

고정화 β -Galactosidase에 의한 갈락토올리고당의 생산

김 창 렬

서강정보대학 식품영양과

Production of Galactooligosaccharides using Immobilized β -Galactosidase

Chang-Ryoul Kim

Dept. of Food Science and Nutrition, Seo Kang College, Kwangju 500-742, Korea

Abstract

Production of galactooligosaccharides by an immobilized β -galactosidase from *Aspergillus niger* CAD 1 in sodium alginate was investigated. The ranges of temperature and pH for the maximum stability of immobilized β -galactosidase were 20~45°C and 4.0~5.5, respectively. The activation energy for the immobilized β -galactosidase was 13,400 cal/mole. At the concentration of the immobilized β -galactosidase 0.12 unit/g in sodium alginate the yield of galactooligosaccharides in cheese whey containing 20% lactose was 18% after incubation for 72 hr at 45°C. The remaining activity for the immobilized β -galactosidase 10 times repeated use 87%.

Key words : galactooligosaccharide, immobilized β -galactosidase, sodium alginate.

서 론

β -Galactosidase는 유당을 가수분해하므로 유당 불내증 (lactose intolerance)을¹⁾억제할 수 있다. 갈락토올리고당은 비피더스균의 증식을 촉진시킨다²⁾. 그러나 수용성 β -galactosidase는 장시간 동안 활성을 유지하기 어렵고, 재사용하거나 연속적인 반응 공정을 수행할 수 없기 때문에 고정화효소에 대한 많은 연구가 되고 있다^{3,4,5)}.

효소의 고정화 방법에는 지지체결합법, 가교화법 및 포괄법 등이 있다. 포괄법은 효소단백질에 대한 변화를 줄이고 다량의 효소를 안정하게 고정화할 수 있어서 널리 이용되고 있다⁶⁾. 포괄법으로 생산된 고정화 β -galactosidase는 의약품 및 발효유 조제 등에 사용되고 있다. 수용성 효소는 장내에 도달 하기 전에 실활하지만, 고정화효소는 실활되지 않아서 경제성이 높다. Olson과 Stanely⁷⁾는 수지와 glutaraldehyde에 *Aspergillus niger*의 β -galactosidase를 고정

화하여 3~4%의 유당 용액에서 4주 동안 반응시킨 결과 70~80%의 올리고당 전환율을 얻었고 초기 효소활성의 20%가 실활되었다고 하였다. Finocchiaro 등⁴⁾은 *Kluyveromyces lactis*의 β -galactosidase를 alumina에 고정화하여 체다치즈 유청의 유당가수분해에 이용한 결과 생물 반응기에서 22시간 반응후 초기활성이 46% 감소되었다고 하였다. Burvall 등³⁾은 *Kluyveromyces lactis*의 β -galactosidase는 20%의 유당 농도에서 올리고당 전환율이 13%를 나타냈다고 하였다. 치즈 제조후 부산물인 유청에는 유당이 70% 이상 들어 있기 때문에 β -galactosidase를 이용하여 올리고당을 생산하면 부산물을 이용할 수 있어서 경제적으로 유효하다.

본 연구는 *Aspergillus niger* CAD 1의 β -galactosidase를 포괄법으로 알긴산 나트륨에 고정화하고, 치즈 유청을 기질 갈락토올리고당을 생산하는 조건을 검토한 결과이다.

Corresponding author : Chang-Ryoul Kim

재료 및 방법

1. 사용균주 및 배지

β -Galactosidase의 생산균주로 *Aspergillus niger* CAD 1⁹⁾을 감자텍스트로스한천 (PDA) 배지에서 4주 간격으로 계대배양하여 4°C에 보관하면서 사용하였다. 효소의 대량생산 배지는 김⁹⁾의 방법에 따라 밀기울 50g과 멸균수 70ml를 혼합하여 15파운드에서 30분간 멸균후 실험에 사용하였다.

2. 유청의 구입

전북 임실치즈 공장의 치즈 제조시 부산물인 유청을 갈락토올리고당의 생산기질로 사용하였다.

3. 배양방법

이 등⁸⁾의 방법을 수정하여 사용하였다. 즉 1ℓ의 삼각플라스크에 든 밀기울 배지상에서 30°C, 3일간 계대배양후 형성된 *A. niger* CAD 1의 포자를 멸균 증류수에 현탁하여 포자수 10⁷ spore/ml로 조성된 균체에 20ml를 접종하였다. 그후 이 등⁸⁾의 방법에 따라 이균주의 효소 생산 최적 배양조건인 30°C에서 72시간 정치배양하였다.

4. 효소의 추출

배양 완료된 배지에 배지 중량 2배의 멸균 증류수를 첨가하여 용해하고 실온에서 2시간 진탕한 다음 여과포로 여과하여 얻은 용액을 원심분리(3,350×g, 4°C/10min)하였다. 원심분리하여 얻은 상등액에 1.5배량의 아세톤(-10°C)을 서서히 첨가하여 교반기로 혼합한 다음에 -10°C의 저온 냉장고에서 1시간 보관하여 침전된 단백질을 다시 원심분리(3,350g, 4°C/10min) 하였다. 침전된 단백질은 0.1M sodium acetate buffer (pH 4.5)에 용해하여 모은 후, 동결건조기 (Edwards, England)로 동결건조하였다. 이 효소는 1.83unit/mg의 비활성을 나타냈다.

5. 효소의 정제

김⁹⁾의 방법에 따라 조효소 2g을 40ml의 0.1M sodium acetate buffer (pH 4.5)에 녹인 다음, DEAE-cellulose 이온교환 크로마토그래피 (Sigma Chemical Co., USA)로 1차 정제하였다. 컬럼사이즈는 2.5×30cm, 완충액은 50mM Tris-malate buffer (pH 7.0) 이었다. 조효소 15ml를 컬럼의 상

부에 흡착시키고 동일한 완충액 500ml와 0.5M NaCl이 함유된 완충액 500ml의 직선기울기도로 1시간당 25ml의 속도로 용출하고 5ml씩 분취하였다. 그후 Sephadex G-100 gel 컬럼 (2.5×80cm, Pharmacia Chemical Co.)에 50mM sodium acetate buffer (pH 4.5)에 가해 1시간 당 15ml의 속도로 5ml씩 분취하였다. 각 분취액의 단백질 농도와 β -galactosidase의 활성을 측정하였다. 효소의 순도는 Laemmli¹⁰⁾의 SDS-polyacrylamide gel 전기영동법으로 분석하였다. 분자량 측정용 표준단백질 (Bio-Rad Chemical Co., USA)은 bovine serum albumin (MW:66,200), phosphorylase b (MW:97,400), *Escherichia coli* β -galactosidase (MW:116,250) 및 myosine (MW:200,000)을 사용하였다.

6. 단백질의 정량

수용성 β -Galactosidase의 단백질 함량은 bovine serum albumin (BSA, Sigma Chemical Co., USA)을 표준단백질로 하여 Lowry 등¹¹⁾의 방법으로, 고정화 효소는 A.O.A.C.법¹²⁾에 의한 Semi-micro Kjeldahl법으로 정량하였다.

7. 고정화 β -galactosidase의 조제

Woodward¹³⁾의 방법을 수정하여 3%의 알긴산 나트륨 (Sigma Chemical Co., USA)가 내포된 50ml의 용액과 15ml (0.8 unit/ml)의 효소액을 실온에서 30분간 균일한 용액이 되도록 혼합하고 3mm의 입자 크기로 조절된 노즐에서 페리스타펄프를 이용하여 알긴산 나트륨과 혼합한 효소액을 유출시키며 200rpm으로 조절된 교반기 위의 500ml의 0.2M CaCl₂ 용액이 내포된 삼각플라스크에서 알긴산 나트륨에 포괄시킨 입자를 생산하였다. 그후 입자의 경화를 위하여 0.2M CaCl₂ 용액에 30분 동안 유지시킨 후 0.1M sodium acetate buffer (pH 4.5)에 넣고 4°C에 보관하면서 사용하였다.

8. β -galactosidase의 활성 측정

수용성 효소의 활성측정¹⁴⁾은 ONPG(o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside)를 기질로 효소액 0.5ml와 1.5ml 4mM ONPG (0.1M sodium acetate buffer, pH 4.5에 용해)를 혼합하여 45°C에서 30분간 반응시킨 후 1M Na₂CO₃를 10% 첨가하여 발색한 다음 생성된 ONP (o-nitrophenol)를 420nm에서 비색 정량하였다.

고정화 효소의 활성측정은 Morisi 등¹⁵⁾의 방법을 수정하여 사용하였다. 고정화 효소 1g과 ONPG 3ml를 혼합하여 45°C에서 30분간 반응시킨 후 반응액 2ml를 취해서 수용성 효소와 같은 방법으로 결정하였다. 효소활성단위는 1분 동안에 1 μ mole의 ONP를 생산하는 효소량을 1unit로 하였다.

9. 갈락토올리고당의 생산 조건

김 등¹⁶⁾의 방법에 따라 *Aspergillus niger* CAD 1의 고정화 β -galactosidase (1.2 unit /g of bead)를 20%의 유당이 함유된 치즈 유청에 넣고, 45°C에서 72시간 배양하였다. Pazur 등¹⁷⁾의 방법에 따라 단당 유당을 제거하였고, Toba와 Adachi¹⁸⁾의 방법에 따라 n-butanol : pyrine : water (6 : 4 : 3)을 전개용매로 하여 같은 완충액으로 5번 전개하여 올리고당을 확인하였다⁹⁾.

결과 및 고찰

고정화 β -galactosidase는 Woodward¹⁹⁾의 방법에 따라 조제하여 3% 알긴산나트륨 용액 50과 15ml (0.8 unit /ml)의 효소액을 혼합하고, 0.5M CaCl₂ 용액이 삼각플라스크에서 직경 2.5mm의 50g 입자를 생산하였다. 효소의 반응속도에 미치는 온도효율을 구하기 위하여 각 온도에서 10분 정지한 다음 효소 1몰이 반응할 때 필요한 최소 에너지인 활성화 에너지를 다음과 같이 Segel²⁰⁾의 Arrhenius 방정식으로부터 구하였다. 수용성 효소와 고정화 효소의 활성화 에너지는 각각 10,700cal /mole과 13,400cal /mole로 나타났다.

효소의 활성화 에너지(Ea)는 일반적으로 5,000 ~15,000cal /mole로서, Dinelli²⁰⁾는 효모의 β -galactosidase를 cellulose triacetate에 고정화한 경우는 8,700cal /mole, 수용성 효소는 13,500cal /mole이었다. Delcleire 등²¹⁾은 *Lactobacillus bulgaricus*의 β -galactosidase의 활성화 에너지는 10,320cal /mole로 보고하였다. 본 결과는 Decleire 등²¹⁾의 보고와 유사하였다.

고정화 효소는 Dinelli²⁰⁾가 보고한 고정화 효소보다 활성화 에너지가 더 필요하였다.

Fig. 2는 고정화 효소의 열 안정성결과로, 30°C에서 80°C까지 5°C 간격으로 각 온도에서 1시간 방치 또는 후의 잔존 활성이다. 고정화 효소는 50°C에서 수용성 효소보다 열안정성이 7% 높았다. 55°C 이상에서 수용성 효소는 급속히 열 안정성이 저하되었다.

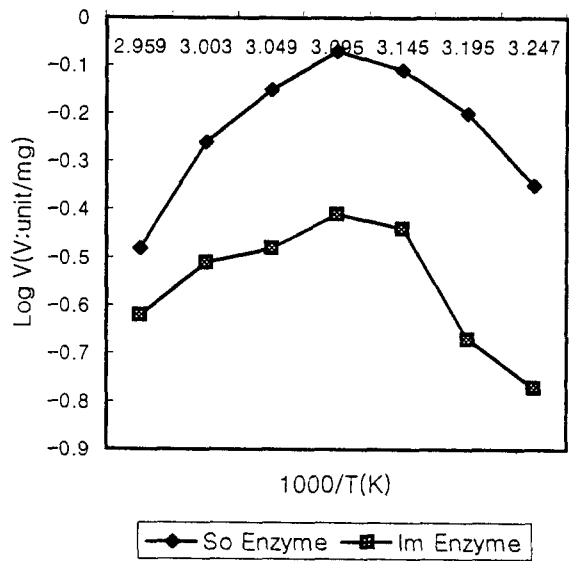


Fig. 1. Arrhenius plot of the β -galactosidase activity from *Aspergillus niger* CAD 1 against temperature. \blacklozenge - \blacklozenge : Soluble β -galactosidase, \blacksquare - \blacksquare : Immobilized β -galactosidase.

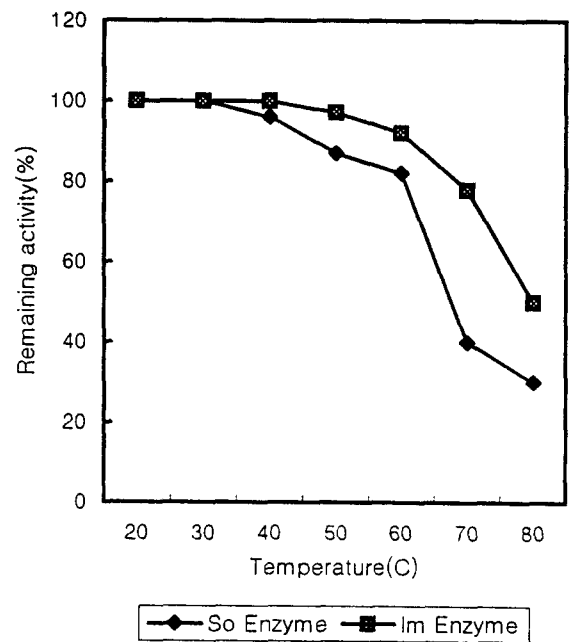


Fig. 2. Thermal stability of the soluble and immobilized β -galactosidase from *Aspergillus niger* CAD 1. \blacklozenge - \blacklozenge : Soluble β -galactosidase, \blacksquare - \blacksquare : Immobilized β -galactosidase.

이와 김⁶⁾은 효소를 고정화하면 수용성 효소보다 열 안정성이 증가한다고 하였다.

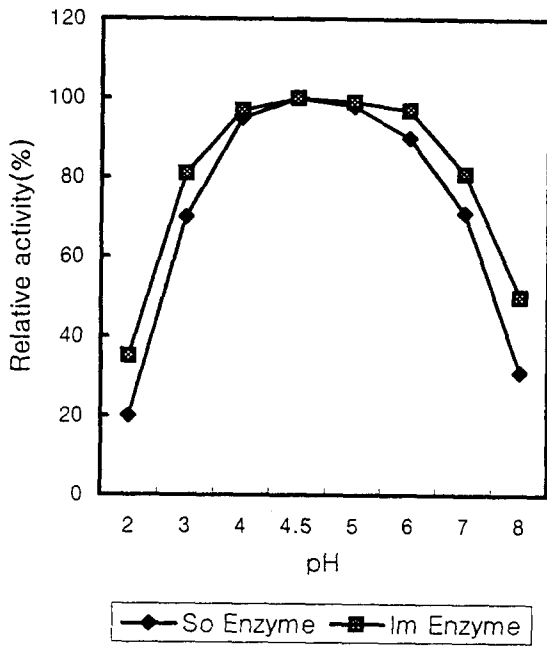


Fig. 3. Stability at various pH values of the soluble and immobilized β -galactosidase from *Aspergillus niger* CAD 1. pH 2.0~3.0, 0.2M Glycine-HCl buffer; pH 3.5~5.5, 0.2M sodium acetate buffer; pH 6.0~7.5, 0.2M imidazole-HCl buffer; pH 8.0~9.0, 0.2M tris-malate buffer. \blacklozenge - \blacklozenge : Soluble β -galactosidase, \blacksquare - \blacksquare : immobilized β -galactosidase.

Fig. 3은 고정화 효소의 pH 안정성 결과로, pH 2에서 pH 8까지의 각 pH에서 1시간 후의 잔존 활성이다. 고정화 효소는 pH 4.0~5.5의 광범위한 pH에서 안정성을 나타낸 반면, 수용성 효소는 pH 5.0 전후로 급격한 활성 저하를 나타내었다.

고정화 β -galactosidase에 의한 갈락토올리고당의 생산은 반비연속식으로 하였다(Fig. 4). 즉 20%의 유당을 함유한 유청 5ml에 고정화 효소를 0.04unit/g에서 0.12unit/g까지 조절하여 72시간 동안 반응시킨 결과는 0.12unit/g의 고정화 효소농도에서 최고 18%의 갈락토올리고당이 생산되었다.

이 공정에 의한 갈락토올리고당의 장기간 생산 안정성을 분석하였다 (Fig. 5). 50ml의 치즈 유청 (20% 유당 함유)에 1.2unit/g의 고정화 효소를 첨가하여 45°C, 72시간 반응한 다음 반응액을 제거하고 다시 기질을 반응기에 넣은 후 같은 조건에서 고정화 효소를 반복 사용하였다. 10회 사용한 후에도 87%의 효소 활성을 유지하였다. Finocchiaro 등⁴⁾은 *K. lactis*의 β -galactosidase를 알루미늄에 고정화하여

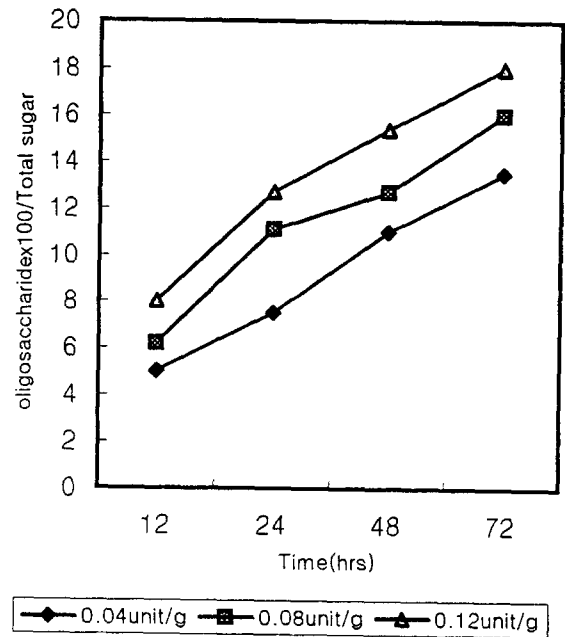


Fig. 4. Semibatch production of galactooligosaccharides using the immobilized β -galactosidase from *Aspergillus niger* CAD 1 in cheese whey containing 20% lactose at 45°C. \blacklozenge - \blacklozenge : 0.04 unit/g of bead, \blacksquare - \blacksquare : 0.08 unit/g of bead, \triangle - \triangle : 0.12 unit/g of bead.

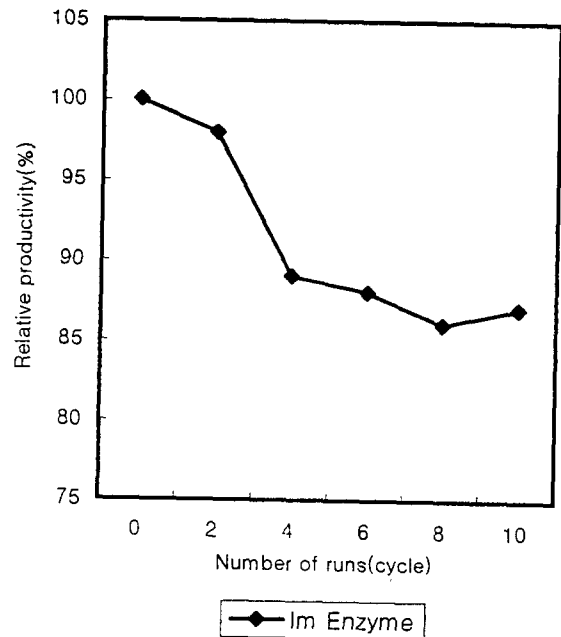


Fig. 5. Operational stability of the immobilized β -galactosidase from *Aspergillus niger* CAD 1 in cheese whey containing 20% lactose during semibatch production of galactooligosaccharides. \blacklozenge - \blacklozenge : Immobilized β -galactosidase.

체다치즈 유청을 유당가수분해하는 생물반응기에서 22시간 반응후 효소 활성의 46%가 감소하였다고 한다. 이와 유⁵⁾는 알긴산에 고정화한 *Aspergillus pullulans*의 효소를 이용한 반비연속식 공정에서 2개월 동안 활성을 조금도 잃지 않았고, 프룩토올리고당의 생산에 효과적이었다고 하였다.

이상의 결과로 부터 알긴산나트륨을 이용한 *A. niger*의 고정화 β -galactosidase는 수용성 효소보다 열 안정성 및 pH 안정성이 높고, 가격이 저렴하기 때문에 갈락토올리고당의 생산에 경제적으로 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

Aspergillus niger CAD 1의 β -galactosidase를 알긴산나트륨에 고정화하여 갈락토올리고당을 생산하였다.

고정화 β -galactosidase의 열 안정성은 20~45℃ 및 pH 안정성은 4.0~5.5를 나타내었다. 고정화 효소의 활성화 에너지는 13,400cal/mole이었다. 알긴산나트륨에 0.12unit/g의 β -galactosidase가 고정화 되었을 때 20%의 유당을 함유한 치즈 유청에 대한 갈락토올리고당의 수율은 45℃에서 반응 72시간 후 18%를 나타내었다. 10회 재사용하여도 고정화 β -galactosidase는 87%의 활성을 유지하였다.

감사의 말

본 연구를 위하여 지도해준 고 이용규 박사의 은혜에 감사드립니다.

참고문헌

- 김창렬, 이석래, 이용규: *Candida kefir* β -galactosidase의 고정화에 관한 연구. *한국유가공연구회지*. 11, 165~172 (1989).
- 박신인, 이호근, 강국희: 올리고당의 장내 세균증식에 미치는 영향에 관한 연구. *한국유가공연구회지*. 10, 159~169 (1988).
- Burvall, A., Asp, N. G. and Dahlqvist, A.: Oligosaccharide formation during hydrolysis of lactose with *Saccharomyces lactis* (Maxilact) : Part I-Quantitative aspects. *Food Chem.* 4, 243~247 (1979).
- Finocchiaro, T., Richardson, T. and Olson, N. F.: Lactase immobilized on alumina. *J. Dairy Sci.* 63, 215~222 (1980).
- 이재홍, 유무영: 오리오바시디움 플루란스에 의한 프룩토올리고당의 생산. 창립 20주년 심포지움. 식품생물공학의 현황과 전망, *한국식품과학회*. p. 184~207 (1988).
- 이규현, 김계용: 고정화 효소와 그 이용. *폴리머*. 8, 159~175 (1984).
- Olson, A. C. and Stanely, W. L.: Lactose and other enzymes bound to a phenolformaldehyde resin with glutaraldehyde. *J. Agri. Food Chem.* 21, 448~453 (1973).
- 이용규, 전순배, 최원기, 정기철, 배석, 김관천 : β -Galactosidase 의 고정화 및 응용에 관한 연구. *Aspergillus niger* CAD 1의 효소 생산 조건 및 효소학적 성질. *한국영양식품학회지*. 24, 326~331 (1985).
- 김창렬: 고정화 β -galactosidase 에 의한 갈락토올리고당의 생산 및 특성. 전남대학교 박사학위 논문. p. 70~71 (1990).
- Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature*, 277, 680~685 (1970).
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Fandall, F. J. : Protein measurement with the Folin-phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193, 265~275 (1951).
- A.O.A.C.: Official Method of Analysis, 13th ed., Assoc. Offic. Anal. Chem., Washington D. C., USA (1984).
- Woodward, J.: Immobilized Cells and Enzymes. IRL Press. Oxford, Washington D.C., USA. P. 39~48 (1985).
- Dickson, R. C., Dickson, L. R. and Markin, J. S. : Purification and properties of inducible β -galactosidase isolated from the yeast *Kluveromyces lactis*. *J. Bacteriol.*, 137, 51~61 (1979).
- Morisi, F., Pastore, M. and Vigila, A.: Reduction of lactose content of milk by entrapped β -galactosidase. 1. Characteristics of β -galactosidase from yeast and *Escherichia coli*. *J. Dairy Sci.* 56, 1123~1127 (1972).
- 김창렬, 이석래, 이용규: *Aspergillus niger* CAD 1의 부분정제된 β -galactosidase에 의한 갈락토올리고당의 생성. *한국축산학회지*. 32, 323-333 (1990).
- Pazur, J. H., Tipton, C. L., Budovich, T., and Marssh, J. M. : Structural characterization of products of enzymatic disproportionation of lactose. *J. Am. Chem. Soc.* 80, 119~127 (1958).
- Toba, T. and Adachi, S.: Hydrolysis of lactose by microbial β -galactosidase. Formation of oligosaccharides with special references to 2-O- β -galactopyranosyl-D-glucose. *J. Dairy Sci.* 11, 33~38 (1978).
- Segel, I. H. : The Arrhenius Equation-Energy of Activation. *Biochemical Calculations*, 2nd Ed. Wiley. p. 278~281 (1975).
- Dinelli, D.: Fibre-entrapped enzymes. *Biochemistry*.

- 7, 9~12 (1972).
21. Declaire, M., Huyhn, N. Van. and Motte, J. C.:
Hydrolysis of lactose solutions and wheys by whole
cells of *Kluyvermyces bulgaricus*. *Appl. Microbiol.*

Biotechnol. 21, 103~107 (1985).

(1999년 1월 23일 접수)