

호알카리성 *Bacillus* sp.로부터 β -Galactosidase의 생산(II)

유주현* · 윤성식¹

연세대학교 공과대학 식품공학과

Production of β -Galactosidase from Alkalophilic *Bacillus* sp. (II)

Yu, Ju-Hyun* and Sung-Sik Yoon¹

Department of Food Engineering, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

A β -galactosidase producing strain, alkalophilic *Bacillus* sp, YS-309, has been isolated from soil sample. The strain was capable of producing large amount of intracellular β -galactosidase in the alkaline media rather than in the neutral media. The preferable medium composition has been determined to be as follows: 0.5% lactose, 0.5% yeast extract, 0.5% soybean meal, 0.1% KH_2PO_4 , 0.02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.6% Na_2CO_3 (pH 9.9). The enzyme was produced by lactose or IPTG as inducer. But both Enzyme synthesis and cellular growth were decreased when lactose was added at the higher concentrations than 1.5% (v/v).

전보(1)에서 기술한 바와 같이, β -galactosidase [EC 3.2.1.23]는 자연계에 널리 분포하는 효소로서 세균(2-3), 곰팡이(4,5), 효모(6), 식물(7), 동물의 장기(8)에서 그 존재가 보고되었다.

이 효소는 일명 lactase로 불리며 자연계에서는 우유 중에 주로 존재하는 lactose의 β -1,4-galactoside 결합을 가수분해하여 단당류인 glucose와 galactose를 생성한다(9). 특히 이 효소는 lactose를 분해하여 감미향상, 유제품의 lactose crystal 방지 및 요구르트 제조시 산 생성을 촉진시키기 위하여 사용되는 등 유가공 산업에 대단히 중요한 물질이다. 또 아시아나 아프리카인에게 흔한 유당불내증(lactose intolerance)을 치료하는 의약품(10)으로서의 사용이 주목되고 있다. 미생물로부터 생산되는 효소는 고등생물보다 연기가 용이할 뿐만 아니라 대량으로 생산할 수 있는 장점이 있어 많은 연구가 이루어져 왔다. Tanaka 등(11) Bahl과 Agawal(12)은 최적 pH가 각각 4.5, 3.2-4.0인 β -galactosidase에 대해 보고한 바 있으나 대부분 이 효소의 최적 pH는 중성부근으로 알려져 있다.

호알카리성 세균은 1922년 *Nitromonas* 와 *Nitrobacter* 에 관한 보고 이후 현재 활발히 연구가 진행

되고 있는 미생물로서 정상적 환경보다도 높은 알칼리 조건에서 오히려 생육이 활발한 미생물이다(13). 이와 같은 극한 환경에서 자라는 성질을 이용하면 생물화학 공업의 오염을 줄일 수 있거나 공정을 단축할 수 있어 매우 유용한 미생물이다(14).

따라서 본 연구는 호알카리성 *Bacillus* sp.를 토양으로 순수분리하여 이 세균의 생육과 효소 생산조건을 검토한 결과이다.

재료 및 방법

균주의 배양과 생육측정

토양으로부터 분리한 호알카리성 세균 *Bacillus* sp. YS-309의 생육특성과 효소생산을 검토하기 위한 배지의 조성은 다음과 같다. 1.0%, lactose ; 0.5%, polypeptone ; 0.5%, yeast extract ; 0.1%, KH_2PO_4 ; 0.02%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 와 별도로 멸균된 Na_2CO_3 를 농도가 1%되게 첨가하여 최종 pH를 10.2로 조절하였다. 기본배지에서 하룻밤 배양시킨 종배양액을 0.2-0.5%되게 접종한 다음 37°C에서 230 rpm으로 회전 진탕배양하였으며, 균체의 생육은 550 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 균체 양으로 표시하였다. 건조

Key words: Alkalophilic *Bacillus* sp., β -galactosidase, inducer

*Corresponding author

¹현재 부천공업전문대학 식품영양과 재직중

균체량은 상법에 준하여 측정하였다.

조효소액의 조제

배양이 끝난 균체는 100 mM Na-phosphate buffer (pH 7.5)로 2회 세척하였다. 이것을 동일한 완충액에 재현탁시키고 Ice-bath 중에서 Sonicator (Fischer Co.)를 사용하여 10초 간격으로 3-5회 초음파 처리하여 완전히 파쇄됨을 확인한 다음 15,000 rpm으로 1분간 원심분리한 상등액을 취하여 효소활성을 조사하였다.

효소활성 측정방법

효소활성은 Ito 등의 방법 (15)을 변형하여 *p*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (PNPG, Fluka Co.)로부터 유리되는 *p*-nitrophenol의 양을 측정하였다. 효소액 0.1 ml와 100 mM 인산염 완충액 (pH 7.5)을 0.8 ml를 빈 시험관에 넣고 혼합한 다음 0.1% PNPG 용액 0.1 ml를 재빨리 가하여 vortexing을 빈 시험관에 넣고 Waterbath 중에서 반응시켰다. 10분 후 0.4 M Na₂CO₃ 용액 2 ml를 가하여 반응을 중지시킨 다음 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 1 단위는 반응시간 분당 PNPG로부터 생산되는 *p*-nitrophenol의 μ mole 수로 정의하였다.

대조구는 시험구와 동일한 방법으로 실시하되 반응정지 후 동량의 기질액을 나중에 첨가하여 측정하였다. 효소단위는 유리된 *p*-nitrophenol의 양을 미리 작성한 표준곡선으로부터 산출 표시하였다.

Lactose의 정량

배지 중의 잔당량은 Nickerson의 방법 (16)으로 비색정량하였다.

시 약

본 연구에 사용한 시약으로 PNPG (*p*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside)는 Fluka 제품을, IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactoside)는 Sigma 제품을, 그리고 lactose 등의 당류는 Zunsei 제품을 각각 사용하였으며, 기타 시약은 제조회별로 일급 시약을 사용하였다.

결과 및 고찰

균체의 생육 및 효소생산조건

토양으로부터 pH 10.2에 생육하는 호알카리성 세균을 500주 분리하고 분리균주 중 β -galactosidase 생산력이 가장 우수한 *Bacillus* sp. YS-309주를 선발

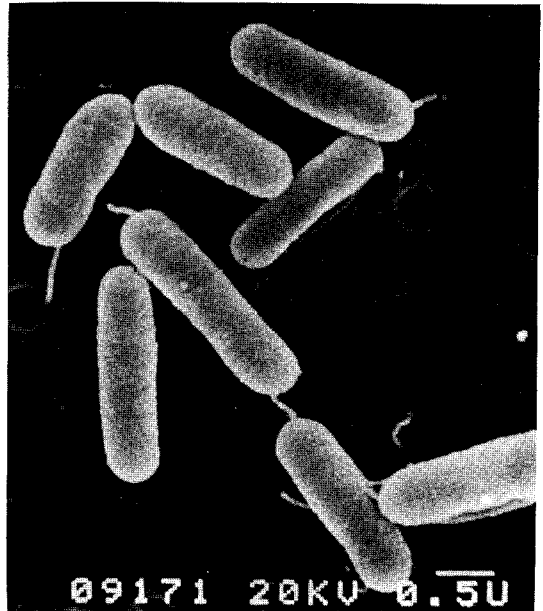


Fig. 1. Scanning electron microscopy of *Bacillus* sp. YS-309 isolated from soil.

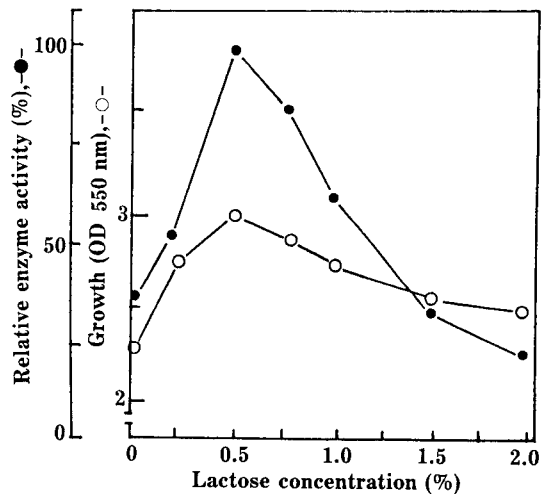


Fig. 2. Effect of lactose concentrations on the β -galactosidase production.

○: Cellular growth, and ●: Relative enzyme activity

하였다(Fig.1). 이 균주의 생육 및 효소 생산조건을 검토한 결과는 다음과 같다.

Lactose 농도의 영향

앞에서 기술한 배지 조성 중 lactose의 농도를 변화시켜 그 영향을 검토한 결과는 Fig.2와 같았다.

Table 1. Effect of various organic nitrogen sources on the β -galactosidase production.

Nitrogen source ^a	Growth (OD at 550 nm)	Enzyme activity (U/ml)
Polypeptone	6.64	2.1
Peptone	1.48	2.0
Casamino acid	0.51	0.5
Yeast extract	11.70	7.1
Tryptone	4.14	4.3
Defatted soybean meal	2.94	6.2
Meat extract	4.23	2.8

^a Final concentration of nitrogen source: 0.5%

Table 2. Effect of defatted soybean meal concentrations on the β -galactosidase production.

Concentration (%)	Growth (OD at 550 nm)	Relative enzyme activity (%)
0	0.56	33
0.2	1.08	65
0.4	1.67	89
0.6	1.98	100
1.0	2.62	79

Lactose 농도가 0.5%까지 증가함에 따라 균체생육과 더불어 효소생산이 증가하였으나 그 이상의 lactose 농도에서는 오히려 균체생육이나 효소생산 모두 감소하는 경향을 나타냈다. Hasan과 Durr(17)는 lactose 배지 중에 glucose가 공존할 경우, 세포 내의 lactose 함량은 lactose만 존재할 때의 10%에 불과하였다고 보고하였다. 즉 lactose 농도변화에 따른 균체생육 및 효소생산량의 차이는 세포 내에 존재하는 lactose와 glucose의 양과 관계가 있는 것으로 생각되며, Thompson이(18) 주장한 세포 내 PEP-potential도 호알카리 세균에 대한 lactose의 세포막 투과에 관련이 있을 것으로 추정되었다.

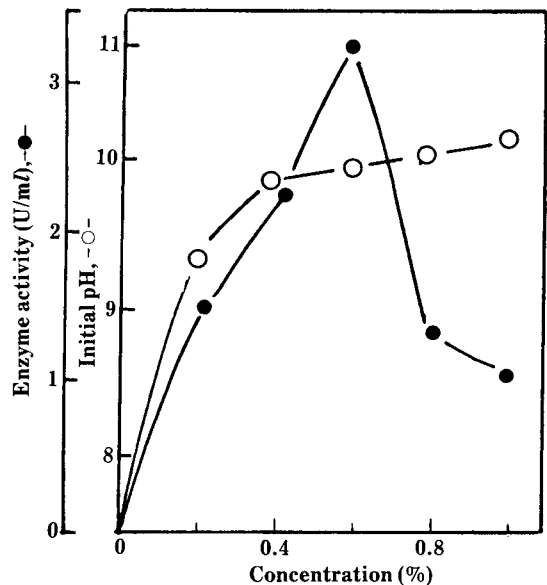
유기질소의 영향

기본배지 조성 중 polypeptone과 yeast extract 대신 각종 유기질소원을 0.5%씩 첨가한 결과(Table 1), yeast extract와 탈지대두분은 균체생육과 효소생산에 가장 효과적이었으나 polypeptone은 균체생육은 크게 촉진시킨 반면 효소생산은 비교적 효과가 없는 것으로 나타났다. Ramana Rao와 Dutta(19)는 proteose peptone 이 *Str. thermophilus* 의 β -galacto-

Table 3. Effect of carbonates and bicarbonate on the β -galactosidase production.

Salts ^a	pH		Cell growth (OD at 550 nm)	Enzyme activity (U/ml)
	Initial	Final		
K ₂ CO ₃	10.0	9.3	8.25	4.03
NaHCO ₃	9.5	8.7	3.82	6.67
Na ₂ CO ₃	10.2	9.5	4.75	7.47
(NH ₄) ₂ CO ₃	9.0	8.3	1.22	0.45

^a Final concentration: 1.0% (w/v)

**Fig. 3. Effect of sodium carbonate concentrations on the β -galactosidase production.**

sidase 생산에 가장 효과적이었다고 보고한 바 있다. 탈지대두분의 농도별 영향을 측정하기 위하여 탈지대두분을 끓는 물로 추출하고 원래의 무게로 농축하여 첨가한 결과 Table 2와 같이 0.6%(%)일 때가 가장 우수하였다. 특히 탈지대두분이 효과적으로 나타난 것은 효소생산의 경제성을 감안할 때 매우 유리한 점으로 생각되었다.

Carbonate의 영향

효소생산을 위한 최적배지 조건을 검토하기 위해 0.5% lactose가 함유된 배지에 4종의 mono 혹은 bicarbonate를 최종농도가 1% 되도록 첨가하여 효소생산에 미치는 효과를 검토하였다. Table 3에서와 같이 ammonium carbonate는 효소생산에 효과가 거의 없는 반면 sodium carbonate가 가장 우수하였으

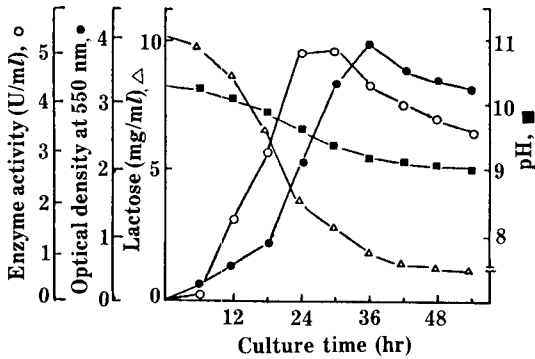


Fig. 4. Time course of β -galactosidase production. Alkaline medium contains 0.1% KH_2PO_4 , 0.02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5% yeast extract, 0.6% defatted soybean meal extract, 1.0% lactose and 1.0% Na_2CO_3 .

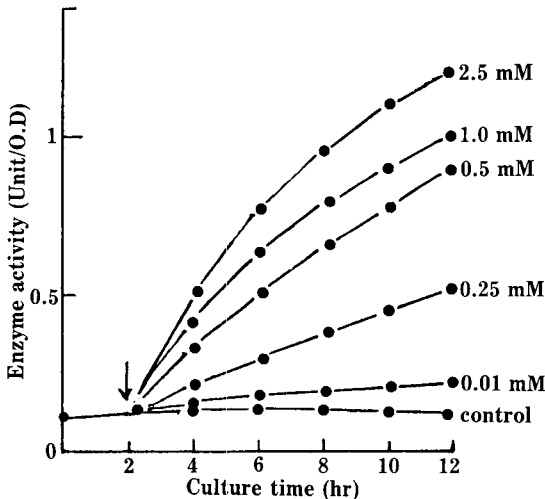


Fig. 5. Effect of IPTG concentrations on the induction of β -galactosidase from *Bacillus* sp. YS-309.

나, 균체생육에 대해서는 오히려 potassium carbonate가 가장 우수하였다. 이어서 sodium carbonate의 농도별 실험결과 0.6% 첨가시 효소생산이 가장 우수하였으며 이 때 배지의 초기 pH는 9.9였다(Fig.3). 이 결과로부터 Na^+ , K^+ , NH_4^+ 농도가 미생물의 생육과 효소생산에 영향을 주고 있음을 알 수 있었다.

배양시간의 영향

상기의 최적배지 조성 중 lactose 양만 조정하여 분리균의 생육, pH, 배지 중의 잔당량 및 효소활성을 경시적으로 측정된 결과는 Fig.4에 표시한 바와 같았다. 증배양액을 0.2% (v/v) 되게 점조하여 54시간까지 6시간 간격으로 관찰한 결과 균체생육은 36시간 후에는 정지기에 들어갔으며, 효소생산은 대수

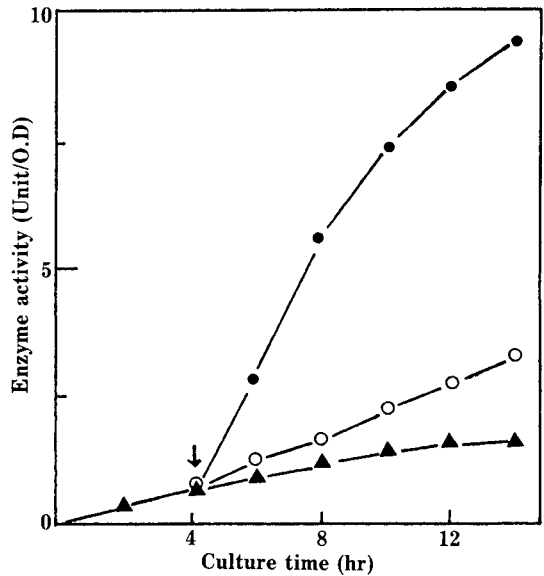


Fig. 6. Effect of lactose and IPTG on the induction of β -galactosidase synthesis.

Enzyme assay was conducted at 37°C for 10 min.

- : IPTG, 1 mM
- : Lactose, 50 mM
- ▲: None

증식기에 급격히 증가되어 대수말기에 최대의 활성을 보이는 이른 바 growth association 관계로 나타났다.

한편 배지 중의 lactose 함량은 균체증식과 더불어 점차 소모되었으며, 24시간 후에는 4mg/ml 정도였고 이 때 배지의 pH는 9.5였다. 따라서 효소를 최대한 생산하기 위해서는 24-30시간 동안 진탕배양하는 것이 가장 효과적으로 생각되었다.

IPTG의 영향

IPTG는 미생물로부터 β -galactosidase 생산에 있어 가장 강력한 유도효과를 지닌다는 Hidalgo 등 (20) 및 Cohen과 Monod(21)의 주장에 따라 IPTG의 농도별 영향을 측정하였다. 탄소원으로 0.5% glycerol을 첨하여 검토한 결과 Fig.5와 같이 IPTG 농도가 증가할수록 균체당 효소생산량은 증가하였다. 또 lactose와 IPTG의 효과를 상호 비교하였을 때 IPTG는 lactose의 약 3배의 유도효과가 있었음이 확인되었다(Fig.6).

요 약

토양으로부터 분리한 호알카리성 *Bacillus* sp.

YS-309는 β -galactosidase 생산력이 강력하였으며 중성배지 보다는 알카리배지 중에서 균체생육 및 효소생산량이 많았다. 이 분리균의 최적 배양조건은 lactose 0.5%, yeast extract 0.5%, defatted soybean meal extract 0.6% (v/v)가 함유된 pH 9.9의 알카리 배지를 사용하였을 때 얻어졌다. 이 때의 배양온도는 40°C, 배양시간은 24-30시간의 바람직한 것으로 나타났다. 또 IPTG와 lactose에 의해 효소생산이 유도적으로 증가하였으며 전자는 후자의 3배 효과가 있었다. Lactose 농도도 균체생육 및 효소생산에 영향을 미쳤으며 그 농도가 1.5% 이상 배지 중에 첨가 되면 균체생육 및 효소생산이 모두 감소하였다.

참고문헌

1. Yoon, S.S., D.S. Min and J.H. Yu: *Kor. J. Food and Nutrition*, **1**, 68 (1988)
2. Marchsi, S.L., E. Steers, Jr and S. Shifrin: *Biochem. Biophys. Acta*, **181**, 20 (1969).
3. Goodman, R.E. and D.M. Pederson: *Can. J. Microbiol.*, **22**, 817 (1976).
4. Borglum, G.B. and M.Z. Steinberg: *J. Food Sci.*, **37**, 619 (1972).
5. Wierzbicki, L. and F.V. Kosikowski: *J. Dairy Sci.*, **56**, 1182 (1973).
6. Mahoney, R.R., T.A. Nickerson and J.R. Whitaker: *J. Dairy Sci.*, **58**, 1620 (1975).
7. Gatt, S. and E.A. Baker: *Biochem. Biophys. Acta*, **206**, 125 (1970).
8. Alpers, D.H.: *J. Biol. Chem.*, **44**, 1238 (1969).
9. Richmond, M.L., J.I. Gray and C.M. Stine: *J. Dairy Sci.*, **64**, 1759 (1981).
10. Davis, A.E. and T. Bolin: *Nature*, **195**, 1244 (1967).
11. Blankenship, L.C. and P.A. Wells: *J. Milk Food Technol.*, **37**, 199 (1974).
12. Sorrenson, S.G. and E.V. Crisan: *J. Food Sci.*, **39**, 1184 (1974).
13. Horikoshi, K. and T. Akiba: *Alkalophilic Microorganisms*, Japan Scientific Societies Press, Tokyo, pp.5-28 (1982).
14. Sung, N.K., J.S. Roh, S.K. Park and Y.C. Chung: *Kor. J. Microbiol. Bioeng.*, **16**, 275 (1988).
15. Itoh, T., M. Suzuki and S. Adachi: *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 899 (1982).
16. Nickerson, T.A., I.F. Vujicic and A.Y. Lin: *J. Dairy Sci.*, **59**, 386 (1975).
17. Hasan, N. and I.F. Durr: *J. Bacteriol.*, **120**, 66 (1974).
18. Thompson, J.: *J. Bacteriol.*, **140**, 774 (1979).
19. Ramana Rao, M.V. and S.M. Dutta: *Appl. Environ. Microbiol.*, **34**, 185 (1977).
20. Hidalgo, C., J. Reyes and R. Goldschmidt: *J. Bacteriol.*, **129**, 821 (1977).
21. Cohen, M. and J. Monod: *Adaptation in Microorganisms*, Davis and Gale ed., Cambridge Press, pp.132-149 (1953).

(Received August 8, 1989)