

호알칼리성, 고온성 *Bacillus* sp. TA-11에 의한 β -Galactosidase의 생산

최영준·이종수
배재대학교 유전공학과

Production of β -Galactosidase from Alkalophilic, Thermophilic *Bacillus* sp. TA-11

Young-Jun Choi and Jong-Soo Lee

Dept. of Genetic Engineering, Paichai University, Taejeon 302-735, Korea

ABSTRACT

The conditions for β -galactosidase production from alkalophilic, thermophilic *Bacillus* sp. TA-11 were investigated. The maximal enzyme production was obtained when the strain was cultured at 50°C for 5 days with fed-batch culture in the optimal medium containing 1.5% lactose, 0.6% yeast extract, 0.15% K_2HPO_4 and initial pH 9.5, and then final enzyme activity under the above conditions was 5200 unit/ml of cell free extract.

서론

β -Galactosidase(EC.3.2.1.23)는 lactose의 β -1,4-galactose 결합을 가수분해하여 포도당과 galactose를 생성하는 효소로서 유당불내증(lactose intolerance)(1, 2)환자에게 우유중의 유당 섭취를 촉진시켜 주고 각종 유가공품의 유당 결정화를 방지하며 치즈 제조시 whey의 사용으로 인한 수질오염을 방지할 수 있는 등의 이점이 있어 이미 오래 전부터 유가공 산업 등에 널리 이용되어 왔다(3-5).

β -Galactosidase를 생성하는 미생물로서는 세균, 곰팡이 및 효모 등 수십종이 보고되어 있으며(6-10) 일반적으로 세균이 생성하는 β -galactosidase는 활성이 높지만 수율이 낮고 대개 중성부근에서 잘 작용하는데 비하여 곰팡이의 효소는 수율은 높지만 활성이 낮고 비교적 5.5 이하의 산성에서 잘 작용하는 것으로 알려져 있다(11-12).

한편, 호알칼리성, 고온성 세균은 일반적으로 알칼

리와 열에 대한 내성이 강한 효소를 생성하므로 반응공정 중 미생물의 오염을 방지할 수 있고 열 또는 알칼리에 대하여 효소 불활성을 줄일 수 있으며 분리정제가 비교적 용이하고 기질의 용해도를 높일 수 있는 이점 등이 있어 근래에 이들의 산업적 이용에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(13-16). 위와 같이 일반 미생물에 의한 β -galactosidase의 생산, 정제 및 특성에 관한 연구는 많이 보고되었으나 호알칼리성(17, 18), 고온성(19) 및 호알칼리성, 고온성 세균에 의한 β -galactosidase에 관한 연구는 거의 이루어지지 않았다. 따라서 필자 등은 자연계로부터 β -galactosidase를 강력하게 생산하는 호알칼리성, 고온성 세균을 분리하여 *Bacillus* sp. TA-11으로 동정하였고(20) 이 균이 생산하는 β -galactosidase를 정제한 후 효소학적 성질을 조사하여 보고한 바 있다(21). 따라서 본 연구에서는 β -galactosidase를 대량생산 할 목적으로 몇 가지 배지조성과 배양방법 등 효소생산 최적조건을 검토하였다.

재료 및 방법

사용균주

본 실험에 사용한 균주는 필자 등이 토양으로부터 분리, 동정하여 보고한(20) 호알칼리성이며 고온성인 *Bacillus* sp. TA-11이다.

효소생산 조건

배지의 초기 pH가 효소생산에 미치는 영향은 먼저 분리용 배지(0.4% polypeptone과 yeast extract, 0.1% K_2HPO_4 와 KH_2PO_4 , 0.2% $MgSO_4$, 0.05% NH_4Cl , 0.2% $NaCl$, 1.0% lactose) (19-20)의 pH를 1M Na_2CO_3 로 6.0에서 12.0까지 각각 조정된 후 시험균주를 접종하여 50°C에서 2일간 진탕 배양한 다음 아래와 같은 방법으로 균체 중의 β -galactosidase 활성을 측정하여 조사하였다. 배양온도의 영향은 30°C에서 70°C까지 일정온도로 배양하여 조사하였고 배지조성의 영향은 먼저 효소생산에 미치는 lactose의 최적농도를 조사한 후 각종 질소원과 무기염류 등의 혼용효과를 검토하였다.

또한 효소생산에 미치는 배양방법의 영향으로 플라스크배양은 효소생산 최적조건(1.5% lactose, 0.6% yeast extract, 0.15% K_2HPO_4 , 배지의 초기 pH 9.5, 50°C)으로 48시간 진탕배양시킨 종 배양액(seed cultures)을 동일한 배지에 5% v/v 접종하여 150rpm으로 진탕배양하면서 경시적으로 배양시간에 따른 효소활성과 균체생성량 등을 조사하여 검토하였다. 또한 회분배양은 발효조(한국발효기, KFM-7)에 배지 2ℓ를 넣어 살균한 후 종배양액 100ml을 접종하여 50°C에서 배지의 pH를 1M Na_2CO_3 로 9.5로 조정된 것과 조정하지 않은 것으로 구분하여 배양하였으며, 이때 공기유입속도는 1VVM으로, 교반속도는 90rpm으로 유지시켰다. 유가배양은 회분배양시 배지의 탄소원과 질소원이 거의 소모된 배양 30시간에 살균된 lactose와 yeast extract를 각각 1.5%와 0.6%가 유지되도록 조업부피의 10%를 주기적으로 발효조에 첨가하면서 배양하였다. 연속배양은 위와 같이 24시간 회분배양한 후 미리 살균된 1.5% lactose와 0.6% yeast extract를 peristaltic pump를 이용하여 시간당 300ml씩(회석률; 0.1h⁻¹) 첨가하면서 수행하였다.

효소 활성측정

β -galactosidase활성은 o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside(ONPG)를 기질로 하여 분광분석법

으로 다음과 같이 측정하였다.

배양액 100ml을 8000rpm에서 10분간 원심분리하여 균체를 회수하고 10mM Z-buffer (100mM Na_2HPO_4 , 100mM NaH_2PO_4 , 10mM KCl , 1mM $MgSO_4$, 50mM 2-mercaptoethanol, pH 7.0)로 2회 세척한 후 20ml의 Z-buffer에 현탁시키고 초음파 균체 파쇄기로 균체를 파쇄시킨 다음, 15,000rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상등액을 효소액으로 하였다. Z-buffer에 녹인 ONPG(4mg/ml) 2ml에 상기 효소액 200 μ ℓ를 가하여 40°C에서 10분간 반응시킨 후 1.0M Na_2CO_3 0.5ml을 가하여 반응을 중단시킨 다음 반응액의 흡광도를 420nm에서 측정하여 유리된 o-nitrophenol(ONP)을 표준곡선에서 정량하였다. 효소활성의 one unit는 주어진 반응조건에서 1분간에 기질인 ONPG로부터 1 μ M의 o-nitrophenol을 생성하기 위한 효소의 양으로 정의하였다.

균체농도와 환원당 함량 측정

균체농도는 배양액 일정량을 취하여 660nm에서 흡광도를 측정하거나 이를 8000rpm에서 10분간 원심분리하여 균체를 회수한 후 증류수로 세척하고 105°C에서 10시간 정도 건조시킨 다음 무게를 측정하여 배양액 중 균체의 건조 균체량으로 하였다. 또한 배양액 중의 잔존 환원당 함량은 단백질을 제거한 후 Somogi-Nelson법(22)으로 측정하였다.

결과 및 고찰

초기 pH와 배양온도의 영향

배지의 초기 pH가 β -galactosidase 생산에 미치는 영향을 조사한 결과(Fig. 1) pH 9.5에서 약 1400U/ml로 효소생산이 제일 좋았으며 pH 10.5에서도 약 800U/ml의 효소활성을 보였다. 이는 일반적인 미생물의 효소생산 pH(pH 6.0~8.0)보다 훨씬 알칼리측이었으며 별도의 효소 정제 실험결과에서도(21) 이 효소는 알칼리에서 매우 안정하였다.

한편, 효소생산 최적배양온도는 균체생육온도와 같은 40~50°C이었다(Fig. 2). 이는 *Thermus* sp.의 효소생산온도(60°C)보다는 낮은 온도이었지만 다른 중온균보다는(30~40°C) 높은 온도이었다(11, 19).

배지조성의 영향

분리용 배지에 유일한 탄소원으로 공급한 lactose의 효소생산에 미치는 영향을 조사한 결과(Fig. 3)

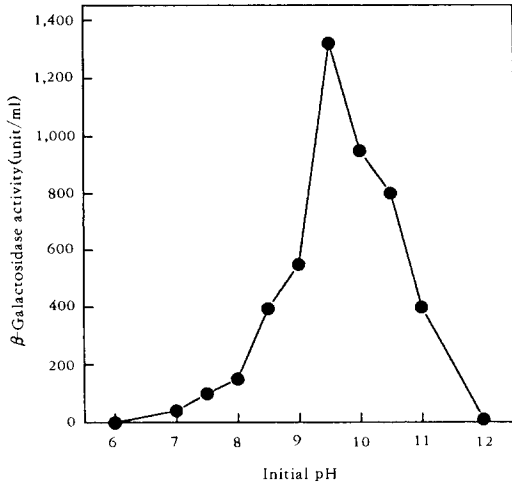


Fig 1. Effect of the initial pH of medium on β -galactosidase production.

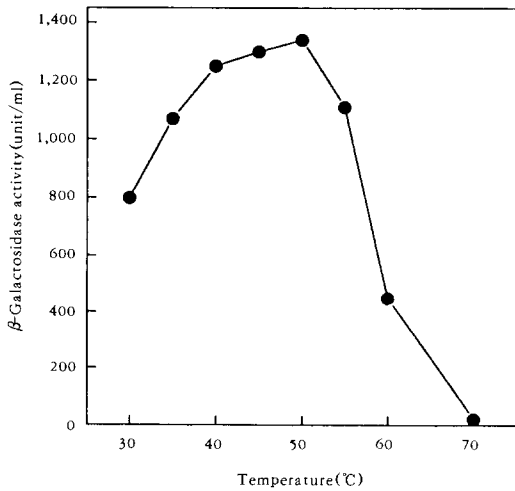


Fig 2. Effect of the culture temperature on β -galactosidase production.

1.5%까지 효소생산이 증가하였으며 그 농도 이상에서는 오히려 효소생산이 감소하는 경향이였다. 유등은(17) 호알칼리성 *Bacillus* sp. YS-309의 β -galactosidase 생산실험에서 0.5% lactose 첨가시 효소생산이 제일 좋았다고 보고한 바 있는데 이보다 농도가 높았다. 이와 같이 lactose의 농도 변화에 의한 효소생산의 변화는 유등(17), Hasan 등(23)과 Tomson(24)의 보고에서와 같이 세포내의 lactose

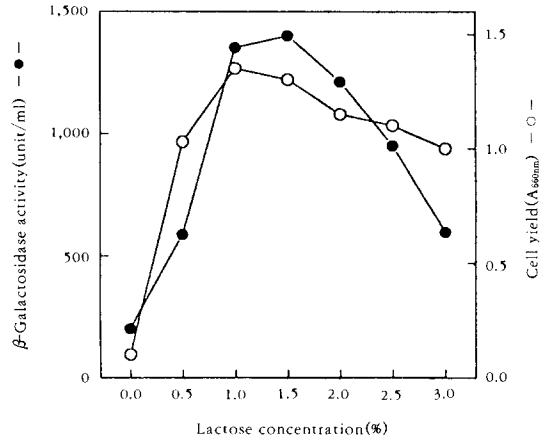


Fig 3. Effect of the concentration of lactose on β -galactosidase production.

와 glucose의 양과 이에 따른 PEP-Potential이 분시험균주의 lactose의 세포내 투과와 관련이 있는 것으로 생각된다. 따라서 시험균주를 이용한 β -galactosidase의 생합성 조절 즉 induction과 repression에 관한 추가실험이 요구되었다.

예비실험에서 주요 질소원과 무기이온들의 효소생산 최적농도를 조사한 후 lactose를 기본으로 이들 질소원과 무기이온 등을 다양하게 조합하여 효소생산실험을 실시한 결과 Table 1에서와 같이 배양 24시간 후 lactose(1.5%), peptone(0.6%), yeast extract(0.6%), MgSO₄(0.03%)와 같은 조성을 가진 배지에서 분리용 배지에서보다 효소생산량이 약 2배 증가된 3050U/ml의 활성을 보였다. 반면에 lactose(1.5%), yeast extract(0.6%), K₂HPO₄(0.15%)의 배지에서는 3,000U/ml의 효소가 생산되어 제일 좋았으나 이들의 비활성(1130U/mg cell, 1363.6U/mg cell)과 경제성 등을 고려하여 lactose(1.5%), yeast extract(0.6%), K₂HPO₄(0.15%) 조성의 배지를 효소생산 최적배지로 결정하였다.

배양방법의 영향

효소생산 최적조건(1.5% lactose, 0.6% yeast extract, 0.15% K₂HPO₄, initial pH 9.5, culture temp. 50 C)으로 시험균을 플라스크 배양하면서 경시적으로 균의 생육과 β -galactosidase 생산을 조사한 결과(Fig. 4), 배양 24시간까지 배지의 탄소원이 급격히 소비되면서 균의 생육이 왕성하다가 48시간 이후에는 거의 정지되었다. 비증식속도는 대수기인 배양

Table 1. Effect of medium composition on production of the β -galactosidase from *Bacillus* sp. TA-11.

Composition	Dry cell weight (mg/ml)	β -galactosidase activity(U/ml)	Specific activity(U/mg)
Lac. Pep. YE	—	—	—
Lac. Pep. NaCl	—	—	—
Lac. Pep. K_2HPO_4	—	—	—
Lac. Pep. KH_2PO_4	—	—	—
Lac. Pep. $MgSO_4$	—	—	—
Lac. Pep. YE K_2HPO_4	—	—	—
Lac. Pep. K_2HPO_4 KH_2PO_4 NaCl $MgSO_4$	—	—	—
Lac. Pep. YE $MgSO_4$	2.7	3,050	1,130
Lac. Pep. YE NaCl	1.8	1,850	1,028
Lac. YE	—	—	—
Lac. YE K_2HPO_4	2.2	3,000	1,364
Lac. YE NaCl	1.5	850	567
Lac. YE $MgSO_4$	1.4	1,360	971
Lac. Pep.	0.3	50	167
Lac. Pep. YE K_2HPO_4	2.4	1,510	629
KH_2PO_4 $MgSO_4$ NH_4Cl NaCl**	—	—	—

* Lac. (Lactose):1.5%, Pep. (Peptone):0.6%, YE(Yeast extract):0.6%, NaCl:0.075%, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 :0.15%, $MgSO_4$:0.03%, NH_4Cl :0.05%

** Screening medium

18시간부터 36시간까지 $0.24 \sim 0.22h^{-1}$ 를 보였고 효소생산은 배양 36시간에 약 4200U/ml, 48시간에 4350U/ml로 가장 높았으며 이때의 비활성은 1450U/mg이었다. 한편 배지의 pH 변화는 초기에 pH 9.5에서 균 생육이 왕성한 24시간 이후 7.5 부근으로 낮아졌으며, 이는 배양 중 pH를 조절하지 않은 다음의 회분배양과 유가배양 및 연속배양시보다도 낮은 pH이었다.

발효조를 이용하여 배양 중 배지의 pH를 조절하지 않고 회분배양하면서 균의 생육과 효소생산의 변화를 조사한 결과는 Fig. 5와 같다. 배양 36시간에 균생육(건조균체량)은 $1.75g/\ell$, 효소생산량은 약 $4,400U/ml$ 로 최고에 달하였고 이때의 비증식 속도는 $0.21h^{-1}$, 잔당은 약 0.18%이었고 비활성은 $2514U/mg$ 으로 플라스크배양에서보다 약 1.7배 증가하였다. 이는 본 시험균주가 통성혐기성균이므로 발효조를 이용한 회분배양에서 균의 생육정도가 플

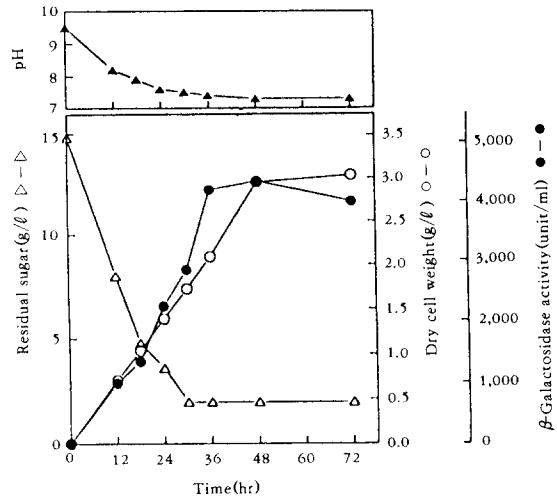


Fig. 4. Profiles of cell growth, residual sugar and β -galactosidase activity during flask culture.

라스크배양에서보다 낮았기 때문인 것으로 생각된다. 또한 잔당이 0.42%이었을 때 최대 비증식속도 ($0.26h^{-1}$)를 보였으며 pH는 플라스크배양과는 달리 배양 12시간에 8.5 부근으로 낮아진 후 큰 변화가 없었다.

한편 배양 중 배지의 pH를 9.5로 일정하게 조정하였을 경우 배양초기부터 균의 생육이 활발히 진행되어 배양 24시간에 거의 대수기 말기(혹은 정지기)에 도달하였고 유도기가 매우 짧았으며 효소생산은 배양 36시간에 약 $4,200U/ml$ 로 최고에 도달하였으며 비활성은 $2800U/mg$ 이었다(Fig. 6).

이상의 회분배양 실험결과를 비교하여 볼 때 배양 중 배지의 pH를 9.5로 조정하는 것에 비하여 pH를 조절하지 않는 회분배양방법이 비활성은 약 $280U/mg$ 낮았으나 효소는 약 $200U/ml$ 더 생산되었다.

회분배양에서 배지 중의 탄소원과 질소원이 거의 대부분 소모되었을 때(배양 30시간 후) 1.5% latose와 0.6% yeast extract를 주기적으로 주입하면서 배양중 균의 생육과 효소생산의 변화를 조사한 결과(Fig. 7) 새로운 기질을 공급함으로써 균의 생육과 효소생산이 점점 증가하는 경향을 보며 3차 기질공급후 24시간에 균 생육은 $2.15g/\ell$, 효소는 $5,200U/ml$ 이 생산되었으며 비활성은 $2420U/mg$ 이었다. 이들을 플라스크 배양과 회분배양의 결과와 비교하여 볼 때 비활성은 $100 \sim 400U/mg$ 낮았으나

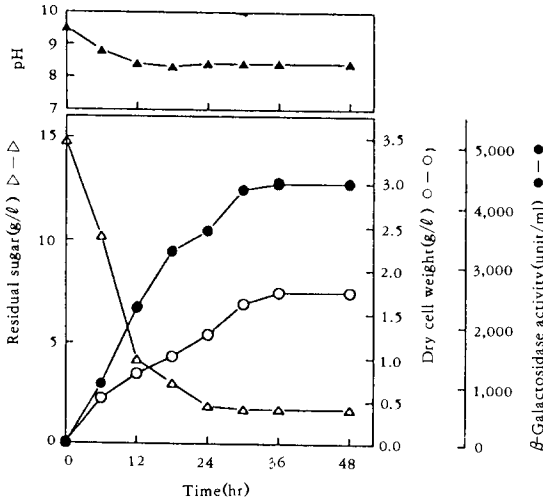


Fig 5. Profiles of cell growth, residual sugar and β -galactosidase activity during batch culture without pH control.

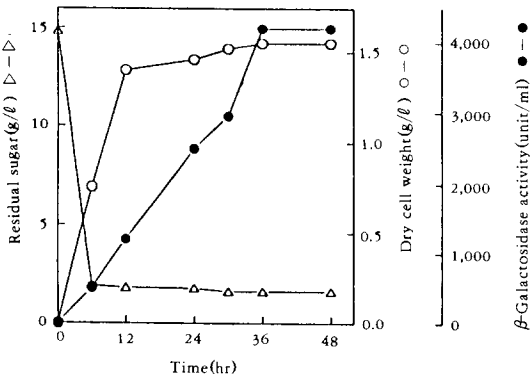


Fig 6. Profiles of cell growth, residual sugar and β -galactosidase activity during batch culture with pH control.

800~1,200U/ml의 효소가 더 생산되었다.

효소생산 최적배지와 회분배양 및 유가배양 등의 실험결과를 이용하여 시험균주를 24시간 회분배양한 후 시간당 300ml씩(회석률: 0.1h⁻¹) 새로운 기질을 공급하고 동일량을 수확하면서 연속배양하였을 때 Fig. 8과 같이 연속배양 10시간(총 34시간 배양)에 4,000U/ml의 효소가 생산되었고 균의 생육은 다른 배양방법에 비하여 다소 낮은 약 1.2mg/ml이었으며 이때의 비활성은 3077U/mg으로 다른 배양방법에서

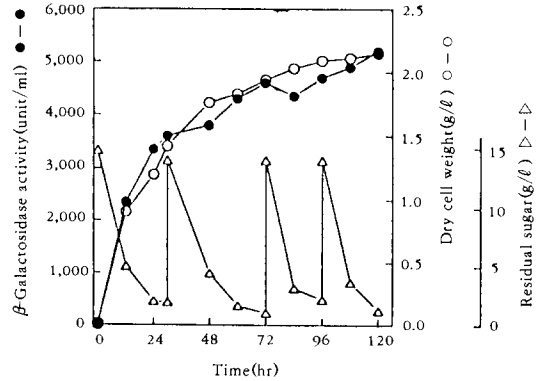


Fig 7. Profiles of cell growth, residual sugar and β -galactosidase activity during fed-batch culture with the periodic feeding

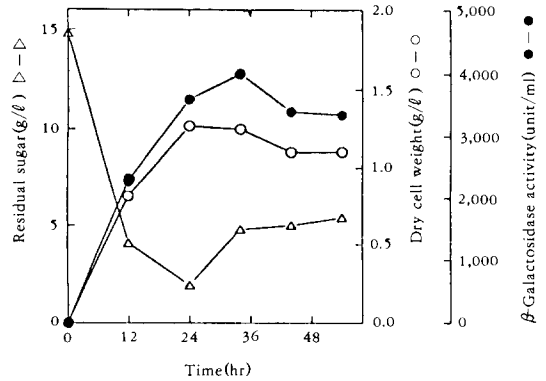


Fig 8. Profiles of cell growth, residual sugar and β -galactosidase activity during continuous culture.

보다 가장 높았다.

이상의 배양방법에 따른 β -galactosidase의 비활성과 최대 생산량을 비교하여 볼 때(Table 2) 비활성은 연속배양시 3077U/mg, 효소생산성은 유가배양시 5200U/ml로 제일 좋았다. 플라스크 배양에서 비활성이 낮은 것은 호알칼리성이며 고온성인 동시에 통성혐기성인 *Bacillus* sp. TA-11이 산소공급과 교반효과가 비교적 양호한 발효조에서의 생육(1.2~1.75g/l)보다 플라스크 배양에서의 생육(3.0g/l)이 훨씬 좋으나 최대효소생산량은 이들과 비슷하기 때문이고 연속배양에서 비활성이 높은 것은 다른 배양방법에서는 비교적 효소활성이 낮은 노후세포가 배양기 내에 축적되지만 연속배양에서는 이들이 외

Table 2. Maximum enzyme activity and specific activity of β -galactosidase from *Bacillus* sp. TA-11 on various culture modes.

Culture type	Maximum enzyme activity (U/ml)	Specific activity (U/mg cell)
Flask	4,358	1,450
Batch with pH control	4,200	2,800
without pH control	4,400	2,514
Fed-batch	5,200	2,420
Continuous	4,000	3,077

부로 유출되고 따라서 효소활성이 높은 세포가 많이 존재하기 때문에 비록 최대효소생산량은 다소 낮지만 비활성이 높은 것으로 생각된다.

요 약

호알칼리성이며 고온성인 *Bacillus* sp. TA-11로부터 β -galactosidase를 대량생산할 목적으로 배지 조성, 배지의 초기 pH 및 배양온도와 각종 배양방법 등이 효소생산에 미치는 영향을 검토하였다. β -galactosidase의 최적생산조건은 1.5% lactose, 0.6% yeast extract, 0.15% K_2HPO_4 , 초기 pH 9.5, 배양 온도 50°C 이었고 플라스크배양에서는 48시간에 약 4350U/ml, 회분배양에서는 36시간에 4200~4400U/ml의 효소가 생산되었다. 또한 유가배양에서는 120시간에 5200U/ml, 연속배양에서는 34시간에 4000U/ml의 효소가 생산되었으며 효소의 비활성은 연속배양시 약 3077U/mg으로 제일 좋았다.

참고문헌

- M. L. Richmond, J. I. Gray and C. M. Stive (1981), *J. Dairy Sci.*, **64**, 1579.
- A. E. Davis and T. Bolin (1967), *Nature*, **195**, 1244.
- L. Tumerman, H. Fraw and K. W. Corneley (1954), *J. Dairy Sci.*, **37**, 830.
- F. Jr. Kern and J. E. Struthers, Jr. (1966), *J. Am. Med. Assoc.*, **195**, 143.
- K. A. A. Rahim and B. H. Lee (1991), *Biotech. and Appl. Biochem.*, **13**, 246.
- S. L. Marchsi, E. Steers, Jr. and S. Shifrin (1969), *Biochem. Biophys. Acta.*, **181**, 20.
- R. E. Goodman and D. M. Pederson (1976), *Can. J. Microbiol.*, **22**, 817.
- G. B. Borglum and M. Z. Steinberg (1972), *J. Food Sci.*, **37**, 619.
- L. Wierzbicki and F. V. Kosikowski (1973), *J. Dairy Sci.*, **56**, 1182.
- R. R. Mahoney, T. A. Nickerson and J. R. Whitaker (1975), *J. Dairy Sci.*, **58**, 1620.
- G. Vassilis and M. Lopez-Levia (1985), "Hydrolysis of Lactase: A Literature Review" pp. 1~12.
- R. W. Coughlin and M. Charles (1980), "Immobilized Enzymes for Food Process" p. 153, CRC Press, Florida, U. S. A.
- J. T. Ulrich, G. A. McFeters and K. L. Temple (1972), *J. Bacteriol.*, **110**, 692.
- S. Shimizu and T. Kobayashi (1981), In Enzyme Engineering (S. Fukui, I. Chibata and S. Suzuki, eds) p. 355, Tokyo Kagakudoji, Tokyo.
- N. K. Sung, J. S. Park and Y. C. Chung (1988), *Kor. J. Microbiol. Bioeng.*, **16**, 275.
- J. B. Kim (1994), *Biotech. News, Kor. Inst. Biotechnol. Bioeng.*, **1**, 38.
- J. H. Yu and S. S. Yoon (1989), *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **17**, 524.
- J. H. Yu and S. S. Yoon (1989), *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **17**, 587.
- J. S. Lee, C. J. Kim and M. J. Oh (1983), *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **11**, 5.
- J. S. Lee, I. Y. Kwak and J. H. Keum (1992), *J. Natural Sci. Paichai Univ.*, **5**, 47.
- Y. J. Choi, I. H. Kim and J. S. Lee (1994), Proceeding of 1994 Spring Scientific Meeting of the Biochemical Soc. of the R. O. K. p. 88.
- M. F. Chaplin and J. F. Kennedy (1986), Carbohydrate Analysis; Practical Approach, p. 3, IRL Press. Oxford.
- N. Hasan and I. F. Durr (1974), *J. Bacteriol.*, **120**, 66.
- J. Thompson (1979), *J. Bacteriol.*, **140**, 774.