

갈락토스 전이활성이 높은 β -galactosidase 생산균의 분리 및 효소생산과 관련된 몇가지 특징

인만진^{1,2*} · 김민홍² · 정진¹

¹서울대학교 농화학과, ²(주)미원 중앙연구소

초록 : 토양으로부터 갈락토스 전이활성이 우수한 β -galactosidase를 생산하는 미생물을 분리하고 부분동정하여 *Bacillus* sp. A1으로 명명하였다. 선발된 균주가 생산하는 효소는 40%(w/w) 유당용액에서 초기유당의 70%가 전환되었을 때 90%의 높은 전이율을 보였다. 효소의 생합성은 유당에 의하여 유도되었고 포도당에 의하여 저해받았다. 효소생산을 위한 탄소원으로는 유당이, 유기질소원으로는 효소분해 대두단백질이 적합하였다. 탄소원과 유기질소원을 최적화하므로써 배양된 균주의 효소활성은 최소배지에서 배양된 효소활성과 비교하여 약 3배 이상(0.5 U/ml-broth에서 1.8 U/ml-broth로) 증가하였다(1995년 10월 5일 접수, 1995년 11월 14일 수리).

서 론

β -Galactosidase(β -D-galactoside galactohydrolase; EC 3.2.1.23)는 우유와 cheese whey에 함유되어 있는 유당을 가수분해하기 위하여 오랫동안 사용하여 온 효소이다. 유당의 가수분해는 유당의 소화, 흡수가 어려운 사람에게 적합한 우유제품을 제공할 뿐만 아니라 유제품의 감미도와 용해성을 증가시키며, whey의 경우는 그 이용성을 높여주는 효과가 있다. 따라서 β -galactosidase에 관한 초기의 응용적 연구는 주로 세균, 효모, 곰팡이 등을 이용하여 가수분해 활성이 우수한 효소를 대량생산하는데 집중되었으며, 이에 사용된 균주로는 대장균, *Aspergillus*속, *Kluyveromyces*속, *Penicillium*속의 미생물을 들 수 있다.¹⁾

근래에 장내 유익세균종인 비피더스균의 증식인자로 갈락토올리고당의 기능성이 부각되면서 이를 제조하기 위하여 β -galactosidase의 당전이 활성에 대한 연구가 진행되고 있다. 그 결과 *Aspergillus oryzae*, *Kluyveromyces lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma harzianum* 등과 같은 몇몇 미생물이 생산하는 β -galactosidase를 이용하여 갈락토올리고당을 제조하는 보고가 있다.²⁻⁹⁾ 그러나 이들 미생물이 생산하는 효소는 갈락토스의 전이활성이 높지 못하여 상업적인 목적으로 사용하기에는 어려움이 있다. 상대적으로 높은 갈락토스 전이활성을 갖는 효소를 생산하는 미생물로는 *Bacillus circulans*,¹⁰⁾ *Cryptococcus laurentii*,¹¹⁾ *Saccharopolyspora rectivirgular*¹²⁾ 등이 알려져 있다.

본 연구에서는 토양으로부터 갈락토스 전이활성이 높은 β -galactosidase를 생산하는 미생물을 선발하여 부분적으로 동정하였고, 효소생산효율을 높이기 위한 균주의 배양조건에 관하여 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 사용기기

균주의 선별에 사용한 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside(X-gal), 효소활성 측정에 사용한 o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside(ONPG) 및 유당은 Sigma사(St. Louise, MO)의 제품을 사용하였고, 발효배지용 재료는 주로 Difco사(Detroit, MI)에서, 효소분해 대두단백질(SMP™)은 Fuji Oil사(일본)에서 구입하였다.

균의 생육과 효소활성 측정에는 Uvikon 810 spectrophotometer(Kontron사, Swiss)를 이용하였으며, cation exchange chromatography(column: Sugar-Pak, Waters, USA)와 normal phase partition chromatography(column: Econosphere NH₂, Alltech, USA) 그리고 RI detector를 이용하여 당분석을 실시하였다.

효소활성 측정

배양액을 4°C에서 5분간 원심분리(10,000×g)하여 상정액과 균체를 분리하였다. 상정액은 그대로, 균체는 소량의 SDS와 chloroform을 첨가하여 조효소액으로 사용하였다. 효소의 활성 측정은 ONPG를 기질로 하는 Miller의 방법¹³⁾에 준하여 수행하였다. 생성된 o-nitrophenol(ONP)의 양을 420 nm에서 흡광도로 측정하였고, 효소활성 1단위(unit)는 1분당 1 μ mole의 ONP를 유리하는데 필요한 효소량으로 정의하였다.

전환률, 전이율의 측정

완중액에 유당을 용해하고(40%, w/w), 유당 1g당 1 unit의 효소활성을 갖는 조효소액(균체추출액 또는 균체를 분리한 상정액)을 첨가하여 50°C에서 15시간 반응시킨 후 10분간 가열하여 반응을 정지시켰다. HPLC로

찾는말 : *Bacillus* sp. A1, β -galactosidase, 갈락토스 전이활성, catabolite repression

*연락처

효소반응에 의하여 생성된 포도당과 갈락토스 및 미반응의 유당을 분석하였고, 전이율과 전환률을 다음과 같이 정의하였다.

$$\text{전환률(\%)} = \frac{\text{초기 유당농도} - \text{반응 후 유당농도}}{\text{초기 유당농도}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{전이율(\%)} = \frac{\text{생성된 포도당 농도} - \text{생성된 갈락토스 농도}}{\text{생성된 포도당 농도}} \times 100 \quad (2)$$

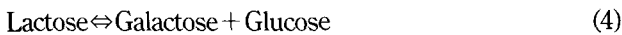
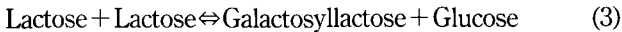
균의 분리, 선발 및 부분동정

토양시료를 멸균한 생리식염수로 10배씩 단계적으로 희석하여 X-gal이 첨가된 선별용 배지에 도말하고 30°C와 37°C에서 48시간 배양하여 청색 colony만을 선택하였다. 선택한 균주를 동일조성의 액체배지에 배양하여 유당에 대하여 높은 전환률과 전이율을 보이는 균주를 최종 선발하여 보존용 배지에 보관하면서 본실험에 사용하였다. 선발된 균주의 부분동정은 Bergey의 매뉴얼¹⁴⁾에 따라 실시하였다. 각종 배지의 조성은 다음과 같다. 분리용 배지: 포도당 1.0 g/L, 유당 2.0 g/L, KH₂PO₄ 1.0 g/L, K₂HPO₄ 1.0 g/L, (NH₄)₂SO₄ 5.0 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.1 g/L, yeast extract 1.0 g/L(pH 7.0). 보존용 배지: nutrient agar 배지(Difco사 제품). 선발된 균주의 최소배지: 탄소원 10 g/L, KH₂PO₄ 1.0 g/L, K₂HPO₄ 1.0 g/L, (NH₄)₂SO₄ 5.0 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.1 g/L, NaCl 0.01 g/L, CH₃COONa 6 g/L, FeCl₂ 0.005 g/L(pH 7.0).

결과 및 고찰

전이활성이 높은 효소생산균의 분리 및 부분동정

가수분해활성에 비하여 상대적으로 전이활성이 높은 효소의 생산균주를 선별하기 위해서는 그것을 나타낼 수 있는 지표가 필요하다. 식(2)의 전이율이 중요한 지표가 될 수 있는 이유는 β-galactosidase의 반응 stoichiometry에 근거를 두고 있다. 즉, 유당을 기질로 하는 효소반응에서, 초기에는 식(3)과 같이 3당류(galactosyllactose)와 포도당 만이 생성되며 반응이 진행됨에 따라 4당류와 갈락토스가 출현한다. 한편 가수분해반응의 경우는 식(4)와 같이 포도당과 갈락토스가 생성된다.



따라서, β-galactosidase의 반응초기에 3당류의 생성속도와 갈락토스의 생성속도가 각각 전이활성과 가수분해활성을 나타낸다. 전이율은 전체활성중 전이활성의 비율을 나타내는 것으로 전이율이 높을 수록 상대적으로 전이활성이 높다고 말할 수 있다. 전이율은 일반적으로 전환률이 증가할수록 감소하는 경향이 있다.¹⁵⁾

토양으로부터 청색 colony를 형성하는 50여 균주를

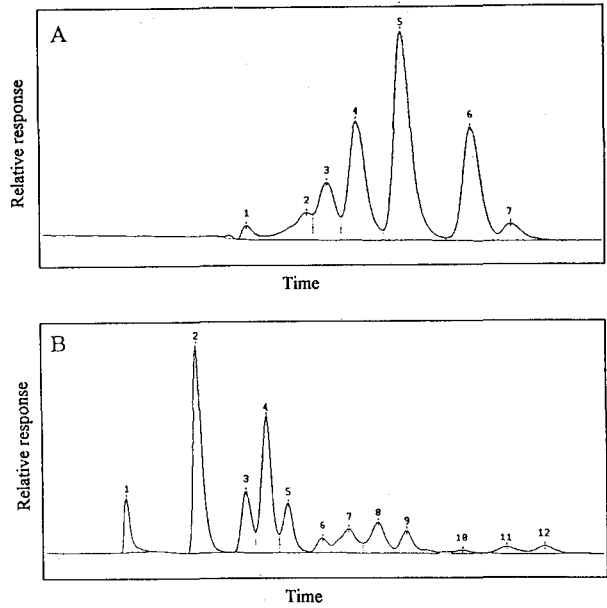


Fig. 1. Typical HPLC chromatograms of enzymatic reaction products of lactose by using β-galactosidase from *Bacillus* sp. A1. The chromatograms in the upper panel(A) and the lower panel(B) were measured by using a Sugar-Pak column and an Econosperere NH₂ column, respectively. Peak assignments were done by referring to the standards as follows: (A) 2~4, galactooligosaccharides, 5, lactose and trnsagalactosylated disaccharides 6, glucose, 7, galactose (B) 2, glucose and galactose, 4, lactose, 3, 5, trnsagalactosylated disaccharides 6~12, galactooligosaccharides.

Table 1. Comparison of transgalactosylation capacities of β-galactosidases derived from various strains.

Strain	GOS (%) [*]	T (%) ^{**}	X (%) ^{***}	Ref.
<i>E. coli</i>	24.0	25.7	93.4	17
<i>Aspergillus oryzae</i>	23.0	69.0	36.2	3
<i>Aspergillus niger</i>	15.3	30.3	62.1	8
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	24.6	34.0	93.4	16
<i>Kluyveromyces lactis</i>	13.2	21.8	66.0	4
<i>Streptococcus thermophilus</i>	24.1	47.9	93.1	5
<i>Bacillus circulans</i>	41.0	68.9	61.2	10
<i>Saccharopolyspora rectivirgular</i>	43.8	60.0	80.0	11
<i>Bacillus</i> sp. A1	50.0	90.0	70.0	

^{*} Maximum galactooligosaccharides (GOS) content (% of total sugar)

^{**} T (%) = (Glucose_{final} - Galactose_{final}) / Glucose_{final}

^{***} X (%) = (Lactose_{initial} - Lactose_{final}) / Lactose_{initial}.

1차로 선별하고 이들 균주로부터 제조한 조효소액을 유당과 반응시켜 전이율과 전환률을 계산하였다. 그 결과 대부분의 균주들이 전환률이 낮을 때(30% 이하) 높은 전이율(70% 이상)을 보이고, 전환률이 높아질수록 전이율이 낮아지는 경향을 보였다. 그러나 70% 이상의 높은 전환율에도 불구하고 90% 내외의 높은 전이율을 보이는 균주 1종을 최종 선발할 수 있었다. 이 균주로 준비한 조효소액을 첨가한 시료의 유당반응 생성물을 분석한 HPLC결과(Fig. 1)로 미루어 보아 갈락토스 생성속도가

Table 2. Induction of β -galactosidase from *Bacillus* sp. A1 by lactose, galactose and isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG).

Chemical	Cell growth (A ₆₁₀)	Enzyme activity (U/ml)*	Specific activity (U/ml)/A ₆₁₀	Relative specific activity
IPTG	3.10	0.068	0.022	1.13
Lactose	3.60	0.63	0.175	9.19
Galactose	3.25	0.19	0.059	2.94
Control	3.08	0.061	0.020	1.00

*Enzyme activity of *Bacillus* sp. A1 culture was measured for transgalactosylation.

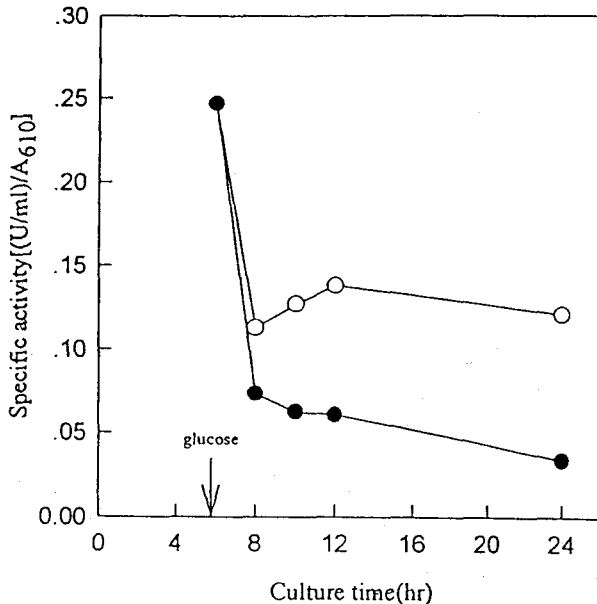


Fig. 2. Catabolite repression of β -galactosidase biosynthesis. The effect of glucose on the induction of β -galactosidase was examined by comparing specific activity between cells grown on lactose (○—○) and those grown on lactose plus glucose (●—●) that was added to the medium after 6 hr culture.

매우 낮은, 따라서 전이활성이 상대적으로 높은 β -galactosidase를 생산하는 균주임을 확인하였다.

부분동정한 결과 선발된 균주는 그람 양성균으로 운동성이 있으며 내생포자(endospore)를 형성하였고 catalase 양성반응을 보였다. 외관상으로는 간균의 형태였으므로 *Bacillus*속의 세균으로 분류하고 *Bacillus* sp. A1으로 명명하였다.

Bacillus sp. A1이 생산하는 β -galactosidase의 전이활성을 앞서 정의한 전환률과 전이율의 개념을 이용하여 기존에 보고된 균주들과 비교하여 Table 1에 정리하였다.

효소의 유도과 억제

Inducer에 의한 효소 생합성의 유도를 확인하기 위하여, 포도당을 탄소원으로 하는 최소배지에 6시간 배양 후 β -galactosidase의 inducer로 알려진 유당(1%), 갈락토스(1%), 및 isopropyl β -D-thiogalactopyranoside(IPTG, 1 mM)를 각각 첨가하여 1시간 배양한 후 균주의 갈락토스 전이 비활성(specific activity; 효소활성을 균의 생

육으로 나눈 것)을 측정하였다(Table 2). 유당 첨가구에서 효소비활성이 9배 이상 증가하는 것으로 보아 *Bacillus* sp. A1의 β -galactosidase는 유당에 의하여 유도되는 효소로 판단된다. 한편 IPTG는 실질적으로 유도효과를 보이지 않았으며, 갈락토스의 경우에는 효소비활성의 증가 정도가 관찰되었으나 그 정도가 별로 크지는 않아서 inducer인지의 여부를 판단하기에는 시기상조인 듯하다. 다만 몇가지 미생물에서 갈락토스가 inducer로 작용한다는 보고¹⁸⁻²⁰로 미루어 보아 *Bacillus* sp. A1에서도 그 가능성을 배제할 수는 없으며 이에 대한 보완적인 연구가 필요하다.

포도당이 효소 생합성 유전자의 발현을 저해하는 현상(catabolite repression)²¹이 *Bacillus* sp. A1의 β -galactosidase 생합성에서도 나타나는지를 조사하였다. 유당을 탄소원으로 하는 배지에서 대수증식기까지 5시간 배양하고 여기에 포도당을 1% 농도로 첨가한 후 경시적으로 균의 생육과 효소생산을 측정하였다(Fig. 2). 포도당 첨가시점에서 약 3시간(즉 배양후 5~8시간의 기간) 동안은 포도당 첨가구나 대조구에서 공히 비활성의 급격한 감소가 보였는데, 이는 대수증식기에 균의 빠른 성장에 기인하는 것으로 해석된다. 그러나 주목할만한 사실은 비활성의 급격한 감소가 끝나는 시점 이후(즉 배양 8시간 이후)에는 무첨가 대조구의 비활성이 어느 정도 일정한 수준을 유지하는데 반해 포도당 첨가구에서는 비활성의 감소추세가 계속된다는 점이다. 이는 포도당에 의한 catabolite repression이 *Bacillus* sp. A1에서도 나타났음을 시사하는 것으로서, 일반적으로 미생물의 유도 효소인 경우 탄소원으로 이용되는 포도당의 존재가 효소의 유도를 저해한다는 관찰^{20,22}과 일치한다.

효소생산 배지의 최적화

통상적인 미생물 실험 매뉴얼²³에 따라 *Bacillus* sp. A1의 생육에 필요한 영양물질들에 대하여 조사하였다(테이타 제시는 생략함). 그 결과 아미노산, 비타민, 퓨린, 피리미딘들 중에서 아미노산 만이 균의 생육에 유의한 인자인 것으로 확인되었기에(aspartate, threonine이 가장 유의성이 있는 아미노산이었다), 유당을 탄소원으로 하는 최소배지에 아미노산 공급원으로서 yeast extract 및 여러가지 단백질 가수분해물을 각각 첨가(0.1%)하고 균을 배양한 후 생육정도, 전이효소활성, 및 효소의 체외분 비율을 측정하였다(Table 3). 효소분해 대두단백질인 SMP가 모든 측정항목에서 최고치를 보인 매우 우수한

Table 3. Effects of various organic nitrogens on the cell growth and transgalactosylation activity of β-galactosidase in *Bacillus* sp. A1 culture.

Organic nitrogen		Cell growth	Total enzyme	Intracellular	Extracellular	Ratio*
Commercial name (Mfd)	Raw material	(A ₆₁₀)	activity (U/ml)	activity (U/ml)	activity (U/ml)	
Polypeptone (Wako)	Casein	2.64	0.406	0.257	0.149	0.367
Tryptone (Difco)	Casein	1.98	0.402	0.257	0.145	0.361
Casamino acid (Difco)	Casein	1.96	0.568	0.243	0.138	0.243
Yeast extract (Difco)	Yeast	4.14	0.913	0.774	0.139	0.152
Soytone (Difco)	Soybean meal	2.20	0.463	0.273	0.190	0.410
SMP (Fuji Oil)	Soy protein	7.42	0.997	0.430	0.567	0.569

* Ratio=extracellular enzyme activity/total enzyme activity.

유기질소원으로 판명되었으며, 생육상태가 비교적 양호할 뿐만 아니라 효소생산성에 있어서도 SMP에 버금가는 yeast extract의 경우는 균체의 효소분비율이 효소분해 단백질들에 비하여 현저하게 낮다는 단점을 보였다. 최소 50% 이상의 아미노산과 작은 펩타이드들로 구성된 SMP의 배지 최적 첨가량은 약 0.5%로 밝혀졌다.

이상의 자료들과 최소배지를 기초로 하여 부분적으로 효소생산 배지를 최적화한 결과, 최소배지의 유당을 2%로 증가시키고 여기에 갈락토스 1% 및 SMP 0.5%를 첨가하였을 때 3일간 배양한 결과 *Bacillus* sp. A1의 효소활성이 1.8 U/ml-broth로 측정되어 최소배지에 배양하였을 때의 효소활성(0.5 U/ml-broth)에 비하여 3배 이상의 향상효과가 있음을 보여주었다. 아마도 온도와 pH의 조절 및 미네랄의 첨가 등 배양조건에 대한 최적화 연구가 보다 심도있게 진행된다면 더욱 향상된 효소생산성을 기대할 수 있으리라 생각된다.

감사의 글

본 연구는 과학기술처의 특정연구개발사업으로 수행된 연구결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

참고 문헌

- Gekas, V. and M. Lopez-Leiva (1985) Hydrolysis of lactose: A literature review. *Process Biochem.* **20**(2), 2-12.
- Matsumoto K., Y. Kobayashi, N. Tamura, T. Watanabe and T. Kan (1989) Production of galactooligosaccharides with β-galactosidase. *Denpun Kagaku* **36**(2), 123-130.
- Toba, T., A. Yokota and S. Adachi (1985) Oligosaccharide structure formed during the hydrolysis by *Aspergillus oryzae* β-galactosidase. *Food Chem.* **16**, 147-162.
- Burvall, A., N. G. Asp and A. Dahlqvist (1979) Oligosaccharide formation during hydrolysis of lactose with *Saccharomyces lactis* lactase(Maxilact®). *Food Chem.* **4**(4), 243-250.
- Greenberg, N. A. and R. R. Mahoney (1983) Formation of oligosaccharides by β-galactosidase from *Streptococcus thermophilus*. *Food Chem.* **10**, 195-204.
- 박신인, 강국희 (1989) *Streptococcus thermophilus* 510의 β-galactosidase에 의한 galactooligosaccharides의 생성에 관한

연구. *한국산업미생물학회지* **21**(1), 164-172.

- 김창렬, 이석래, 이용규 (1990) *Aspergillus niger* CAD 1의 부분정제된 β-galactosidase에 의한 갈락토올리고당의 생성. *한국축산학회지* **32**(6), 323-333.
- Yang, S. T. and I. C. Tang (1990) Lactose hydrolysis and oligosaccharide formation catalyzed by β-galactosidase. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **589**, 417-422.
- Prakash, S., K. Suyama, T. Itoh and S. Adachi (1987) Oligosaccharide formation by *Trichoderma harzianum* in lactose containing medium. *Biotech. Lett.* **9**(4), 249-252.
- Mozaffar, Z., K. Nakanishi, R. Matsuno and T. Kamikubo (1984) Purification and properties of β-galactosidase from *Bacillus circulans*. *Agri. Biol. Chem.* **48**(12), 3053-3061.
- Ohtsuka, K., A. Tanoh, O. Ozawa, T. Kenematsu, T. Uchida and R. Shinke (1990) Purification and properties of a β-galactosidase with high galactosyl transfer activity from *Cryptococcus laurentii* OKN-4. *J. Ferment. Bioeng.* **70**(5), 301-307.
- Nakao, M., M. Harada, Y. Komada, T. Nakatama, Y. Shibano and T. Amachi (1994) Purification and characterization of a thermostable β-galactosidase with high transgalactosylation activity from *Saccharopolyspora rectivirgula*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**, 657-663.
- Miller, J. H. (1972) In: Assay of β-galactosidase "Experiments in Molecular Genetics", p. 352-355, Cold Spring Harbor Laboratories, NY, USA.
- Sneath, P. H. A. (1986) In Endospore-forming gram-positive rods and cocci "Bergeys Manual of Systematic Bacteriology", p. 1104-1139, Williams & Wilkins, Baltimore, USA.
- Prenosil, J. E., E. Stuker and J. R. Bourne (1987) Formation of oligosaccharides during enzymatic lactose hydrolysis and their importance in a whey hydrolysis process: part II: Experimental. *Biotech. Bioeng.* **30**, 1026-1031.
- Robert, H. R. and J. D. Pettinati (1957) Concentration effects in the enzymatic conversion of lactose to oligosaccharides. *Agri. Food Chem.* **5**(2), 130-134.
- Huber, R. E., G. Kurz and K. Wallenfels (1976) A quantitation of the factors which affect the hydrolase and transgalactosylase activities of β-galactosidase(*E. coli*) on lactose. *Biochemistry* **15**(9), 1994-2001.
- Dickson, R. C. and J. S. Markin (1980) Physiological studies of β-galactosidase induction in *Kluyveromyces lactis*. *J. Bacteriol.* **142**(3), 777-785.
- Citti, J. E., W. E. Sandine and P. R. Elliker (1965) β-Galac-

- tosidase of *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.* **89**(4), 937-942.
20. Pedrique, M. and F. J. Castillo (1982) Regulation of β -D-galactosidase synthesis in *Candida pseudotropicalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 303-310.
21. Gottschalk, G. (1979) In: "Bacteriol metabolism", p. 147-150, Springer-Verlag, NY, USA.
22. 이정희, 최용진 (1990) *Lactobacillus sporogenes*에서 β -galactosidase 생합성 조절. 한국산업미생물학회지 **18**(6), 566-570.
23. 협화발효 동경연구소 편 (1987) "미생물실험 매뉴얼", p. 130-142, 강담사, 동경, 일본.

Isolation of *Bacillus* sp. Producing β -Galactosidase with High Transgalactosylation Activity and its Culture Characteristics Regarding Enzyme Production

Man-Jin In^{1,2*}, Min-Hong Kim² and Jin Jung¹ (¹Department of Agricultural Chemistry, Seoul National University; ²Biotechnology Division, R&D Center, Miwon Co., Ltd)

Abstract: A *Bacillus* strain which produces β -galactosidase with high transgalactosylation activity, was isolated from soil and tentatively designated as *Bacillus* sp. A1. When β -galactosidase from *Bacillus* sp. A1 reacted with 40% (w/w) lactose, transgalactosylation ratio reached up to 90% at the 70% conversion of the initial lactose. The biosynthesis of the enzyme in *Bacillus* sp. A1 required lactose as an inducer and was repressed by glucose. Observing that the addition of amino acids to culture medium resulted in enhancing, to a significant extent, both the growth and the enzyme production of the strain, yeast extract and commercially available hydrolysates of protein were examined for the suitability as amino acid source. As it turned out, SMP, an enzymatic hydrolysis product of soybean protein from Fuji Oil Co.(Japan), was the most suitable for optimization of the culture medium. When *Bacillus* sp. A1 was cultured in the presence of 0.5% SMP and 2% lactose, the enzyme activity increased up to 1.8 U/ml-broth.

*Corresponding author