

## beta-Galactosidase의 고정화 및 응용에 관한 연구

### 제1보: *Aspergillus niger* CAD 1의 효소생산 조건 및 효소학적 성질

이용규 · 전순배\* · 최원기\*\* · 정기철 · 배석\* · 김관천\*

전남대학교 농과대학 낙농학과  
\*전남대학교 자연과학대학 생물학과  
\*\*전남대학교 자연과학대학 화학과  
(1986년 12월 10일 접수)

## Studies on immobilization and application of beta-galactosidase

### I. Conditions for production and properties of the enzyme from *Aspergillus niger* CAD 1

Yong-Kyu Lee, Soon-Bae Chun\*, Won-Ki Choi\*\*,  
Ki-Chul Chung, Suk Bae\* and Kwan-Chun Kim\*

*Department of Dairy Science, College of Agriculture, Chonnam National university*  
*\*Department of Biology, College of Natural Sciences, Chonnam National University*  
*\*\*Department of Chemistry, College of Natural Sciences, Chonnam National University*  
(Received December 10, 1986)

#### Abstract

A strain of *Aspergillus niger* CAD 1 which produces considerable amount of beta-galactosidase was selected from extracellular beta-galactosidase producing fungi isolated from soil. Optimal conditions for the enzyme from *Aspergillus niger* CAD 1 were the growth in wheat bran supplemented with 0.5% skim milk powder at 30°C for 72 hrs. The crude enzyme was purified 1,387 fold through DEAE-cellulose and Sephadex G-100 chromatography and its recovery was 6.2%. The optimal pH and temperature for the purified enzyme were pH 4.5 and 45°C, respectively. The  $K_m$  and  $V_{max}$  on ONPG were  $3.57 \times 10^{-3} M$  and 33.0 unit/mg protein, whereas those on lactose were  $83.3 \times 10^{-3} M$  and 15.33 unit/mg protein, respectively. The activation energy for the enzyme was 9,900 cal/mol and the enzyme had no metal ion requirement for its activity and stability. The hydrolysis of lactose in skim milk, 4.8% lactose solution and acidic whey were 65%, 70% and 78% after 10 hrs incubation at 45°C, when 182 units of the enzyme were used 50ml of the substrate solutions.

#### 서 론

beta-Galactosidase(beta-D-galactoside galactohydrolase, EC. 3.2.1.23)는 우유의 주요한 탄

수화물인 유당을 분해하여 단당류인 glucose와 galactose를 생산하는 효소로서, 소장내에 이 효소가 부족시에는 우유를 마신후 유당을 분해시키지 못함으로서 설사, 복통 등의 유당소화장애증

을 유발하게 된다.<sup>1,2)</sup> 또한 유당은 아이스크림 등 냉동유제품과 연유 등 농축유제품 제조시에 유당이 결정화하여 제품의 조직상 결함을 초래하기 때문에 우유의 소비촉진과 유제품 제조에 문제를 야기시킨다.<sup>3)</sup> 이와같은 문제점을 해결하는 방법으로서 유당을 *beta-galactosidase*를 이용하여 가수분해 하는것이 가장 많이 사용하는 방법이다.<sup>4)</sup> *beta-galactosidase*는 자연계에 널리 존재하며 이들을 생성하는 미생물로서는 세균, 곰팡이, 효모 등이 있으며, 일반적으로 세균이나 효모는 균체내 효소를 유도적으로, 곰팡이는 효소를 구성적으로 생산하는 것으로 알려져 있다.<sup>5)</sup>

본 연구는 *beta-galactosidase*를 산업적으로 이용하기 위한 고정화 연구의 일환으로 토양으로부터 분리한 여러가지 곰팡이류 가운데 효소활성이 가장 높은 *Aspergillus niger* CAD 1을 효소생산 균주로 선정하여 효소생산조건, 정제, 효소학적 성질 등을 검토 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. *beta-Galactosidase* 생산균주의 선별 및 동정

120개의 각종 토양시료에서 *beta-galactosidase* 활성이 있는 52균주의 곰팡이를 Chung 등<sup>6)</sup>의 방법에 따라 분리 하였으며, 그 중에서 효소활성이 400unit/ml 이상인 8균주를 Joseph<sup>7)</sup>와 Raper<sup>8)</sup> 등의 방법으로 동정 하였다.

### 2. 배양방법

500ml 삼각 flask에 밀기울 20g와 물 20ml를 혼합하여 15lb에서 30분간 멸균시킨 배지에 Sabouraud dextrose(Difco, Co. U.S.A.) 한천배지에서 30℃, 3일간 사면배양한 후 형성된 포자를 증류수에 현탁하여 포자수가 약  $10^7$  spore/ml되게 조정된 용액 5ml를 접종 하였다. 배양온도는 25℃에서 45℃까지 5℃ 간격으로 배양시간은 1일에서 5일까지 1일간격으로 정지배양 하면서 검토 하였다.

### 3. 효소의 추출

배지 중량의 3배 가량의 증류수를 배양 완료된 배지에 첨가한 후 실온에서 2시간 진탕한 다음 3000×g에서 10분간 원심분리하여 얻은 상등액에

동량의 4℃ acetone을 가하여 단백질을 침전 시켰다. 침전된 단백질을 0.1M acetate buffer(pH 5.0)에 녹인후 동일한 총용액으로 4℃에서 12시간 투석하여 이를 조효소(crude enzyme)으로 사용 하였다.

### 4. 효소의 정제

DEAE-cellulose ion exchange chromatography는 DEAE-cellulose를 0.5N HCl과 0.5N NaOH로 활성화 시킨다음 2.5×50cm column에 충전시켜 0.1M acetate buffer(pH 5.0)로 평형화 시켰다. 여기에 조효소 20ml를 흡착시킨 다음에 동일한 완충액을 통과시킨후, 세척한 흡착효소를 0에서 0.6M까지 NaCl linear gradient로 30ml/hr 유속으로 용출하고 5ml씩 분획 하였다. 한편 Sephadex G-100 gel filtration chromatography는 Sephadex G-100을 증류수에 녹여 100℃의 항온조에서 5시간동안 팽윤시킨후 정지 냉각하여 미세한 분말을 제거한 후에 2.5×50cm column에 충전하고 0.1M acetate buffer(pH 5.0)로 평형화 시켰다. 여기에 DEAE-cellulose chromatography 과정에서 얻은 효소활성이 높은 분획들을 동결건조한 시료를 column상부에 주입한 후에 동일한 완충액으로 15ml/hr 유속으로 용출하고 2.5ml씩 분획 하였다.

### 5. 효소활성의 측정

기질이 ONPG(o-nitrophenyl-beta-D-galactopyranoside)인 경우의 활성 측정은 Park 등<sup>9)</sup>의 방법을 약간 변경하여 다음과 같이 실시하였다. 즉 효소액 1ml와 4mM ONPG 1ml를 혼합하여 45℃에서 30분간 반응 시킨후에 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.2ml를 가하여 반응을 정지 시키고 반응에 의해 생성된 ONP(o-nitrophenol)을 420nm에서 비색정량 하였으며, 이 반응조건에서 1분 동안에 1 micromole의 ONP를 생성하는 효소량을 1단위로 하였다. 또한 유당을 기질로 사용한 효소 활성은 Raabo와 Terkildsen<sup>10)</sup>법에 따라서 유당의 분해산물인 glucose를 발색시켜 450nm에서 비색정량 하였으며 이때의 효소활성단위는 매분당 1 micromole의 glucose를 생성하는 효소량을 1단위로 하였다.

### 6. 단백질의 정량

Lowry등<sup>11)</sup>의 방법에 따라 bovine serum albumin

을 표준 단백질로 하여 정량하였다.

7. 유당 분해율의 측정

유당으로 부터 beta-galactosidase에 의해 분해되어 생성된 glucose를 Raabo와 Terkildsen<sup>10)</sup>법에 따라 측정 하였다.

결과 및 고찰

1. 균주의 선정

beta-galactosidase 생성능이 있는 곰팡이 52균주중에서 ONPG를 기질로 하여 효소 활성을 조사하여 400 unit/ml이상인 8균주를 선별하여 동정한 결과는 Table 1과 같이 *Aspergillus*(CAD 1, 2, 3) 3균주, *Aspergillus oryzae*(CAD 8, 45) 2균주, *Aspergillus sp.*, *Mucor sp.*, *Penicillium sp.* 등 이었으며, 이 중에서 *Aspergillus niger* CAD 1이 유당 분해 효소 활성이 가장 우수하여 본 실험의 효소생산 균주로 선정하였다.

Table 1. Extracellular beta-galactosidase activity of screened fungi.

Fungi	Enzyme activity(u/ml)	
	ONPG	lactose
<i>Aspergillus niger</i> CAD 1	450	182
<i>Aspergillus niger</i> CAD 2	457	164
<i>Aspergillus niger</i> CAD 3	413	178
<i>Aspergillus oryzae</i> CAD 8	407	130
<i>Aspergillus oryzae</i> CAD 45	425	70
<i>Aspergillus sp.</i>	420	105
<i>Mucor sp.</i>	400	80
<i>Penicillium sp.</i>	410	54

The culture conditions and enzyme assays are prescribed in methods

2. 효소생산 조건

효소 생산에 미치는 배양 온도, 배양시간 등을 조사한 결과는 Fig. 1, 2와 같으며, 밀기울 기본배지에서 30℃, 72시간 배양하였을때 효소생성이 제일 높았다. 또한 밀기울 기본배지에 여러가지 탄소원 및 질소원을 첨가하여 효소 생산에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 2, 3과 같다. 첨가한

탄소원중 glucose와 starch는 대주에 비하여 효소활성이 약 7% 감소 되었는데 이것은 glucose와 starch에 의한 이화성물질 억제(catabolite repression)현상에 기인한 것으로 생각되며 그 외의 탄소원은 큰 영향을 미치지 않았다. 또한 첨가한 질소원중 0.5% 탈지분유 첨가구만이 12% 효소생산 증가가 있었을 뿐이고 기타 유기 및 무기 질소원들은 큰 영향을 주지 못했다. 이상의 결과 효

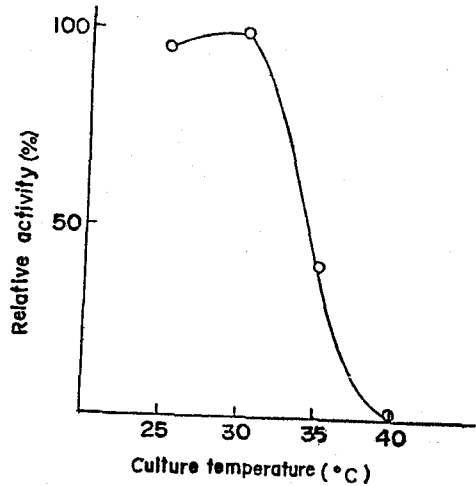


Fig. 1. Effect of culture temperature on beta-galactosidase production of *Aspergillus niger* CAD 1 in wheat bran supplemented with 0.5% skim milk powder.

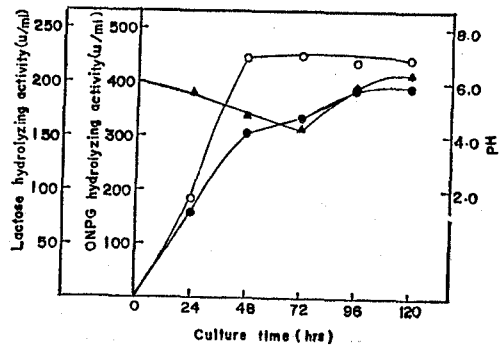


Fig. 2. Effect of culture time on beta-galactosidase production of *Aspergillus niger* CAD 1 in wheat bran supplemented with 0.5% skim milk powder.

○—○: ONPG hydrolyzing activity  
●—●: lactose hydrolyzing activity  
▲—▲: pH

**Table 2. Effect of various carbon sources on beta-galactosidase.**

Carbon source	Enzyme activity (U/ml)	Relative activity (%)
Control	453	100
Lactose	470	103
Sucrose	471	103
Maltose	450	99
Starch	420	93
Glucose	421	93
Galactose	471	103

*Aspergillus niger* CAD 1 was grown in wheat bran supplemented with 1% of each carbon source for 72 h at 30°C. Control was only wheat bran medium without supplements.

소 생산의 최적 배양조건은 밀기울 기본배지에 0.5% 탈지 분유를 첨가하여 30°C에서 3일간 정지배양한 것이었다.

**3. 효소의 정제**

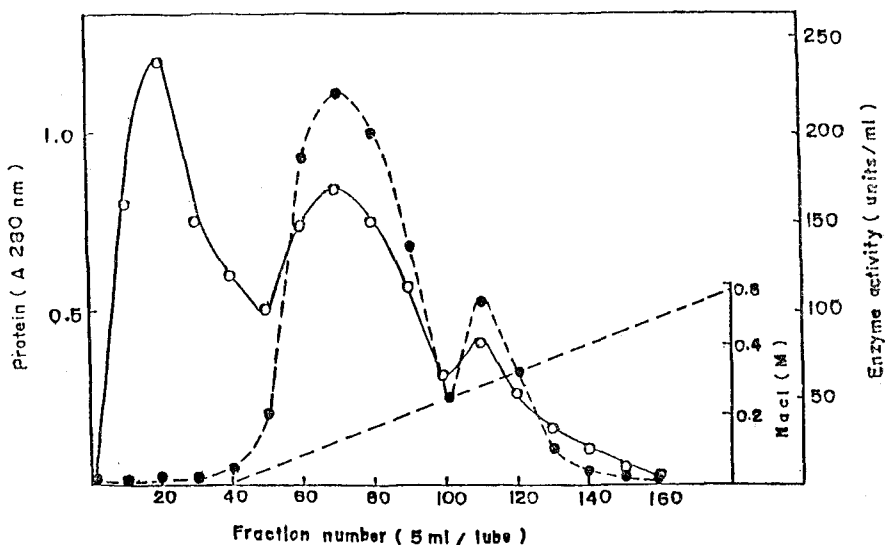
효소 정제의 첫단계로 DEAE-cellulose chromatography를 실시한 결과는 Fig. 3에 나타낸 바와

**Table 3. Effect of various nitrogen sources on beta-galactosidase.**

Nitrogen source	Enzyme activity (U/ml)	Relative activity (%)
Control	453	100
Urea	417	92
Skim milk powder	507	112
Yeast extract	450	99
Glutamate	442	97
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	457	101
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	455	101
NH <sub>4</sub> Cl	418	92
NaNO <sub>3</sub>	417	92
KNO <sub>3</sub>	439	96

*Aspergillus niger* CAD 1 was grown in wheat bran supplemented with 0.5% of each nitrogen source for 72 h at 30 C. Control was only wheat bran medium without supplements.

같이 3개의 단백질 peak와 2개의 효소 peak를 보여 주었다. 효소활성이 좋은 분획들만을 모아서 동결건조 하여 두번째 정제과정인 Sephadex G-100 gel filtration을 행하였던바 Fig. 4와 같이 효소활성은 한 peak에서만 보여 주었다. 이상의 두 정제과정을 요약하면 Table 4와 같이 DEAE-cellulose의 경우는 약 808배의 정제, 수율 8.5% 이었



**Fig. 3. DEAE-cellulose column chromatogram of the beta-galactosidase.**  
 ○—○: Protein ●—●: beta-galactosidase .....: NaCl gradient

**Table 4. Major purification steps of beta-galactosidase from *Aspergillus niger* CAD 1.**

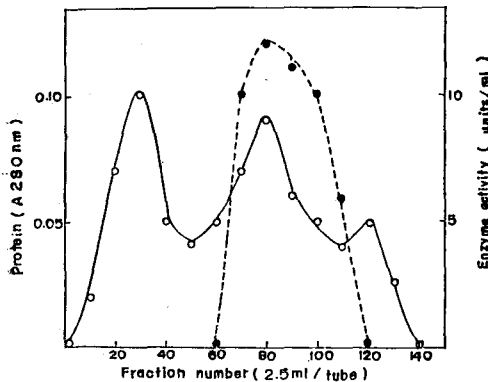
Step	Volume (ml)	Protein content (mg)	Activity (U/ml)	Specific activity (U/mg)	Purification fold	Yield (%)
Acetone fractionation	2,000	123.5	346.5	2.8	1	100
Ion exchange on DEAE-cellulose	260	0.1	226.3	2263.0	808.2	8.5
Gel filtration on Sephadex G-100	124	0.09	349.4	3382.2	1386.5	6.2

고 Sephadex G-100 과정에서는 약 1,387배의 정제, 수율은 6.2% 이었다.

**4. 효소의 특성**

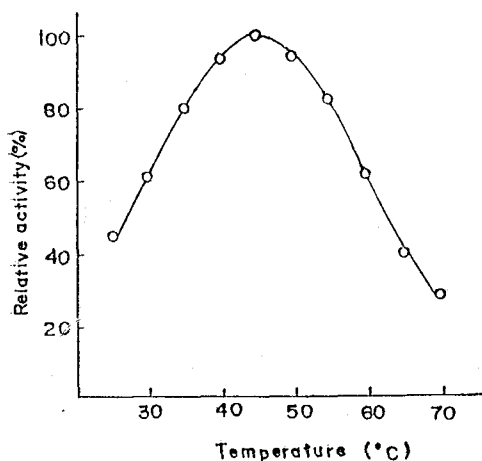
**1) 온도의 영향**

효소활성에 미치는 온도의 영향을 검토하기 위



**Fig. 4. Sephadex G-100 column chromatogram of the beta-galactosidase.**

○—○: protein ●—●: beta-galactosidase



**Fig. 5. Effect of temperature on the activity of enzyme.**

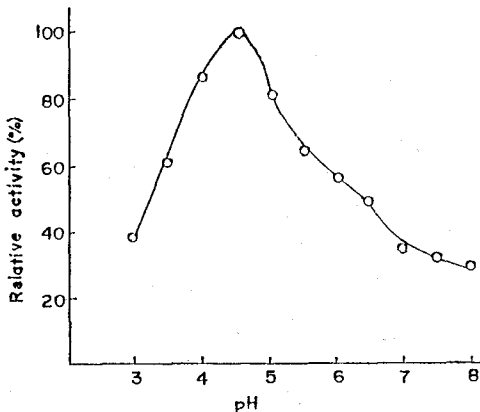
하여 25℃에서 70℃까지 5℃간격으로 검토한 결과는 Fig.5와 같았다. 최적온도는 45℃로써 *K. fragilis*<sup>12)</sup>, *K. lactis*<sup>13)</sup> 등 효모보다도 높으며 *L. bulgaricus*<sup>14)</sup>, *L. helveticus*<sup>13)</sup> 등 세균과 *A. niger*<sup>15)</sup>, *A. oryzae*<sup>15)</sup> 등 곰팡이의 beta-galactosidase와는 비슷 하였다.

**2) pH의 영향**

효소활성에 미치는 pH의 영향을 검토하기 위하여 pH 3.0에서 8.0까지 조사한 결과는 Fig.6과 같았다. 최적 pH는 4.5로서 *E. coli* K-12<sup>16)</sup>, *Str. thermophilus*<sup>17)</sup>, *L. bulgaricus*<sup>17)</sup> 등 세균과 *K. lactis*<sup>18)</sup>, *K. fragilis*<sup>19)</sup> 등 효모보다는 낮은 pH를 보여 주었고, *Mucor pusillus*<sup>14)</sup>, *A. oryzae*<sup>20)</sup> 등 곰팡이의 beta-galactosidase와는 유사한 최적 pH를 보여 주었다.

**3) 열 효율**

온도가 효소 반응속도에 미치는 온도 효율을 조사하기 위하여 Arrhenius 방정식<sup>21)</sup>에 의하여 효소 1 mole이 반응하는데 필요한 최소 에너지인 활성화 에너지(Ea)를 Fig.7을 이용하여 구하였던



**Fig. 6. Effect of pH on the activity of enzyme.**

pH 3.0~6.5: 0.1M McIlvaine buffer  
pH 7.0~8.0: 0.1M sodium phosphate buffer

파 9,900 cal/mole이었다. 일반적으로 효소 활성화 에너지는 5,000~15,000 cal/mol<sup>21)</sup>인데 본 효소는 세균인 *E. coli* K-12<sup>16)</sup>보다는 낮았고 효모인 *Candida kefir* CBS 834<sup>22)</sup>보다는 높았으며 곰팡이류인 *A. oryzae*<sup>23)</sup>와는 비슷한 활성화 에너지가 필요한 것으로 나타났다.

4) 효소의 반응속도

기질농도에 따른 반응속도를 Linweaver-Burk plots<sup>24)</sup>에 의해 ONPG에 대해서는 Fig. 8 유당에 대해서는 Fig. 9에서 Michaelis constant(Km)와 최대 반응속도(Vmax.)를 구하였다. ONPG와 유당에 대한 Km은 각각 3.57mM과 83.3mM 이었고,

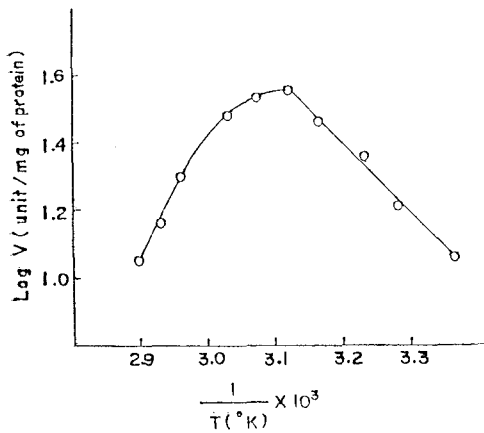


Fig. 7. Arrhenius plot of the enzyme.

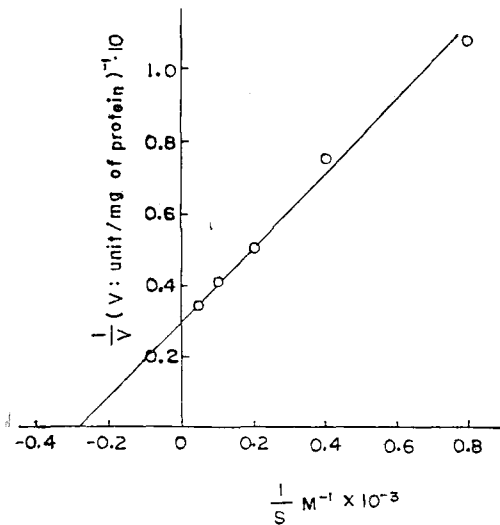


Fig. 8. Lineweaver-Burk plot of the enzyme for ONPG as substrate.

Vmax는 각각 33.0 unit/mg protein과 15.38 unit/mg protein 이었다.

5) 금속이온 및 당류의 영향

여러 금속 이온 및 당류들이 효소활성에 미치는 영향을 Table 5와 같이 조사 하였다. Hg<sup>2+</sup>를 제외한 기타 금속 이온은 본 효소의 activator나 inhibitor로 작용하지 않았다. 따라서 이 효소는

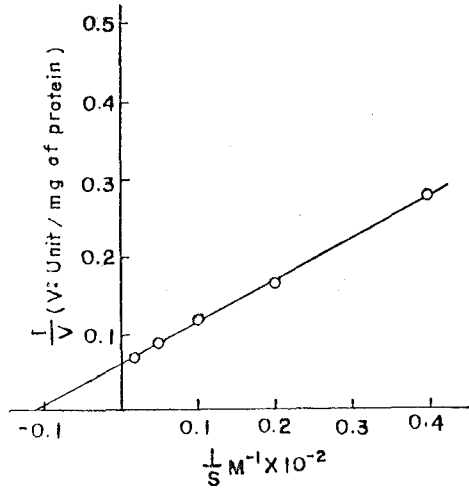


Fig. 9. Lineweaver-Burk plot of the enzyme for lactose as substrate.

Table 5. Effect of inorganic ions and sugars on beta-galactosidase activity.

Material	Concentration (mM)	Relative activity (%)
Control	No addition	100
NaCl	1.0	92
KCl	1.0	102
MnCl <sub>2</sub>	1.0	98
MgCl <sub>2</sub>	1.0	98
CaCl <sub>2</sub>	1.0	98
CoCl <sub>2</sub>	1.0	102
CuSO <sub>4</sub>	1.0	96
ZnSO <sub>4</sub>	1.0	100
HgCl <sub>2</sub>	1.0	3
Galactose	100	54
Glucose	100	92
Lactose	100	92

*A. foetidus*<sup>25)</sup>, *A. oryzae*<sup>20)</sup>에서와 같이 효소 활성 및 안정제로 이들 금속 이온을 필요로 하지 않았다. 그러나 당류중에서 galactose(100mM)는 *A. oryzae*<sup>20)</sup>와 같이 저해작용을 나타내었다.

6) 유당 분해율

beta-galactosidase를 유제품에 이용하기 위한 유당 분해능을 검토하기 위하여 탈지유(유당 4.8%, pH 4.8), 유당용액(유당 4.8%, pH 6.8), 유청(유당 4.0%, pH 4.6) 50ml에 효소 50ml(182 unit/ml)를 각각 가한후 45℃에서 10시간동안 2시간 간격으로 유당분해율을 조사한 결과는 Fig. 10에 나타낸 바와 같다.

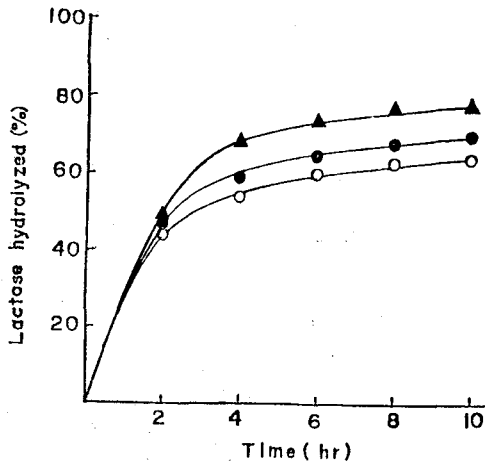


Fig. 10. Hydrolysis of lactose by the enzyme(182 unit/ml) at 45° C.  
 ○—○: skim milk(4.8% lactose, pH 6.8)  
 ●—●: 4.8% lactose solution(pH 6.8)  
 ▲—▲: acid whey(4% lactose, pH 4.6)

Fig. 10에서 보여준 바와 같이 10시간후 탈지유 65%, 유당용액 70%, 유청 78%의 유당 분해율을 나타내었다. 이상의 결과를 보면 탈지유에서 가장 낮은 유당 분해율을 나타낸것은 Ohmiya등<sup>28)</sup>이 지적한 바와 같이 탈지유내의 유단백질과 pH에 기인된 것으로 보이며 유청의 유당 분해율이 가장 높은 것은 유청의 pH가 본 효소의 최적 pH와 유사하기 때문인 것 같다.

요 약

토양에서 분리한 여러가지 곰팡이류 가운데 beta-galactosidase 생성력이 가장 좋은 Asper-

*gillus niger* CAD 1을 효소 생산 균주로 선정하였다. 이 균주의 효소 생산 최적 배양조건은 밀기울에 0.5% 탈지 분유를 첨가한 배지를 30℃에서 72시간 정치배양하는 것이었다. 아세톤으로 침전시킨 조효소(crude enzyme)는 일차로 DEAE-cellulose, 2차로 Sephadex G-100 gel filtration에 의하여 1,387배로 정제되었고 이때의 수율은 6.2%이었다. 정제된 효소의 최적 온도는 45℃, 최적 pH는 4.5이었으며, 기질로서 ONPG와 유당에 대한 Km값은 각각  $3.57 \times 10^{-3}M$ 과  $83.3 \times 10^{-3}M$ , Vmax값은 각각 33.0 unit/mg protein과 15.38 unit/mg protein이었다. 활성화 에너지는 9,900 cal/mol이었으며 효소활성 및 안정제로 금속 이온을 필요로 하지 않았다. 50ml의 탈지유, 4.8% 유당 용액, 유청용액에 효소 5ml(182 unit/ml)를 첨가하여 45℃에서 10시간 반응시켰을 때의 유당 분해율은 각각 65%, 70%, 78%를 나타내었다.

사 사

본 연구는 1985년도 문교부 지원의 유전공학 연구를 위한 학술연구 조성비에 의하여 수행되었으며 관계하신 여러분께 감사함을 드립니다.

참 고 문 헌

- Rosensweig, N.S.: *J. Dairy Sci.*, **52**, 585 (1969).
- McCracken, R.D.: *Curr. Anthropol.*, **12**, 479 (1971).
- Holsinger, V.H.: *Food Technol.*, **32**, 35 (1978).
- Mahoney, R.R. and J.K. Whitaker: *J. Food Sci.*, **43**, 584 (1978).
- Sorensen, S.G. and E.V. Crisan: *J. Food Sci.*, **38**, 1184 (1974).
- Chung, K.C., E.M. Lim and Y.K. Lee: *Kor. J. Dairy Sci.*, **7** (4), 208 (1985).
- Joseph C.G.: The Iowa State Univ. Press, pp.213~230 (1957).
- Raper, Kenneth B., and D. Fennel: Robert E. Klieger publishing Co., pp.293~344 (1973).
- Park, Y.K., M.S. De Santi and G.M. Pastore: *J. Food Sci.*, **44**(1), 100 (1979).

10. Raabo E. and Terkildsen: *Sa. J. Clin. Lab. Invest.*, **12**, 402 (1960).
11. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 205 (1951).
12. Kilikova, A.K., A.S. Tikhomirova and R.V. Feniksova: *Biokhimiya*, **37**(2), 405 (1972).
13. Kosikowski, F.V., and L.E. Wierzbicki: *J. Dairy Sci.*, **56**(1), 146 (1973).
14. Wierzbicki, L.E. and F.V. Kosikowski: *J. Dairy Sci.*, **56**(1), 26 (1973).
15. Wierzbicki, L.E. and F.V. Kowski: *J. Dairy Sci.*, **56**(1), 26 (1973).
16. Hustad, G.O., T. Richardson and N.F. Olson: *J. Dairy Sci.*, **56**(9), 1118 (1973).
17. Premi, L., W.E. Sandina, and P.R. Elliker: *Applie Microbiol.*, **24**(1), 5(1972).
18. Bouvy, F.A.M.: *Food Product Dev.*, **9**(2), 10 (1975).
19. Wendorff, W.L., and C.H. Amundson: *J. Milk and Food Technol.*, **34**(6), 300 (1971).
20. Tanaka, Y., A. Kagamishi, A. Kiuchi, and T. Horiuchi: *J. Biochem.*, **77**, 241 (1975).
21. Segel, I.H.: John Wiley and Sons, Inc., pp.278~281 (1976).
22. Kim. C.Y.: Thesis of M.S. Degree, Chonnam National Univ. (1986).
23. Chun, S.B., Y.K. Lee, W.K. Choi and D.Y. Jhon: *J. Basic Sci., Chonnam National Univ.*, **14**(1), 15 (1983).
24. Segel, I.H.: John Wiley and Sons, Inc., pp.234~260 (1976).
25. Borglum, G.B. and M.Z. Sternberg: *J. Food Sci.*, **37**, 619 (1972).
26. Ohmiya, K.C., C. Tearo, S. Shimizu, and T. Kobayashi: *Agr. Biol. Chem.*, **39**(2), 491 (1975).