

## $\beta$ -galactosidase생성을 위한 *Bacillus circulans*의 발효 및 효소 추출 특성

홍은숙, 이은규  
한양대학교 화학공학과

### The Characteristics of *Bacillus circulans* Fermentation and Ezyme Eextraction for $\beta$ -galactosidase

E. S. Hong and E. K. Lee  
Department of Chemical Engineering  
Hanyang University

#### 서론

Lactose는 우유나 whey의 주요 성분이며, ice cream, milk concentrates, pasteurized processed cheese spreads, 여러 가지 다양한 유제품 등에 사용되어져 왔다. 그러나, lactose의 용도는 낮은 용해도와 당도의 부족, 그리고, 과량 사용시의 결정화로 인해 그 사용이 제한되어져 왔었다.(3)(4)(5)

Lactose의 가수 분해 방법에는 acidic hydrolysis와 enzymatic hydrolysis의 방법이 있다.(5) Acidic hydrolysis에 의한 방법은 바람직하지 않은 향을 가진 부가반응이 일어난다는 단점이 있다. 반면에  $\beta$ -galactosidase에 의한 lactose의 가수분해 방법은, lactose의 가수 분해 및 transgalactosidation의 동시반응으로 위와 같은 단점을 극복하게 되었으며, lactose 뿐 만 아니라, lactose를 포함하는 whey의 수질오염 방지 등에도 이용할 수 있게 되었다. 이러한  $\beta$ -galactosidase를 생성하는 미생물로서는 박테리아, 곰팡이 및 효모등 여러 가지가 보고 되어 있다.

본 연구에서는  $\beta$ -galactosidase를 생산하는 균주로서, *Bacillus circulans*를 이용하였으며, 플라스크배양시 초기pH와 aeration (working volume을 이용), lactose의 농도가 enzyme secretion에 미치는 영향, 발효조실험에서 lactose의 농도와 초기 pH변화 및 control pH등이 enzyme 생성에 미치는 영향을 검토해 보았다. 또한, 발효액과 Enzyme solution을 aqueous two phase separation(ATPS)를 이용하여 분리해 보았을 때, slat와 polyethyleneglycol(PEG)의 조성변화에 따른  $\beta$ -galactosidase의 추출분리현상을 검토해 보았다.(1)(2)(6)

#### 재료 및 방법

##### 효소 생산 조건

Lactase를 생성하는 균주로서, 본 실험에서는 wild type의 *Bacillus circulans*를 사용하여 실험을 수행하였다.

플라스크배양시 배지성분(Lactose 2%, deffated soybean powder 3%, CSL solid 0.25%, yeast extract 0.25%, ammonium phosphate 0.25%, sodium carbonate 0.125%, soybean oil 0.875%) 중 에서 lactose농도의 영향을 알아보기 위한 실험에서 lactose농도를 1, 2, 4%로 변화시켰으

며, 초기 pH의 영향은 pH를 각각 6.0~7.5로, aeration은 발효액을 20ml, 50ml, 70ml, 100ml로 변화해가면서 역가를 측정하였다. 이때의 배양 조건은 250rpm, 37°C, pH 영향실험을 제외한 모든 발효액의 pH 7.0으로 조절하여 진탕배양시킨 뒤 시간에 따른 역가변화를 조사하였다.(3)(13)

발효조실험에서는 플라스크실험의 배지성분과 동일한 배지를 사용하여, 3 l 배양액에 100 ml 종배양액을 접종하였으며, 공기의 유입속도는 1vvm, 교반속도는 350rpm, 온도는 37°C로 일정하게 유지시킨 뒤, 초기 pH 및 control pH, lactose농도의 영향 등을 알아보았다.

**효소 활성 측정**

$\beta$ -galactosidase의 활성 o-nitrophenyl- $\beta$ -D-galacto-pyranoside(ONPG)를 기질로 한 다음과 같은 방법을 통해 측정하였다.(10)

배양액을 10000rpm에서 10분간 원심분리한 후 회수한 상등액을 효소액으로 사용하였다. 0.37% ONPG용액 4ml과 효소액 1ml을 37°C에서 equilibrium시킨 뒤 효소액을 기질용액에 가하여 10분간 반응시킨다. 반응시킨 혼합액 1ml에 10% Sodium carbonate용액 1ml을 가하여 반응을 정지시킨 후, 이것의 부피가 10ml이 될 때까지 증류수로 희석한 다음 반응액의 흡광도를 420nm에서 측정하여 미리 작성된 o-nitrophenol(ONP)의 표준곡선을 이용하여 정량하였다.

효소활성의 1unit은 37°C에서 기질인 ONPG로 부터 1  $\mu$  mol의 ONP를 생성하기 위한 효소의 양으로 정의한다.

**환원당 농도 측정**

배양액을 10000rpm에서 10분간 원심분리한 뒤 상등액을 취하여 DNS방법으로 측정하였다.(11)

**Glucose 농도 측정**

배양액을 10000rpm에서 10분간 원심분리한 뒤 상등액을 취하여 Wako사에서 제조한 glucose kit를 이용하여 미리 작성된 glucose표준곡선을 이용하여 정량하였다.

**결과 및 고찰**

**배지 조성 중 lactose농도의 영향**

플라스크배양에서 lactose농도가 lactase생산에 미치는 영향을 조사한 결과 lactose 2%에서 가장 높은 역가를 나타내었다. lactose농도 1%에서는 초기 효소활성이 좋은 반면, 발효 70시간 이후에 감소하였고, lactose 4%와 6%는 효소활성이 낮았다. lactose농도 4%와 6%의 낮은 효소활성은 lactose분해시 생성되는 glucose의 catabolic repression에 의한 현상으로 생각되며, lactose농도 1%에서 70시간 이후 효소생산이 감소되는 것은 영양물질의 부족 때문이라 생각된다. 한편, 발효조실험에서도 lactose농도 4%일 경우보다 2%일 경우 역가가 높음을 알 수 있었다. 플라스크배양실험에서의 결과(Table 1)에 의하면, glucose는 세포성장에, lactose가 효소생산에 더욱 좋은 영양원임을 알 수 있었다.

Table 1. Glucose와 lactose의 영향

	OD <sub>610</sub>	Activity(LU/ml)
glucose 0.1%	0.542	0.079
glucose 2%	2.662	0.036
lactose 2%	0.822	0.085
glucose 5%	1.812	0.058

### 초기 pH의 영향

플라스크배양 실험에서 배지의 초기 pH가 lactase 생산에 미치는 영향을 조사한 결과, pH가 6.0, 6.5는 역가가 거의 없었고, pH가 6.8~7.5에서는 비교적 높은 역가를 나타내었다. 그 중 pH 7.5에서 가장 높은 역가를 나타내었지만, 불안정한 역가변화를 관찰할 수 있었다. 따라서, pH 7.5이상에서의 역가변화에 대한 추가 실험이 요구된다.

발효조실험에서 초기 pH와 control pH의 영향을 조사한 결과, 초기 pH가 8.0, control pH가 7.0에서 가장 높은 역가를 나타내었는데, 추가 실험을 통해 초기 pH 8.0에서 균성장과 초기 역가면에서 뛰어났지만, 발효시간이 증가함에 따라 역가가 급격히 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 현상은 pH가 증가할수록 더욱 뚜렷하게 나타났는데, 아마도 *B. circulans*에서 분비되는 것으로 알려진 alkaline protease에 의한 효소의 분해에 기인한 것으로 추측된다.

### Aeration의 영향

플라스크배양에서 aeration이 lactase 역가에 미치는 영향을 조사한 결과 20ml, 70ml, 100ml일 경우, 60시간 전에는 50ml보다 높은 역가를 나타내었지만, 발효시간이 증가함에 따라 50ml일 경우가 가장 높은 역가를 나타내었지만, 발효시간이 증가함에 따라 50ml일 경우가 가장 높은 역가를 나타내었다.

### 발효조실험

발효조실험은 37°C, 350rpm, 1vvm의 공기유량을 이용하여 실험하였다. Lactose 농도 2%와 control pH가 7.0으로 동일한 경우를 비교해 보면, 초기 pH 8.5에서 더욱 높은 역가를 나타내었다. 또한, pH가 동일한 조건에서 lactose 농도에 따른 영향을 살펴보면, lactose 농도 4%보다 2%였을 경우의 역가가 높은 것을 알 수 있었다. 발효조실험의 결과를 종합해 보면, lactose의 농도는 2%가 적당하고, 초기 pH는 8.5, control pH는 7.0에서 가장 높은 역가를 나타내었다.

### Aqueous Two Phase Separation

Table 2의 결과를 보면, top phase가 bottom phase에 비해 적은 양의 total protein이 이동한 반면, 약 2.43배 높은 역가를 나타내었다. 또한, Lactase enzyme을 이용한 실험(Table 3)에서는 대부분의 lactase가 bottom phase로 이동하였는데, 높은 농도의 PEG와 salt가 salting out 효과를 나타내었기 때문이라 추측된다.

Table 2. 발효액을 이용한 분리실험

	$R=V_t/L_t$	Total protein ( $\mu\text{g/ml}$ )	activity (LU/ml)
PEG 5% Salt 12%	No separation	274.11	0.048
PEG 5% Salt 15%	2/13= 0.154	Top: 157.44 Bottom: 235.55	T: 0.117 B: 0.054

PEG 4000

Salt: potassium phosphate

Table 3. Enzyme solution을 이용한 분리  
 enzyme solution activity: 7.69 LU/ml  
 초기 pH 7.2  
 PEG 4000,  
 Salt: Pottasium Phosphate

	R=V <sub>L</sub> /V <sub>H</sub>	activity(LU/ml)
PEG 16%	6.8	T: 0.63
Salt 15%		B: 18.9
PEG 14%	1.3	T: 0.33
Salt 16%		B: 372.2
PEG 15%	1.8	T: 0.427
Salt 16%		B: 477

**결론**

플라스크배양에서는 lactose 2%와 pH 7.5가, 발효조실험에서는 초기 pH 8.5, control pH 7.0이 lactase생산에 적합한 조건임을 알 수 있었다.

ATPS실험에서는 PEG와 salt의 조성변화를 이용하여 lactase의 분리정도를 조절할 수 있었다.

**Reference**

1. Yoko Ikura and Koki Horikoshi, Agric. Biol., Chem., 43, 85 (1979)
2. Zabid Mozaffar, et al., Agric. Biol., Chem., 48, 3053 (1984)
3. Takao Iida, Sho Ozaki, et al., U.S. Patent, 4,237,230 (1980)
4. Mansel W. Griffiths et al., U.S. Patent, 4,332,895 (1982)
5. S. Zarate and M. H. Lopez-Leiva, J. of Food Protection, 53, 262 (1990)
6. Andres Veide, Torgny Lindback, Enzyme Microb. Technol., 6, 325 (1984)
7. A. Burvall, N. G. Asp and A. Dahlqvist, Food Chemistry, 15, 243 (1978)
8. W. L. Wendorff, G. H. Amunsen, J. Milk Food Technol., 34, 300 (1979)
9. Kazuhin, Nakanishi, Ryuich, Enzyme Microb. Technol., 5, 115 (1983)
10. DAIWA KASEI K. K., The Method of The FCC, 3rd Edition (1992)
11. M. F. Chaplin, J. F. Kennedy, Carbohydrate Analysis, IRL Press, 3 (1986)
12. Wallenfels, K. and Malhotra, O. P., Advances in Carbohydrate Chemistry, 16, 239 (1961)
13. M. V. Ramana Rao, S. M. Dutta, Appl. Environ., Micro., 34, 185 (1977)