Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 26, No. 1, 40–44 (1998)

Penicillium sp. KFCC 10888이 생산하는 갈락토스 전이활성이 우수한 β-Galactosidase의 특성

인만진* · 채희정
대상(주) 중앙연구소

Characteristics of β-Galactosidase with High Transgalactosylation Activity Produced by *Penicillium* sp. KFCC 10888. In, Man-Jin* and Hee Jeong Chae. *R & D Center, Daesang Corp., Ltd., Ichon 467-810, Korea* – A *Penicillium* strain which produces β-galactosidase with high transgalactosylation activity, was isolated from soil and registered as *Penicillium* sp. KFCC 10888. When β-galactosidase from *Penicillium* sp. KFCC 10855 reacted with 40% lactose, transgalactosylation ratio reached up to 70% at the 73% conversion of initial lactose. The biosynthesis of the enzyme in *Penicillium* sp. KFCC 10888 was not induced by lactose. The soybean meal was an effective component of the culture medium. The optimum pH and temperature for transgalactosylation were 4.0 and 55℃, respectively. The production of galactooligosaccharides was in proportion to the initial lactose concentration. When the enzyme reacted with 40% lactose (pH 4.0) at 55℃, the concentration of galactooligosaccharides increased up to 40% of total solid concentration.

Key words: *Penicillium* sp. KFCC 10855, β-galactosidase, transgalactosylation activity

β-Galactosidase(β-D-galactoside galactohydrolase; EC 3.2.1.23)는 우유와 cheese whey에 함유되어 있는 유당을 가수분해하여 유당의 소화, 흡수가 어려운 사람에게 적합한 우유제품을 제공할 뿐만 아니라 유제품의 감미도와 용해성을 증가시키기 위하여 오랫동안 사용하여온 효소이다. 또한 whey의 경우는 그 이용성을 높여주는 효과가 있다. 그러므로 β-galactosidase에 관한 초기의 응용적 연구는 주로 세균, 효모, 곰팡이 등을 이용하여 가수분해 활성이 우수한 효소를 대량생산하는데 집중되었으며, *Aspergillus niger, Aspergillus oryzae, Kluyveromyces fragilis, Kluyveromyces lactis*가 생산하는 β-galactosidase는 안전성이 입증되어 널리 사용되고 있다[4].

그러나 근래에 유당의 가수분해 반응 초기에 부산물로 생성되는 갈락토올리고당이 장내 유익세균총인 비피더스균의 증식인자로 작용하는 기능성이 부각되면서 *Aspergillus oryzae*[18], *Kluyveromyces lactis*[3], *Streptococcus thermophilus*[5], *Aspergillus niger*[9], *Tricoderma harzianum*[15] 등과 같은 몇몇 미생물이 생산하는 β-galactosidase를 이용하여 올리고당을 제조하는 연구가 보고되어 있다. 그러나 이들 미생물이 생산하는 효소는 갈락토스의 전이활성이 높지 못하여 상업적인 목적으로 사용하기에는 어려움이 있다. 따라서 높은 수율로 갈락토올리고당을 제조하기 위하여는 갈락토스 전이활성이 우수한 β-galactosidase가 필요하며, 상대적으로 높은 갈락토스 전이활성을 갖는 효소를 생산하는 미생물로는 *Sterigmatomyces elviae*[14], *Bacillus circulans*[11], *Saccharopolyspora rectivirgular*[12], *Rhodotorula minuta*[13], *Bacillus* sp.[8] 등이 알려져 있다.

본 연구에서는 토양으로부터 갈락토스 전이활성이 상당히 높은 β-galactosidase를 생산, 분비하는 곰팡이를 선발하여 부분적으로 동정하였고, 효소 생산효율을 높이기 위한 균주의 배양조건과 갈락토올리고당의 제조와 관련된 효소의 몇가지 성질을 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, 밀기울(wheat bran)과 콩가루(soybean meal)는 사료용을 구입하였다.

효소활성 측정에는 Uvikon 810 spectrophotometer (Kontron사, Swiss)를 이용하였으며, cation exchange chromatography(column: Sugar-Pak, Waters, USA)와 normal phase partition chromatography(column: Econosphere NH_2, Alltech, USA) 그리고 RI detector를 이용하여 당분석을 실시하였다.

*Corresponding author
Tel. 82-336-39-2081, Fax. 82-336-638-2800
E-mail:

효소활성 측정

배양액을 4℃에서 5분간 원심분리(10,000×g)하여 조효소액을 얻었으며, 효소의 가수분해활성 측정은 ONPG를 기질로 하는 Miller의 방법[10]을 변형하여 수행하였다. 기질인 ONPG를 50 mM citrate buffer(pH 4.0)에 용해하여 조효소와 반응시키고, 생성된 *o*-nitrophenol (ONP)의 양은 420 nm에서 흡광도로 측정하였고, 효소활성 1단위(unit)는 1분당 1 μmole의 ONP를 유리하는데 필요한 효소량으로 정의하였다. 또한 5% 유당 용액[50 mM citrate buffer(pH 4.0)에 용해]을 기질로 하여 생성된 포도당을 HPLC로 측정하여 가수분해 활성을, 생성된 삼당류를 4-galactosyllactose를 표준품으로 HPLC로 측정함으로써 전이활성을 계산하였다. 효소활성 1단위(unit)는 1분당 1 μmole의 포도당 혹은 galactosyllactose를 유리하는데 필요한 효소량으로 정의하였다. 단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준품으로 Bradford방법[2]으로 정량하였다.

전환율, 전이율의 측정

효소의 전이활성을 비교하는 지표인 전환률, 전이율은 인 등의 방법[8]으로 측정하였다.

균의 분리 및 배양

토양시료를 멸균한 생리식염수로 10단계씩 단계적으로 희석하여 미리 X-gal이 첨가된 potato dextrose agar 배지에 도말하고 28℃에서 5~7일간 배양하여 청색 colony만을 선택하였다. 선택한 균주를 밀기울과 유당을 함유한 선별배지에 7일간 배양한 후 밀기울량의 5배로 증류수를 넣고 실온에서 2시간 진탕하여 효소를 추출하였다. 추출한 조효소액을 유당과 반응시켜 높은 전환률과 전이율을 보이는 균주를 최종 선발하여 보존용 배지에 보관하면서 본 실험에 사용하였다. 각종 배지의 조성은 다음과 같다. 균주선별용 배지: 밀기울 30 g, 1% 유당용액 30 ml, 효소생산용 종배양 배지: 포도당 20 g/L, 밀기울 20 g/L, KH_2PO_4 5 g/L, malt extract 4 g/L, yeast extract 2.0 g/L. 본배양 배지: 밀기울 20 g/L, 콩가루 20 g/L, KH_2PO_4 20 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 5.0 g/L, KCl 2 g/L. 보존용 배지: potato dextrose agar 배지(Difco사 제품).

결과 및 고찰

전이활성이 우수한 효소 생산균의 분리와 부분동정

가수분해활성에 비하여 전이활성이 우수한 효소를 선별하기 위한 기준인 전환율과 전이율에 대한 정의와 판단 근거는 이미 보고[8]하였으므로 그대로 이용하였다. 토양으로부터 X-gal을 분해하여 청색을 나타내는 곰팡이 40여종을 1차로 선별하고 이들 균주로부터 제조한 조효소액을 유당과 반응시켜 전이율과 전환율을 계산하였다. 일반적으로 대부분의 균주들이 전환율이 높아지면 전이율이 낮아지나[16], 73%의 전환율에도 불구하고 70% 내외의 전이율을 보이는 균주 1종을 선별하였다. 40%의 유당용액에 55℃, pH 4.0에서 효소를 반응시킨 결과 고형분 중 올리고당의 함량이 약40%로 높았으며 이는 기존의 갈락토스 전이활성이 우수하다고 보고된 효소들과 비교하면(Table 1) 크게 뒤지지 않는 결과로 올리고당의 제조에 이용이 가능할 것으로 판단되었다.

선별한 균주를 Czapek's agar와 potato dextrose agar 배지에서 28℃로 7일간 배양하면 colony의 색은 흰색에서 회녹색으로 변하였다. 광학현미경으로 특성을 조사한 결과 균사는 격벽을 가지고 있었으며 분생자병(sterigmata)의 끝은 분지하였고 팽대하지는 않았으며 분생포자는 거의 구형이었다. 이상의 형태학적인 특성으로 선별한 균주는 *Penicillium* sp.임을 알 수 있었으며 한국종균협회에 기탁하여 KFCC 10888로 등록하였다.

효소생산

Penicillium sp. KFCC 10888의 배양은 사면배지에서 포자로부터 시작하였다. 일정한 포자수를 종배양 배지에 접종하기 위하여 Haemacytometer로 측정한 포자수와 650 nm에서의 흡광도간의 상관관계를 구하였다. 포자수

Table 1. Comparision of maximum oligosaccharides production by transgalactosylation of β-galactosidases derived from various strains

Strain	Initial lactose concentration (%)	Lactose conversion (%)	Oligosaccharides concentration (%)*	Ref.
Escherichia coli	20	93	24.0	[6]
Sterigmatomyces elviae	36	64	37.5	[14]
Bacillus circulans	4.7	61	41.0	[11]
Saccharopolyspore rectivirgular	60	80	43.8	[12]
Rhodotorula minuta	20	57	38	[13]
Bacillus sp.	50	70	50	[8]
Thermus aquaticus	16	80	35	[1]
Penicillium sp.	40	73	40	this work

*Percentage of total sugar.

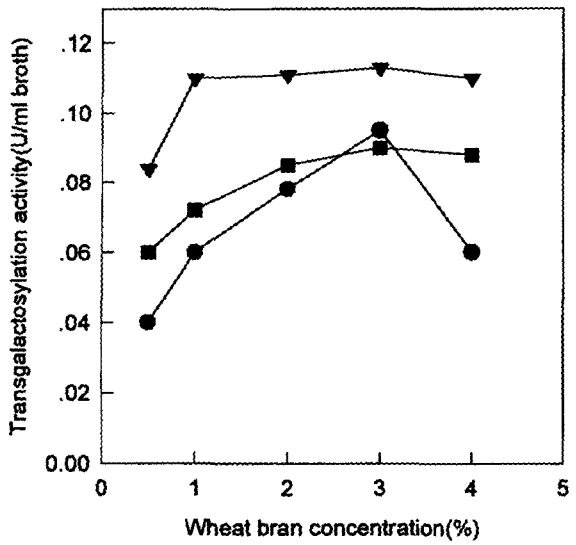

Fig. 1. The effect of wheat bran and soybean meal on the β-galactosidase production of *Penicillium* sp. KFCC 10888.
Penicillium sp. KFCC 10888 was grown at 28℃ for 3 days on the culture media containing 0% (●), 0.5% (■) and 2% (▼) soybean meal.

Table 2. Effect of lactose on β-galactosidase production from *Penicillium* sp. KFCC 10888

	Enzyme activity (U/mg protein)*		
	3 day culture	4 day culture	5 day culture
Control	0.14	0.17	0.12
Lactose	0.19	0.21	0.15

*Enzyme activity of *Penicillium* sp. KFCC 10888 culture was measured for transgalactosylation.

10^7 spores/ml의 포자 현탁액 1 ml를 진탕 플라스크의 종배양 배지 50 ml에 접종하여 28℃에서 180 rpm으로 진탕배양하면서 균의 생육을 건조 균체량으로 측정한 결과 약 30시간이 경과하여야 대수증식기에 도달하며 약 60시간이 경과하면 성장이 정지되었다. 따라서 40시간 종배양하여 본배양의 seed로 사용하였다. 본배양도 종배양과 동일하게 2~4일간 배양 후 원심분리하여 조효소를 얻었다. 곰팡이의 표면발효(surface fermentation) 시 배지로 많이 사용되는 밀기울과 콩가루의 영향을 밀기울 0.5~4%, 콩가루 0~2%로 각각 첨가하여 4일간 배양한 후 효소의 전이활성을 측정하였다(Fig. 1). 콩가루의 농도와 효소 활성은 비례관계이었으나 밀기울은 2% 이상의 농도에서는 영향이 없었다. 유당에 의한 효소 생합성의 유도현상을 조사하기 위하여 본배양 배지에 유당을 3% 첨가하여 4일간 배양한 결과 유당첨가한 경우 β-galactosidase의 비활성이 다소 향상되었으나 그 정도가 미미하여 *Penicillium* sp. KFCC 10888의 β-galactosidase는 inducible enzyme이 아닌 것으로 판단되었다 (Table 2).

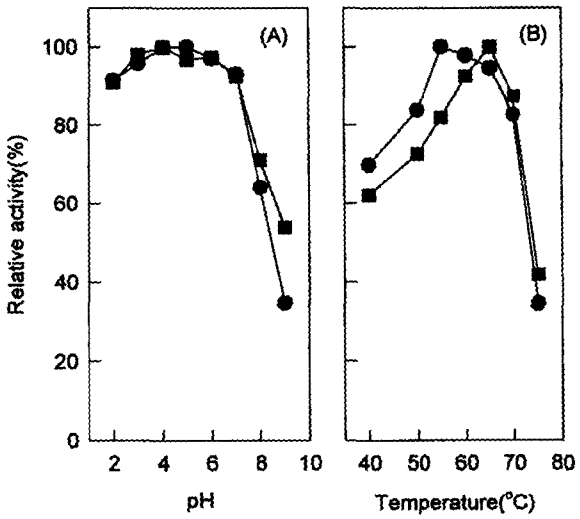

Fig. 2. The effects of pH (panel A) and temperature (panel B) on the transgalactosylation acticity (●) and hydrolysis activity (■) of β-galactosidase produced from *Penicillium* sp. KFCC 10888.
Enzyme activities were measured with lactose as a substrate.

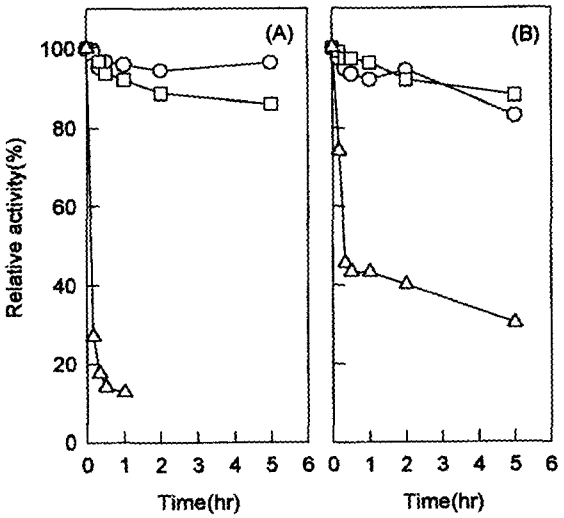

Fig. 3. The pH stability of transgalactosylation (panel A) and hydrolysis activity (panel B) of β-galactosidase produced from *Penicillium* sp. KFCC 10888.
Symbols: ○, pH 4; □, pH 6; △, pH 7.

효소의 특성

본배양액으로부터 균체를 제거하여 얻은 조효소액을 이용하여 효소의 반응특성을 조사하였다. 먼저 효소 활성에 대한 pH의 영향을 조사하기 위하여 pH에 따라 다른 종류의 50 mM완충액을 사용하여 5% 유당을 기질로 가수분해 활성과 전이활성을 측정한 결과 최적 pH는 4.0으로 동일하였다. 그러나 pH 3~6의 범위에서 최대활성의 90% 이상을 유지하는 특성을 보였다(Fig. 2A). 효소 활성에 대한 온도의 영향을 40~75℃의 범위에서 동일한 기질로 측정한 결과 가수분해 반응의 최적 온도는 65℃,

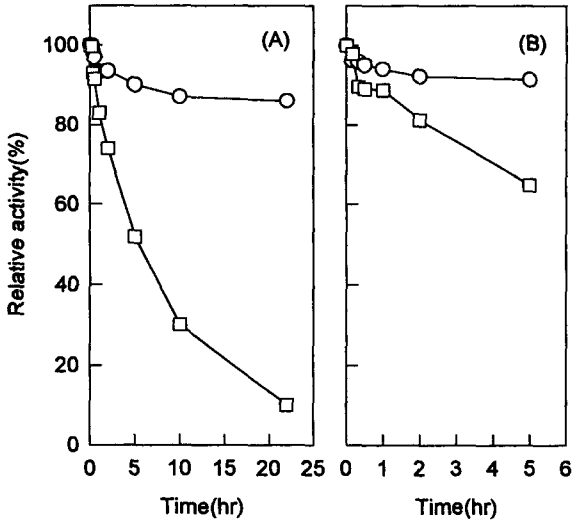

Fig. 4. The thermal stability of transgalactosylation (panel A) and hydrolysis activity (panel B) of β-galactosidase produced from *Penicillium* sp. KFCC 10888.
Symbols: ○, 55℃; □, 65℃.

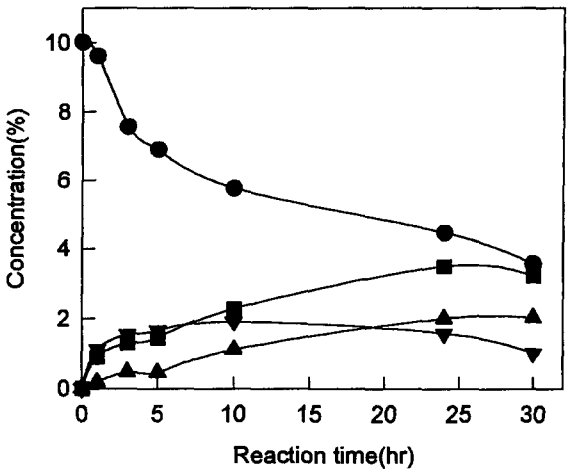

Fig. 5. Typical time course of lactose conversion to galactooligosaccharides.
The β-galactosidase from *Penicillium* sp. KFCC 10888 was incubated with 10% lactose solution (pH 4.0) at 55℃.
Symbols: ●, lactose; ■, glucose; ▲, galactose; ▼, galactooligosaccharides.

전이반응의 최적온도는 55℃로 서로 상이하였다(Fig. 2B). 조효소액을 pH 4~8의 완충액에 55℃로 incubation하면서 최적 pH조건에서 효소의 잔존활성을 측정하였던 바 가수분해활성과 전이활성 공히 pH 4~6사이에서는 매우 안정하였으나 pH 7에서는 활성이 급격히 감소되었으며 특히 전이활성의 감소 정도가 좀 더 급격하였다(Fig. 3). 본 효소는 다른 *Penicillium* 유래의 β-galactosidases[17, 19]와 유사하게 반응 최적pH가 산성이며, 중성과 염기성 조건에서는 쉽게 실활되는 효소이었다. 조효소액의 전이활성에 대한 온도의 안정성은 55℃에서는 20시간 이상 활성을 유지하였으나 65℃에서는 5시간만에 활성이 50% 감소하였다(Fig. 4A). 65℃에서는 5시간 incubation한 후 잔존활성은 65%로 가수분해활성의 온도 안정성은 전이활성보다 우수하였다(Fig. 4B). 이것은 가수분해 활성의 최적 온도가 전이활성의 최적 온도보다 약 10℃ 높은 사실과 부합되는 결과이다. *Penicillium* sp. KFCC 10888의 β-galactosidase는 가수분해활성과 전이활성 모두 산성 영역의 넓은 범위에서 높은 활성을 보이며, 비교적 높은 온도인 55℃에서 안정성이 우수하여 산업적으로 응용가능성이 높았다.

갈락토스 전이활성에 의한 갈락토올리고당의 생성을 조사하였다. 기질의 농도를 10~40%로 효소반응 최적조건(55℃, pH 4.0)에서 시간에 따른 갈락토올리고당의 생성을 조사하였다(Fig. 5). 갈락토올리고당의 생성량은 반응시간에 따라 증가하나 기질인 유당의 농도가 초기농도의 50% 이하로 감소하면(전환률이 50% 이하이면) 갈락토올리고당의 함량도 감소하는 경향이었다. 갈락토올리고당의 생성량은 기질로 40%의 유당을 사용한 경우 최대로 고형분 중 약 40%까지 증가하였으며, 올리고당의 생성량은 기질 농도에 비례하였으나(Table 3) 유당의 용해도가 낮아서 고농도로 사용하는 것은 곤란하였다. 이러한 문제점은 고온성 효소를 이용하면 높은 반응 온도로 인하여 기질의 농도를 높일 수 있으므로 어느 정도 해결될 수 있으며, 고온성 β-galactosidase를 이용한 갈락토올리고당의 제조에 관한 연구도 보고[7]되어 있다. *Penicillium* sp. KFCC 10888이 생산하는 β-galactosidase와 효소의 전이활성에 영향이 있는 인자들에 대하여 심도있게 연구가 진행된다면 갈락토올리고당의 생산량은 더욱 향상될 수 있으리라 기대된다.

Table 3. Effect of initial lactose concentration on galactooligosaccharides production

Lactose concentration (%)	Reaction time (hr)	Lactose conversion (%)	Oligosaccharides concentration (%)*
10	10	52.0	19.1
20	24	49.4	29.3
30	48	56.1	30.9
40	96	54.6	40.5

*Percentage of total sugar. Enzyme was incubated with lactose solution (pH 4.0) at 55℃.

요 약

토양으로부터 갈락토스 전이활성이 우수한 β-galactosidase를 생산하는 미생물을 분리하고 부분동정하여 한국종균협회에 *Penicillium* sp. KFCC 10888로 등록하였다. 효소는 40% 유당 용액에서 초기 유당의 73%가 전환되었을 때 70%의 높은 전이율을 보였다. 효소의 생합성

은 유당에 의하여 유도되지 않았으며 배지성분으로는 콩가루가 효소 생산에 효과적이었다. 효소의 갈락토스 전이반응에 대한 최적 pH는 4.0, 최적온도는 55℃이었으며, 55℃에서 열안정성이 우수하였다. 갈락토올리고당의 생성량은 기질의 농도에 비례하였으며, 40% 유당용액의 경우 갈락토올리고당의 함량은 고형분중 40%까지 향상되었다.

감사의 글

본 연구는 과학기술처의 특정연구개발사업으로 수행된 연구결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Berger, J. L., B. H. Lee, and C. Lacroix. 1995. Oligosaccharides synthesis by free and immobilized β-galactosidase from *Thermus aquaticus* YT-1. *Biotechnol. Lett.* **17**: 1077−1080.
2. 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.
3. Burvall, A., N. G. Asp, and A. Dahlqvist. 1979. Oligosaccharide formation during hydrolysis of lactose with *Saccharomyces lactis* lactase(Maxilact®). *Food Chem.* **4**: 243−250.
4. Gekas, V. and M. Lopez-Leiva. 1985. Hydrolysis of lactose: A literature review. *Process Biochem.* **20**: 2−12.
5. Greenberg, N. A. and R. R. Mahoney. 1983. Formation of oligosaccharides by β-galactosidase from *Streptococcus thermophilus*. *Food Chem.* **10**: 195−204.
6. 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**: 1994−2001.
7. In, M. -J., M. -H. Kim and H. J. Chae. 1997. Two-stage enzymatic conversion of lactose to galactooligo saccharides by two-type β-galactosidases. *Korean. J. Food Sci. Technol.* **29**: 376−378.
8. In. M. -J., M. -H. Kim, and J. Jung. 1995. Isolation of *Bacillus* sp. producing β-galactosidases with high transgalactosylation activity and its culture characteristics regarding enzyme production. *Agric. Chem. Biotechnol.* **38**: 502−506.
9. Kim, C. R., S. R. Lee, and Y. K. Lee. 1990. Formation of galactooligosaccharides by the partially purified β-galactosidase from *Aspergillus niger* CADI. *Korean. J. Anim. Sci.* **32**: 323−333.
10. Miller, J. H. 1972. *Experiments in Molecular Genetics*, pp. 352−355. Cold Spring Habor Laboratories, NY, USA.
11. Mozaffar, Z., K. Nakanishi, R. Matsuno, and T. Kamikubo. 1984. Purification and properties of β-galactosidase from *Bacillus circulans*. *Agric. Biol. Chem.* **48**: 3053−3061.
12. 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 rectivirgular*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**: 657−663.
13. Onish, N. and T. Tanaka. 1996. Purification and properties of a galacto- and gluco-oligosaccharide-producing β-glycosidase from *Rhodotorula minuta* IFO879. *J. Ferment. Bioeng.* **82**: 439−443.
14. Onishi, N. and T. Tanaka. 1995. Purification and properties of novel thermostable galactooligosaccharide-producing β-galactosidase from *Sterigmatomyces elviae* CBS8119. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 4026−4030.
15. Prakash, S., K. Suyama, T. Itoh, and S. Adachi. 1987. Oligosaccharide formation by *Trichoderma harzianum* in lactose containing medium. *Biotechnol. Lett.* **9**: 249−252.
16. 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. *Biotechnol. Bioeng.* **30**: 1026−1031.17. Takenishi, S., Y. Watanabe, T. Miwa, and R. Kobayashi. 1983. Purification and some properties of β-galactosidase from *Penicillium multicolor*. *Agric. Biol. Chem.* **47**: 2533−2540.
18. Toba, T., A. Yokota, and S. Adachi. 1985. Oligosaccharide structure formed during the hydrolysis by *Aspergillus oryzae* β-galactosidase. *Food Chem.* **16**: 147−162.
19. Watanabe, Y., Y. Kibesaki, S. Takenishi, K. Sakai, and Y. Tsujisaka. 1979. Purification and properties of β-galactosidase from *Penicillium citrinum*. *Agric. Biol. Chem.* **43**: 943−950.

(Received July 21, 1997)