

변이주 *Bacillus* sp. A4442가 생산하는 갈락토스 전이활성이 높은 β -galactosidase의 고정화

인만진^{1,2*} · 김민홍² · 정진¹

¹서울대학교 농화학과, ²(주)미원 중앙연구소

초록 : 갈락토올리고당의 연속 생산을 위하여 *Bacillus* sp. A 4442가 생산하는 갈락토스 전이활성이 높은 β -galactosidase를 균체제거 후 농축, 탈염하여 Diaion™ HPA 75(styrene-divinylbenzene resin)에 고정화하였다. 고정화 수율 및 고정화 효소의 활성을 높이기 위하여 효소 고정화에 영향을 주는 변수들을 최적화하였다. 고정화 시간은 실온에서 3시간, Tris 완충액의 농도는 30 mM, pH는 8이 적당하였다. 단백질부하가 증가할수록 효소는 다른 단백질과 경쟁적이며 가역적으로 담체에 결합하였으며, 최적부하는 약 25 mg protein/g resin 이었다. 가교제로서 glutaraldehyde 0.5%를 사용하였을 때 효소의 열 안정성 및 운전 안정성이 현저히 증가하였다. 이러한 실험조건하에서 고정화를 실시하였을 때 고정화 수율은 40% 이상이었으며 그 활성이 약 200 U/g resin인 고정화 효소를 얻을 수 있었다. Packed-bed reactor에서 유당을 갈락토올리고당으로 연속적으로 전환 가능하였고, 이때 고정화 효소 1 g으로 갈락토올리고당 약 300 g을 생산할 수 있었다.(1996년 7월 16일 접수, 1996년 8월 17일 수리)

서 론

근래에 장내 유익세균종인 비피더스균의 증식인자로 올리고당의 기능성이 부각되면서¹⁾ 올리고당의 한종류인 갈락토올리고당(galactooligosaccharides; GOS)를 제조하기 위하여 β -galactosidase의 당전이 활성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

산업적으로 GOS를 생산하기 위하여는 첫째, 갈락토스 전이활성이 우수한 효소(β -galactosidase)가 필요하다. β -Galactosidase의 당전이 반응에 의하여 생성되는 GOS의 양과 종류는 기질의 농도와 효소의 기원에 따라 차이가 있다.²⁾ 최근에 본 연구자들은 갈락토스 전이활성이 우수한 β -galactosidase를 생산하는 미생물을 토양으로부터 선별하고,³⁾ 돌연변이를 유도하여 효소 생산능력이 향상된 변이주 *Bacillus* sp. A 4442를 얻었다.⁴⁾ 둘째, 경제적인 생산을 위하여 고정화 효소와 생물 반응기가 필요하다. 효소 고정화와 생물반응기 기술은 high fructose corn syrup(HFCS)의 제조에 사용되기 시작하여 생물산업의 많은 분야에서 적용되고 있다. β -Galactosidase는 porous glass bead, 이온교환수지, polyacrylamide gel 등과 같은 다양한 담체에 고정화하고 있으며,^{5,7)} 특히 GOS의 제조에는 Merckogel(controlled pore silica gel)과 Duolite ES-762(phenolformaldehyde resin)를 사용하는 것이 알려져 있다.^{8,9)}

본 연구에서는 *Bacillus* sp. A 4442 유래의 GOS 생성활성이 우수한 β -galactosidase를 다공형 음이온 교환수지에 고정화할 경우 고정화 효소의 활성에 영향을 주는 변수들을 조사하여 고정화 조건을 최적화하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 사용기기

고정화 담체로는 Mitsubishi Kasei사(일본)의 강염기성 음이온 교환수지인 Diaion™ HPA 75를 사용하였다. 고정화 효소의 활성 측정에 사용한 유당과 포도당 정량시약은 Sigma사(St. Louise, Mo., USA)에서 구입하였다.

조효소액의 탈염과 농축은 Prep/Scale™-TFF cartridge (Millipore사, USA) 한외여과막(MWCO 10,000)과 Masterflex 정량펌프(Cole Parmer사, USA)를 이용하여 수행하였다. 효소 고정화는 항온 진탕기(비전과학, 한국) 또는 Janke & Kunkel사(독일)의 병렬형 교반기(model RER S 1)를, 조효소의 동결건조는 Virtis사(Gardiner, N.Y., USA)의 동결건조기(model Genesis 25EL)를 이용하였다.

효소발효

실험에 사용한 균주는 (주)미원 중앙연구소에서 보관중인 *Bacillus* sp. A 4442 변이주이며, 효소생산은 전보와 동일한 방법으로 수행하였다.

효소활성 측정

50 mM 인산 완충액(pH 6.0)에 유당을 1 M로 용해한 기질용액 50 ml를 50°C에서 10분간 예열한 후 조효소액 혹은 고정화 효소를 넣고 150 rpm으로 진탕하여 30분간 반응시켰다. 반응액을 끓는 물에 5분간 방치하여 반응을 정지시키고 생성된 포도당의 양을 포도당 산화효소와 peroxidase를 이용한 발색반응으로 정량하였다. 효소활성 1단위(unit)는

찾는말 : *Bacillus* sp. A 4442, β -galactosidase, immobilization, bioreactor, galactooligosaccharides, continuous conversion

*연락처

1분당 1 μmole 의 포도당을 생성하는데 필요한 효소량으로 정의하였다.

단백질 정량

조효소액의 단백질의 농도는 Bovine Serum Albumin (BSA)를 표준품으로 하여 Bradford의 방법¹⁰⁾으로 측정하였으며, 담체에 고정화된 단백질량은 고정화 전·후, 조효소액의 단백질 농도를 측정하여 계산하였다.

조효소액의 제조 및 효소 고정화

발효액을 원심분리(10,000 \times g, 4°C, 5분)하여 균체를 제거하고 상등액을 한외여과막으로 2배 농축한 후 동량의 완충액(25 mM Tris, pH 8.0)을 가하고 동일하게 다시 농축하여 염이 제거된 조효소액을 준비하였다. 담체는 증류수로 충분히 세척한 후 흡입 플라스크로 여과하여 수분을 제거한 상태에서 모든 고정화 실험에 사용하였다. 효소 고정화는 담체 2g과 조효소액을 혼합하여 실온에서 150 rpm으로 교반하여 실시하였다. 고정화 실시후 담체와 조효소액을 분리하여 담체는 증류수로 수세하여 고정화된 효소의 활성을, 조효소액에서는 잔존 단백질 함량과 효소활성을 각각 측정하였다.

고정화 효소를 이용한 GOS의 연속 생산

GOS의 연속생산을 위한 생물반응기로는 온도조절용 water jacket이 부착된 packd-bed reactor(PBR; 1.5 \times 21 cm)를 이용하였다. 고정화 효소 10 g을 충전하고 55°C에서 기질인 40%(w/w) 유당(pH 6.0) 용액을 공간속도(space velocity) 1.5 hr⁻¹로 연속적으로 공급하였다. 반응액의 당 조성은 전보에서와 동일한 방법⁹⁾으로 분석하였다.

결과 및 고찰

pH 및 염 농도의 영향

효소의 고정화 방법으로는 흡착법, 이온결합법 및 공유결합법이 많이 이용된다. 이미 알려진 담체들을 실용적인 측면에서 검토한 결과, 본 연구에서도 프락토올리고당 생성효소인 fructosyltransferase의 고정화에 사용하는¹¹⁾ 다공형 음이온 교환수지가 적절한 것으로 판단되었다. 실험에 사용한 담체인 Diaion™ HPA 75는 styrene-divinylbenzene resin으로 효소 고정화에 적합한 다공형의 수지로서,¹²⁾ 담체에 효소를 이온결합으로 고정화하고 가교제를 처리하여 고정화 효소의 안정성을 증가시키는 방법을 이용하였다.

실온에서 조효소액과 담체의 접촉시간에 따른 고정화 효소의 활성변화를 측정된 결과 약 3시간이 경과하면 평형에 이르는 것으로 확인되었기에 고정화 시간은 3시간으로 정하였다(Fig. 1). 평형에 도달하는 시간은 효소의 종류와 고정화 조건에 따라 차이가 있다. 예를 들면 penicillin acylase를 polyacrylic resin인 Amberlite XAD 7에 흡착시킬 경우 평형에 도달하는 시간은 1000분 이상으로 보고되어 있다.¹³⁾

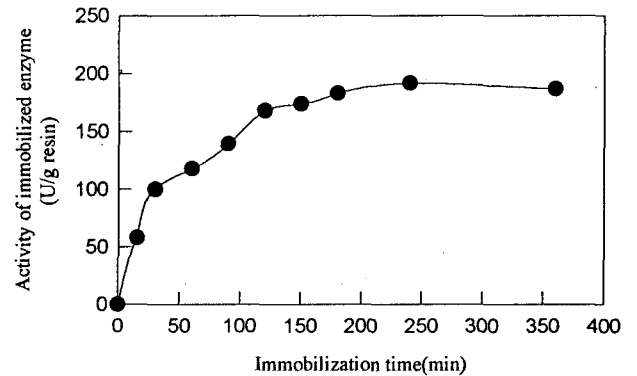


Fig. 1. Time course of β -galactosidase immobilization. Crude enzyme(100 ml) was mixed with Diaion™ HPA75(4 g) and incubated with shaking(150 rpm).

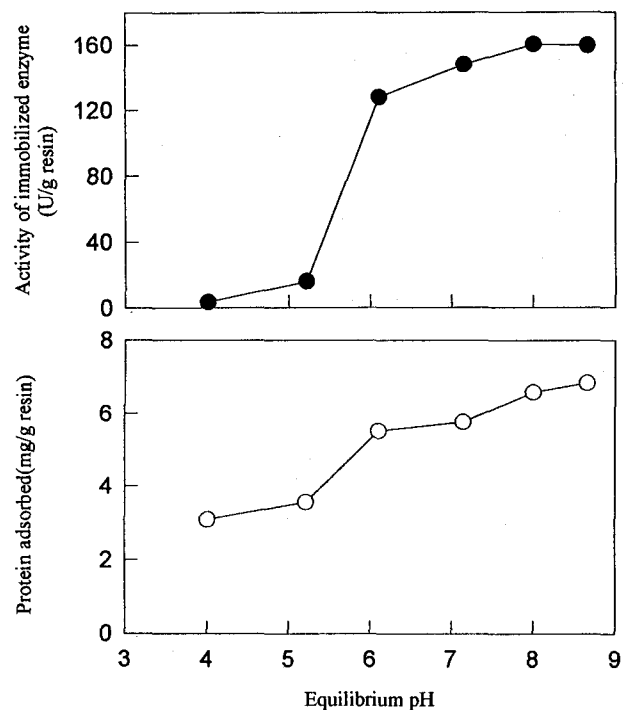


Fig. 2. Effects of equilibrium pH on the activity of immobilized β -galactosidase(●—●) and on the protein adsorption(○—○). Freeze-dried enzyme(50 mg) dissolved in phosphate buffer(50 mM) with varied pH(4~9) was mixed with Diaion™ HPA75 and incubated with shaking(150 rpm) for 3 hr at room temperature.

단백질은 수용액의 pH에 따라 그 충전하가 달라지므로 이온결합으로 고정화하는 경우 pH는 효소가 고정화되는 정도에 영향을 준다. 고정화의 최적 pH를 찾기 위하여 동결건조한 조효소를 pH 4~9의 50 mM 인산 완충액 20 ml에 용해하여 담체 2g에 고정화한 후 활성을 비교하였다(Fig. 2). pH 5 이하에서는 고정화가 실질적으로 일어나지 않았으나 pH 6에서 효소 고정화율이(단백질 흡착량과 효소활성에서 공히) 급격히 증가하였으며 그 이후에는 pH에 따라 서서히 증가하여 pH 8에서 최대치에 도달하였다. 이는 사용한 효소의 등전점이 pH 5.0~5.1(미발표 데이터)라는 사실과 부합되는 결과이며, 용액중 잔존 효소활성 역시 예상

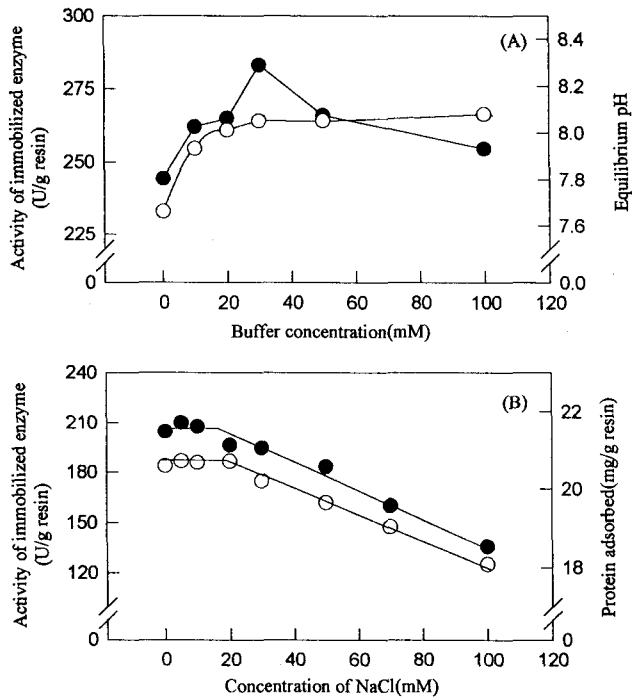


Fig. 3. (A) Effects of buffer concentration on activity of immobilized β -galactosidase(●—●) and equilibrium pH. Immobilization conditions were the same as in Fig. 2 except that Tris concentrations of the buffer were varied in the range of 0 to 100 mM. (B) Effects of NaCl addition on the protein adsorption(○—○) and activity of immobilized enzyme(●—●) β -galactosidase. Immobilization conditions were the same as in Fig. 2, except that NaCl(0~100 mM) was added to Tris buffer(25 mM and pH 8).

한대로 pH 5 근처에서 최고치를 보였다.

완충액의 최적 농도를 결정하기 위하여 0~0.1 M Tris-HCl 완충액(pH 8.0) 30 ml에 동결건조한 효소를 용해하여 담체 2g에 고정화하고 활성을 비교하였다(Fig. 3-A). 완충액의 농도가 낮을 때(30 mM 이하) 고정화 효소의 활성도 낮은 것은 고정화 과정에 일어난 pH 변화에 기인하며, 30 mM 이상의 농도에서 활성이 감소하는 것은 고정화된 효소가 완충액에 존재하는 음이온(주로 Cl⁻)에 의하여 탈착되는 것으로 해석된다. 따라서 음이온 농도의 영향을 확인하기 위하여 25 mM Tris 완충액(pH 8.0)으로 조효소액을 제조하고 NaCl(0~0.1 M)을 첨가하여 고정화를 실시하였던 바 (Fig. 3-B) 예상한 대로 NaCl 20 mM 이상의 농도에서는 효소 활성과 흡착된 단백질량이 급격히 감소하였다. 이러한 결과로 미루어 보아 고정화 과정 중에 pH변화가 일어나지 않는 한 될 수 있는대로 낮은 농도의 완충용액(예컨대 25~30 mM)을 사용하는 것이 고정화율을 높이는 데 필요한 일이라고 판단된다.

단백질부하(protein loading)의 영향

정제하지 않은 효소를 사용하는 경우에는 배양액에 존재하는 β -galactosidase 이외의 다른 단백질도 고정화에 참여하여 효소와 경쟁할 것이다. 이를 입증하기 위하여 조효소액의 농도를 달리하여 고정화를 실시하였다. 동결건조한 조

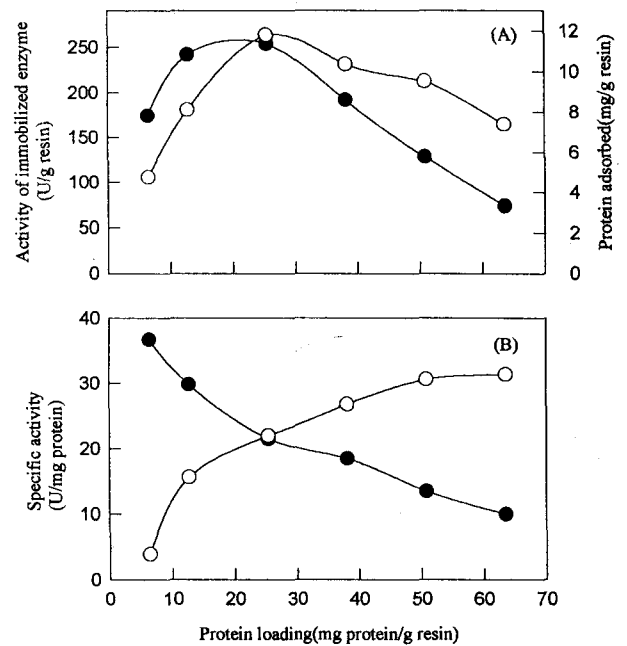


Fig. 4. Effects of protein loading on: (A) the activity of immobilized β -galactosidase(●—●) and protein adsorption(○—○) and (B) the specific activities of immobilized enzyme(●—●) and residual enzyme(○—○) β -galactosidase. Immobilization conditions were the same as in Fig. 2 except that different amounts (16~128 mg) of freeze-dried enzyme were dissolved in Tris buffer(25 mM and pH 8.0).

효소(12~125 mg protein)를 25 mM Tris 완충액(pH 8.0) 30 ml에 용해한 후 담체 2g에 고정화하였다(Fig. 4). 정제된 효소를 고정화하는 경우, 고정화 효소의 활성은 단백질 부하량에 따라 증가하면서 점차적으로 포화되는 것이 일반적인 현상이다.^{14,15)} 본 연구에서는 단백질 부하가 증가할수록 고정화 효소의 비활성(specific activity)은 감소하였으며(간류 조효소액 중의 효소 비활성은 반대로 증가), 단백질 부하량 25 mg protein/g resin에서 고정화 효소의 활성과 단백질 흡착량이 최고치를 보였다. 이와같은 특이한 현상은 glucose oxidase, catalase 등의 고정화에서도 보고되었으며, 이는 소량 함유되어 있는 분자량이 작은 불순물이 우선적으로 결합하거나, 효소용액에서 효소와 경쟁하여 우선적으로 결합하는 단백질이나 실활되어 성질이 변한 효소가 존재하기 때문이라고 설명되었다.^{16,17)} 본 실험의 결과도 이와 유사하게 경쟁적이고 가역적인 이온교환 반응으로 설명할 수 있다. 총단백질부하가 낮은 조건(20 mg protein/g resin 이하)에서는 담체의 결합부위(binding site)에 여유가 있어 고정화 효소의 활성은 부하에 따라 커질 것이다. 그러나 부하가 포화점 이상을 상회하게 되면 효소와 다른 단백질 및 음이온들은 서로 경쟁하여 그중 상대적 친화력이 강한, 즉 결합상수가 큰, 물질이 우선적으로 결합하게 될 것이다. 이때 친화력이 약한 효소는 탈착이 일어나 고정화 효소의 활성이 감소하게 된다. 단백질 부하가 증가함에 따라 조효소액과 고정화된 효소의 비활성이 서로 반대의 경향을 보이는 결과와 단백질 부하가 높은 조건에서 고정화한 경우 조효소액의 비활성(31.4 U/mg protein)이 고정화 전의

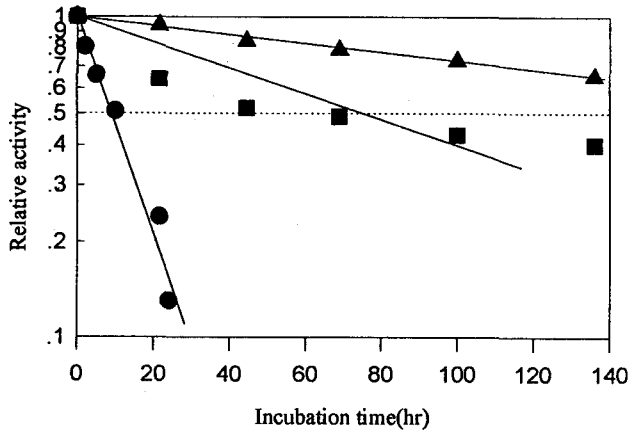


Fig. 5. Thermal stability of free and immobilized β -galactosidase at 55°C. (●—●), free enzyme; (■—■), glutaraldehyde non-treated immobilized enzyme; (▲—▲), glutaraldehyde treated immobilized enzyme in the presence of substrate, respectively.

비활성(28.4 U/mg protein)보다 증가한 사실이 그러한 설명의 근거가 될 수 있다.

가교제의 영향

이온결합으로 고정화한 효소는 기질중에 함유되어 있는 이온성 물질에 의하여 탈착이 일어나기 쉬우므로 이를 방지하여 효소의 운전 안정성(operational stability)을 향상시키는 것이 필요하다. 이러한 목적으로 사용되는 가교제(cross-linking agent)는 담체와 담체, 담체와 효소간의 공유결합을 통해 연결하는 기능을 갖는다. 효소 고정화에 널리 사용하는 가교제로는 glutaraldehyde가 있다.¹⁸⁾ 가교반응(cross-linking reaction)에 필요한 glutaraldehyde의 최소량을 측정하기 위하여 담체에 β -galactosidase를 고정화 한 다음 0~3%(v/v) glutaraldehyde를 첨가하고 상온에서 1시간 동안 교반하여 가교반응을 시켰다. 증류수로 충분히 세척한 후 0.1 M NaCl(10 ml/g carrier)을 첨가하여 상온에서 1시간 동안 효소를 탈착시킨 다음 고정화 효소의 잔존활성을 측정하였다. 그 결과, glutaraldehyde 0.5%(v/v) 이상의 농도에서는 잔존활성이 유사하였기에(데이터 제시는 생략함) 0.5%를 최적농도로 정하였다.

가교제의 처리가 고정화 효소의 열 안정성에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 5). 55°C의 기질용액에 방치하면서 경시적인 실활정도를 측정 비교한 결과, 유리효소는 그 열 불활성화반응의 반감기가 0.4일인데 비해 고정화 효소인 경우 3.1일이었으며 가교제를 처리한 고정화 효소에서는 9.6일로 나타났다. 즉 가교제의 처리가 최소한 3배 이상의 팔목할만한 열안정성 향상효과를 보인다는 사실을 고정화된 β -galactosidase에서도 확인할 수 있었다.

또한, 고정화 효소의 운전 안정성에 대한 가교반응의 효과를 생물반응기에서 연속반응조건으로 조사하였다. 고정화 효소를 각각 8g씩 PBR에 충전하고, 단시일내에 효과를 비교하기 위하여 기질인 40%(w/w) 유당용액에 25 mM CaCl_2 를 첨가하고 공간속도 3.0 hr⁻¹으로 빠르게 통액하여 경시적으로 당의 조성을 분석하였다.(Fig. 6) 가교반응으로

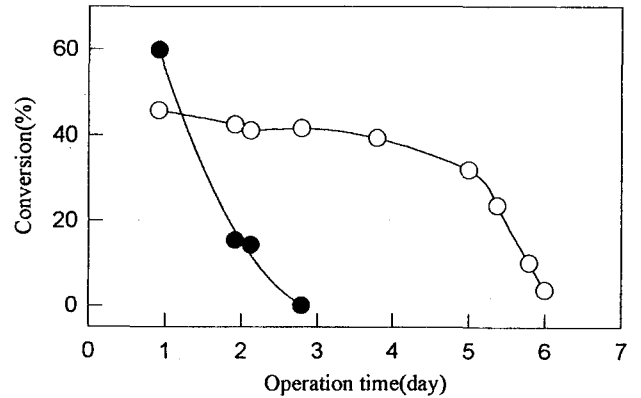


Fig. 6. Effects of glutaraldehyde treatment of immobilized β -galactosidase on the operational stability. % conversion of substrate to galactooligosaccharides by a packed-bed reactor was measured, using glutaraldehyde-treated(○—○) and untreated immobilized enzyme(●—●). Operation conditions: substrate, 40%(w/w) lactose+25 mM CaCl_2 (pH 6.0); temperature, 55°C; SV, 3.0 hr⁻¹.

Table 1. Characteristic performance of β -galactosidase immobilization methods for galactooligosaccharides(GOS) production by packed-bed reactor.

Performance parameters (unit)	Adsorption	Adsorption+Cross-linking
Activity recovery (%)	50~55	40~45
Space velocity (hr ⁻¹)	1.7	1.5
Productivity (g GOS/L/hr)	374	330
Specific production* (g GOS/g carrier)	56	297

*Specific production: total amounts of commercial valuable GOS produced by 1 g immobilized β -galactosidase in packed-bed reactor.

고정화한 효소는 효소가 glutaraldehyde와의 반응으로 부분적으로 실활되어 초기활성이 220 U/g resin에서 180 U/g resin로 약간 낮아졌으나 그 대신 약 4일간 일정한 전환율을 유지하였고, 대조구는 염에 의한 탈착으로 전환율이 매우 급격하게 감소하였다. 전환율 20%를 기준으로 하여 비교했을 때 가교제에 의하여 고정화 효소의 안정성이 약 1.7일에서 5.5일로 약 3배 정도 향상되는 것을 알 수 있다.

일반적으로 GOS의 함량이 고형분 기준으로 50% 이상되어야 상업적으로 가치가 있다. 상업적으로 생물반응기에서 고정화 효소로 GOS을 연속 생산함에 있어 가교반응을 이용하여 효소를 고정화하는 것은 단순히 이온결합으로 고정화하는 방법에 비하여 고정화율은 약간 낮으나 단위 고정화 효소당 생산량은 5배 이상 우수하였다.(Table 1). 이는 고정화 효소의 열 안정성과 운전 안정성의 향상에 기인하는 것으로 해석된다.

감사의 글

본 연구는 과학기술처의 특정연구개발사업으로 수행된 연구결과와 일부이며 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1. Matsumoto, K., Y. Kobayashi, N. Tamura, T. Watanabe and T. Kan (1989) Production of galactooligosaccharides with β -galactosidase. *Denpum Kagaku*, **36**(2), 123-130.
2. Prenosil, J.E., E. Stuker and J. R. Bourne (1987) Formation of oligosaccharides during enzymatic lactose: Part I: State of art. *Biotechnol. Bioeng.*, **30**, 1019-1025.
3. 인만진, 김민홍, 정진 (1995) 갈락토스 전이활성이 높은 β -galactosidase 생산균의 분리 및 효소생산과 관련된 몇가지 특징. *한국농화학회지*, **38**(6), 502-506.
4. 인만진, 최경호, 양성준, 김민홍, 한금수, 양지원, 정진 (1995) 변이주 *Bacillus* sp. A4442에 의한 갈락토스 전이활성이 높은 β -galactosidase의 생산. *한국농화학회지*, **38**(6), 507-511.
5. Sugiura, M., M. Suzuki and M. Sasaki (1977) Immobilization and properties of β -galactosidases from *Macrospora phaseoli* and *Sclerotium tuliparum*. *J. Ferment. Technol.*, **55**(6), 575-580.
6. Okos, M. R., E. A. Grulke and A. Syverson (1978) Hydrolysis of lactose in acid whey using β -galactosidase adsorbed to a phenol formaldehyde resin. *J. Food Sci.*, **43**, 566-571.
7. Dahlqvist, A., B. Mattiasson and K. Mosbach (1973) Hydrolysis of β -galactosides using polymer-entrapped lactase. A study towards producing lactose-free milk. *Biotechnol. Bioeng.*, **15**, 395-402.
8. Mozaffar, Z., K. Nakanishi and R. Matsuno (1986) Continuous production of galacto-oligosaccharides from lactose using immobilized β -galactosidase from *Bacillus circulans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **25**, 224-228.
9. Nakanishi, K., R. Matsuno, K. Torii, K. Tamamoto and T. Kamikubo (1983) Properties of immobilized β -D-galactosidase from *Bacillus circulans*. *Enzyme Microb. Technol.*, **5**, 115-120.
10. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
11. Kim, M. H., S. S. Choi, M. J. In, I. S. Choi, M. S. Han and B. S. Lim (1993) Immobilization of fructosyltransferase on a basic, porous anion-exchange resin. US Patent, 5,215,905.
12. Mitsubishi Kasei Corporation (1993), In 'Diaion™ Manual of ion exchange resins and synthetic adsorbent', 2nd Ed., p151, Nihon Insatsu Kogei, Tokyo, Japan.
13. Carleysmith, S. W., P. Dunnill and M. D. Lilly (1980) Kinetic behaviour of immobilized penicillin acylase. *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 735-756.
14. Koga, J., K. Yamaguchi and S. Gondo (1984) Immobilization of alkaline phosphatase on activated alumina particles. *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 100-103.
15. Geluk, M. A., W. Norde, H. K. A. I. Van Kalsbeek and K. Van't Riet (1992) Adsorption of lipase from *Candida rugosa* on cellulose and its influence on lipolytic activity. *Enzyme Microb. Technol.*, **14**, 748-754.
16. Wasserman, B. P., H. O. Hultin and B. S. Jacobson (1980) High-yield method for immobilization of enzymes. *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 271-287.
17. Sandwick, R. K. and K. J. Schary (1988) Conformational states of enzymes bound to surfaces. *J. Coll. Interface Sci.*, **121**, 1-12.
18. Monsan, P. (1977/78) Optimization of glutaraldehyde activation of a support for enzyme immobilization. *J. Mol. Catalysis*, **3**, 371-384.

Immobilization of β -Galactosidase with High Transgalactosylation Activity from *Bacillus* sp. A4442 Mutant

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

Abstract : For continuous production of galactooligosaccharides(GOS), β -galactosidase with high transgalactosylation activity from *Bacillus* sp. A 4442 was immobilized onto Diaion™ HPA 75(styrene-divinylbenzene resin). The parameters influencing enzyme immobilization were scrutinized in order to maximize immobilization yield while minimizing enzyme inactivation. The optimum conditions turned out to be: Tris buffer concentration 30 mM, pH 8.0, contact time at room temperature 3 hr, and enzyme loading 25 mg protein/g resin. Both the thermal stability and the operational stability of immobilized enzyme were markedly enhanced by the treatment with 0.5% glutaraldehyde as a cross-linker. Under the experimental conditions established, the yield of β -galactosidase immobilization was 40% or more and the activity of the immobilized enzyme ca. 200 U/g resin. When a packed-bed reactor was employed to continuously convert lactose to GOS, the specific production, which refers to as the amount of commercially valuable GOS produced by a unit amount of immobilized β -galactosidase, was found to be ca. 300 g GOS/g carrier.

*Corresponding author