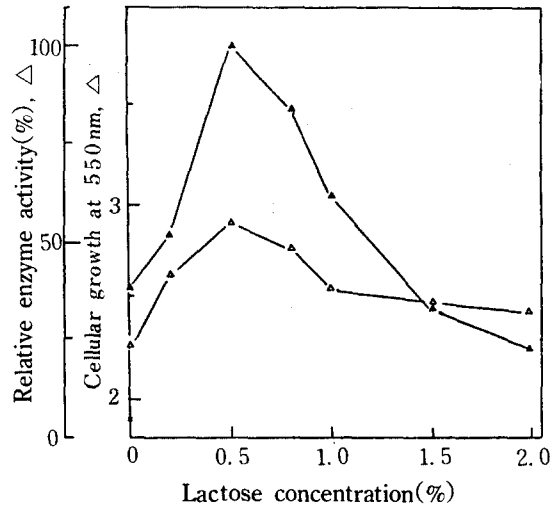


Fig. 5 Effect of lactose concentration on the β -galactosidase production.

galactose가 저해하기 때문인 것같다고 주장하였다.

한편 glucose함량에 따른 효소생산능을 측정 한 결과는 Table 5와 같았다.

배양액을 6,000rpm에서 10분간 원심분리한후 상등액을 extracellular효소로 하고, 회수한 균체를 파괴하여 얻은 조효소액을 intracellular효소로 구분하여 측정 한 결과 균체의 효소량은 glucose함량과 관계없이 거의 일정하였으나 균체내 효소량은 배지중의 glucose양과 반비례적으로 감소하였다. 이 결과로부터 β -galactosidase는 intracellular

Table 5. Effect of glucose concentration on the β -galactosidase production from *Bacillus* sp. YS-309.

Glucose concentrations (w/v, %)	Enzyme production(A405//ml)		
	Intracellular	Extracellular	Total
None	0.44	0.13	0.57
0.1	0.74	0.08	0.82
0.2	0.69	0.11	0.80
0.4	0.48	0.09	0.57
0.6	0.45	0.10	0.55
0.8	0.40	0.10	0.50
1.0	0.34	0.12	0.46

효소이며 glucose에 의해 균체내의 효소합성이 저해되는 것으로 추정되었다.

요 약

토양으로부터 분리한 호알카리성 세균 중에서 β -galactosidase활성이 우수한 YS-309주를 선발하였다. 이 균은 동정결과 *Bacillus*속에 속하는 미생물로서 중성 pH에서는 거의 자라지 않고 알카리성에서는 잘 생육하였다. 기존에 보고된 호알카리성 세균과 미생물학적, 생화학적 특징을 상호 비교한 결과, 새로운 균주로 확인되었다. 분리균의 생육 최적온도와 최적 pH는 각각 8.5와 40°C로 관찰되었으며 탄소원으로 glucose, lactose, maltose를 잘 자화하였으나 soluble starch와 fructose는 잘 이용하지 못하였다.

배지중 lactose의 농도는 분리균의 효소생산 및 생육에 큰 영향을 미쳤으며 0.5%까지는 균체생육 및 효소 생산에 증가하였으나그이상의 농도에서는 오히려 감소하였다. 또 glucose의 농도 상승에 따라 균체내 β -galactosidase활성은 감소하였으며 이것은 세포내에서 glucose가 효소합성을 억제하기 때문으로 생각되었다.

IV. 참고문헌

- Horikoshi, K and T. Akiba : *Alkalophilic microorganisms*. A new microbial word, Japan Scientific Societies, pp1-4(1982)
- Yu, J.H., B.T. Koo, I.S. Kong, Y.J. Chung and Y.S. Park : Cloning of promoters from alkali-tolerant *Bacillus* sp., *Kor.J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **16**, 126(1988)
- 황재원 : 알카리성 *Bacillus* species AL-8의 amylase생성과 gene cloning, 이화여대 대학원 석사학위 논문(1986)
- Kang, I.S., N.K. Sung, H.K. Chun, T. Akiba and K. Horikoshi : Purification and characteristics of xylanases from thermophilic alkalophilic *Bacillus K17*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **44**, 447(1986)
- Kwon, H.J. and P.S. O : Isolation and some properties of D-xylose isomerase producing alkalophilic *Bacillus* sp., *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **15**, 273(1987)
- Sung, N.K., J.S. Roh, S.K. Park and Y.C. Chung : Intrgeneric protoplast fusion between alkalophilic *Bacillus* sp. F204 and *Bacillus* sp. K17. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **16**, 275(1988)
- Horikoshi, K. : Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms. Part I. Alkaline protease produced by *Bacillus* No. 221, *Agric. Biol. Chem.*, **35**,1407(1971)
- Boyer, E.W. and M.B. Ingle : Extracellular alkaline amylase from a *Bacillus* species, *J. Bacteriol.*, **23**, 238(1973)
- Kobayashi, S., K.Kainuma and S. Suzuki : Purification and some properties of *Bacillus macerans* cycloamylose glucanotransferase, *Carbohydr. Res.*, **61**, 229(1978)
- Kelly, C.T. and W.M. Fogarty : Production and properties of polygalacturonate lyase by an alkalophilic microorganisms *Bacillus* sp. RK9, *Can. J. Microbiol.*, **24**, 1164(1978)
- Akiba, T. and K. Horikoshi : Identification and growth characteristics of β -galactosidase producing microorganisms, *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 1845(1976)
- Horikoshi, K. and Y. Atsukawa : Xylanase produced by alkalophilic *Bacillus* No. C-59-2, *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 2097(1973)
- Sunaga, T., T. Akiba and K. Horikoshi : Production of penicillinase by an alkalophilic *Bacillus*. *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 1363(1976)
- Richmond, M.L., J.I. Gray and C.M. Stine : β -galactosidase. Review of recent research related to technological application, nutritional concerns and immunofibzation, *J. Dairy Sci.*, **64**, 1759(1981)
- Wallenfels, K. and R. Weil : β -Galactosidase.

- The Enzymes*, 3rd ed. P.D. Boyer ed. AP, 7, 617(1972)
16. Buchan, R.E. and M.E. Gibbons : Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed, Williams and Wilkins Co, Baltimore(1974)
 17. Itoh, T., M. Suzuki and S. Adachi : Production and characterization of β -galactosidase from lactose-fermenting yeast, *Agric.Biol.Chem.* 46, 899(1982)
 18. Ikara, Y. and K. Horikoshi : Isolation and some properties of β -galactosidase producing bacteria, *Agric. Biol. Chem.* 43, 85(1979)
 19. Ikara, Y. and K. Horikoshi : β -Galactosidase in alkalophilic *Bacillus*, *Agric. Biol. Chem.* 43, 1359(1979)
 20. Somkuti, G.A. and D.H. Steinberg : Adaptability of *Streptococcus thermophilus* to lactose, glucose and galactose, *J. Food Protection*, 42, 881(1979)