

Bacillus subtilis β -Galactosidase의 고정화에 관한 연구

장 기·김창렬·이용규
전남대학교 농과대학 낙농학과

Studies on the Immobilization of β -Galactosidase from *Bacillus subtilis*

Gi Jang, Chang-Ryoul Kim and Yong-Kyu Lee

Department of Dairy Science, College of Agriculture, Chonnam National University

Abstract

The conditions for immobilization of the partially purified β -galactosidase from *Bacillus subtilis* HP-4 and the properties of the immobilized enzyme have been investigated. The crude enzyme precipitated with cold acetone was purified about 68-fold through DEAE-cellulose and sephadex G-100 chromatography and its recovery was 19.9%. The optimal conditions for immobilization of enzyme were obtained in 2%(w/v) sodium alginate, 15%(v/v) enzyme solution and 2%(w/v) calcium chloride, and also the optimal stirring time was 2 hours on the above conditions. The optimum temperature and pH values for immobilized enzyme were 55°C and 6.5, respectively. Its residual activity was show 25% after heat treatment for an hour at 65°C, and found its high stability in pH 6.0 to 8.0. The enzyme activity was not affected by EDTA, 2-mercaptoethanol, KCN, protective agents, and other methal ions except Hg ion and Cu ion. The K_m and V_{max} values of the immobilized enzyme on ONPG were 1.82×10^{-2} M and 3.57×10^{-8} mole/min, whereas those on lactose were 2.94×10^{-2} M and 1.68×10^{-7} mole/min, respectively. The remained enzyme activity for the immobilized enzyme was 95% of original activity after storage of 40 days at 4°C, and when reused for 5 times was 81%. When skim milk(4.8% lactose) and 5% lactose solution were reacted with the immobilized enzyme(250 units/g) of lactose were 51% and 43%, respectively.

Key words : *Bacillus subtilis* HP-4. β -galactosidase, immobilization, sodium alginate

서 론

인간에게 중요한 식품으로 간주되어온 우유와 유제품의 주요 탄수화물인 유당은 식품영양이나 제조상에 몇 가지 문제점을 유발시켜 왔다. 즉, 소장내에 유당을 분해할 수 있는 효소가 부족하여 섭취된 유당을 분해하지 못하므로 발생하는 복부팽만, 복통, 경련, 설사 등의 증상을 일으키는 유당 소화장애증(lactose intolerance)⁽¹⁾과 냉동유제품 및 농축유제품에서 유당이 결정화하여 생기는 사상화(sandness)로 인하여 우유의 소비촉진 감소나 유제품 제조시 품질저하 등의 문제를 야기시켜 왔다^(2,3).

이와 같은 문제점을 해결하기 위한 방법으로서 우유중의 유당을 먼저 유당분해효소인 β -galactosidase를 이용하여 가수분해하는 것이 가장 좋은 방법으로 알려져 있다⁽⁴⁾. β -Galactosidase는 유당의 β -1,4-glycosidic linkage를 가수분해하여 단당류인 glucose와 galactose를

생산하는 효소로서 자연계에 널리 존재하며 이를 생산하는 미생물로는 세균^(5,6), 효모^(7,8), 곰팡이^(6,9) 등으로, 일부의 예외를 제외하고는 일반적으로 세균이나 효모는 균체내 효소를 유도적으로, 곰팡이는 균체의 효소를 구성적으로 생산하는 것으로 알려져 있다⁽¹⁰⁾. *Bacillus subtilis* HP-4는 고온성세균으로서 열에 대한 안정성이 좋고 일반적으로 알려져 있는 세균과는 다르게 균체외로 효소를 구성적으로 생산하는 장점이 있다. 이와 같은 효소를 식품가공에 이용함에 있어 대체로 수용성효소는 그 효소활성이 불안정하고 반응 후 생성물과 효소의 분리가 어렵기 때문에 값비싼 효소의 재사용이 불가능하며, 반응공정이 연속화되지 못하는 단점이 있다. 이의 해결책으로 효소의 고정화가 매우 유용한 방법으로 인정되어 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다⁽¹¹⁻¹³⁾.

본 실험은 *Bacillus subtilis* HP-4를 밀기울로 고체배양하여 추출한 β -galactosidase를 정제한 다음 담체로서 agarose, acrylamide, *k*-carrageenan, sodium alginate 등을 사용하여 고정화를 시도하였던 바, 그 중 sodium alginate가 가장 적합하여 이를 담체로한 효소고정화의

Corresponding author : Chang-Ryoul Kim, Department of Dairy Science, College of Agriculture, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea

조건 및 고정화효소의 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

균주

전남대학교 농과대학 낙농학과 낙농미생물학 연구실에 보관 중인 *Bacillus subtilis* HP-4를 nutrient agar(NA) 배지상에서 4주간격으로 계대배양하여 4°C에 보관하면서 사용하였다.

배양조건

500 ml 삼각flask에 밀기울 20g과 수돗물 20 ml를 혼합하여 멸균시킨 고체배지에 NA배지에서 사면 배양한 균체를 멸균증류수에 현탁(10^8 /ml)하여 이 용액 3 ml를 접종하고 35°C에서 72시간 정지배양 하였다.

효소의 추출

효소의 추출은 배지중량의 3배량의 멸균증류수를 첨가하여 실온에서 3시간 진탕한 후 여과포로 압착한 용액을 3,000×g에서 15분간 원심분리하여 얻은 상등액에 2배량의 아세톤(-10°C)을 가하여 단백질을 침전시켰다. 침전된 단백질을 모아 다시 3,000×g에서 15분 원심분리하여 0.1 M acetate buffer(pH 6.0)에 녹인 후 동일한 완충용액으로 4°C에서 12시간 투석하여 조효소로 사용하였다.

효소의 정제

DEAE-cellulose ion exchange chromatography는 조효소 30 ml를 0.1 M acetate buffer(pH 6.0)으로 평형화 된 DEAE-cellulose column(2.5×50 cm)에 흡착시켜 0 M에서 0.6 M까지 NaCl linear gradient로 30 ml/hr 유속으로 용출하고 5 ml씩 분획하였다. Sephadex G-100 gel filtration chromatography는 0.1 M acetate buffer(pH 6.0)로 평형화시킨 Sephadex G-100 column(2.5×50 cm)을 사용하여 DEAE-cellulose chromatography 과정에서 효소활성이 높은 분획들을 모아 동결건조한 것을 시료로 사용하여 15 ml/hr로 용출하고 2.5 ml씩 분획하였다.

단백질의 정량

Lowry 등⁽¹⁴⁾의 방법에 의하여 bovine serum albumin (Sigma Chemical Co., U.S.A.)을 표준 단백질로 하여 정량하였다.

효소활성의 측정

효소활성의 측정은 기질이 o-nitrophenyl- β -p-galac-

topyranoside(ONPG)인 경우 Park 등⁽¹⁵⁾의 방법에 따라 실시하였다. 즉, 수용성 효소일 때는 효소액 1 ml와 4 mM ONPG 1 ml를 혼합하여 50°C에서 30분간 반응시키고 여기에 1 M Na₂CO₃ 0.2 ml를 가하여 반응을 정지시킨 후 420 nm에서 비색 정량하여 유리된 o-nitrophenol (ONP)의 양을 표준곡선에 의해 구하였다. 이 때 효소의 활성단위는 분당 1 μ mole의 ONP를 생산하는 효소량을 1단위로 하였다. 고정화효소일 때는 상기방법을 약간 수정하여 0.1 M acetate buffer(pH 6.0)에 넣은 bead 0.2 g을 4 mM ONPG 1 ml로 혼합하여 50°C에서 30분간 반응시킨 후 반응액 1 ml를 취하고 0.1 ml의 1 M Na₂CO₃를 첨가하여 발색하였다. 이 때 효소의 활성단위는 수용성 효소와 같은 방법으로 결정하였다. 또한 유당을 기질로 사용한 효소의 활성측정은 Raabo와 Terkildsen⁽¹⁶⁾의 방법에 의하여 유당의 분해산물인 glucose를 발색시켜 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때에 효소의 활성단위는 분당 1 μ mole의 glucose를 생성하는 효소량을 1 단위로 하였다.

효소의 고정화

고정화용 담체인 agarose, acrylamide, k-carrageenan, sodium alginate는 Sigma Chemical Co(U.S.A.) 제품을 사용하여 고정화효소를 제조하였다. 실험여건상 agarose와 k-carrageenan은 낮은 온도조건하에서는 bead를 제조하기 곤란하였고 k-carrageenan은 산성 pH에서는 bead의 강도가 약했으며, acrylamide로 만든 bead는 효소활성이 떨어지고 인체에 유해하다는 단점이 있으므로 본 실험의 담체로서는 sodium alginate가 가장 적합하여 엄 등⁽¹⁷⁾의 방법에 따라 다음과 같이 효소고정화를 시도하였다. 즉, 멸균수에 sodium alginate를 녹이고 여기에 효소액을 첨가하여 완전히 교반시킨 다음 연동펌프를 통하여 1방울씩 CaCl₂ 용액에 적하하였다. 조제된 bead는 0.1 M acetate buffer(pH 6.0)로 수회 세척한 후 4°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

결과 및 고찰

효소의 정제

먼저 DEAE-cellulose를 이용하여 ion exchange chromatography를 실시한 결과는 Fig. 1과 같이 3개의 peak로 단백질이 용출되었음을 알 수 있었으며, 이 중 마지막 peak에서 β -galactosidase의 활성을 보였다. β -galactosidase의 활성이 높은 분획을 모아 동결건조한 다음 Sephadex G-100을 이용하여 gel filtration을 수행한 결과는 Fig. 2에 나타난 바와 같이 1개의 peak로 용출된 β -galactosidase 분획을 확인하였다. 이상의 정제과정을

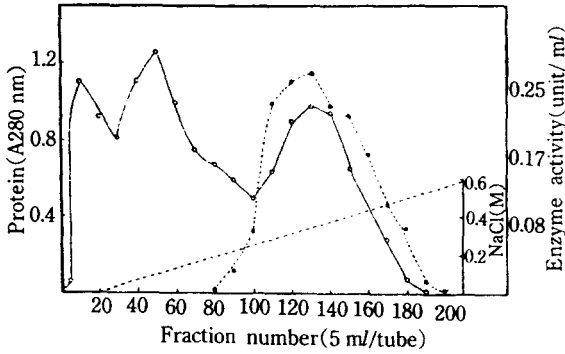


Fig. 1. DEAE-cellulose column chromatography of β -galactosidase
 ○—○ : protein ●—● : beta-galactosidase
 — : NaCl gradient

요약한 결과는 Table 1에 나타난 바와 같으며, 조효소는 약 68배 정제되었고 효소의 회수율은 19.9%이었다.

효소의 고정화조건

금속이온의 영향

금속염인 $CaCl_2$, $AlCl_3$, $FeCl_3$, KCl , NH_4Cl 에 의한 각각의 metal alginate bead의 형성결과는 Table 2에 나타난 바와 같다. 가장 양호한 형성능은 Ca 염이었고 KCl 과 NH_4Cl 의 경우 bead가 형성되지 않은 것으로 보아 이⁽⁹⁾가 보고한 바와 같이 이들의 금속염과 Sodium alginate와의 반응에서는 선택성이 있음을 나타내고 있다

담체농도의 영향

Sodium alginate 농도(w/v)를 1.5%에서 3.5%까지 변화시키면서 효소활성을 조사한 결과는 Fig. 3에서 보여준 바와 같이 2% sodium alginate 농도(w/v)일 때 가장 좋은 활성을 나타내었다. 1.5% sodium alginate 농도에서는 bead를 형성하고 있는 alginate gel 조직이 견고하게 구성되지 못하므로서 포괄된 단백질이 이탈되어 상대적인 효소활성저하를 보였다. 3.5% sodium alginate 농도에서는 Sodium alginate의 높은 점도로 인하여 bead의 모양이 부정형을 보였는데, 이 점은 고농도의 alginate는 gel 구조의 조밀성에 의하여 기질이 gel 내부로 확산되는

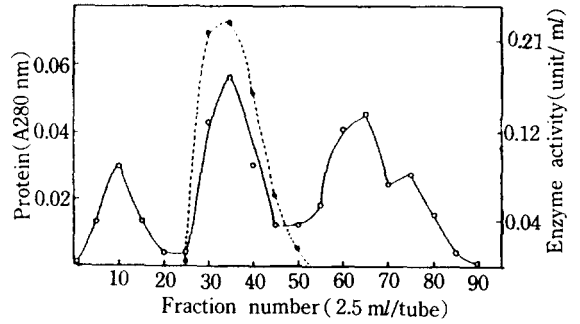


Fig. 2. Elution profile of major activity peak from DEAE-cellulose on Sephadex G-100 column
 ○—○ : protein ●—● : beta-galactosidase

것을 제한하기 때문에 효소활성이 감소되는 것으로 사료되었다⁽¹⁷⁾.

효소농도의 영향

효소농도(v/v)를 5~25%되도록 한 다음 2% sodium alginate 액에 첨가하여 제조한 고정화효소를 7회 반복 사용하면서 효소활성을 조사한 결과는 Fig. 4와 같다. 20%와 25%의 효소농도를 첨가하여 제조한 고정화효소는 3회 재사용 이후 급속히 효소활성이 감소하였고, bead가 쉽게 부스러진 반면에, 15%의 효소농도에서는 3회 재사용 이후에도 약간의 효소활성 저하를 나타내었고 상대적으로 효소활성이 가장 좋았기 때문에 최적조건으로 검토되었다.

$CaCl_2$ 농도의 영향

$CaCl_2$ 농도(w/v)를 1~4%까지 조절하여 효소활성에 미치는 영향을 조사한 Fig. 5의 결과는 2% $CaCl_2$ 농도에서 최적조건임을 보였다. 낮은 $CaCl_2$ 농도에서는 bead의 강도가 저하되었는데, 이 점은 엄 등⁽¹⁷⁾이 보고한 바와 같이 sodium이온과 calcium이온 사이의 교환이 낮아 그 결과로 bead의 강도가 낮아진다고한 사실과 일치하였다.

Bead 형성에 미치는 교반시간의 영향

Bead 제조시 $CaCl_2$ 용액에서 교반시간에 따른 영향을 조사하였다. Fig. 6에 나타난 바와 같이 120분의 교반시간에서 최적조건 이었으며, 그 이상의 교반은 효소의

Table 1. Purification steps of β -galactosidase from *Bacillus subtilis* HP-4

Step	Volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/mg protein)	Purification fold	Yield (%)
Cell free extracts	300	720	1200	1.67	1	100
Acetone fractionation	30	185.4	710	3.83	2.3	59
Ion exchange on DEAE-cellulose	40	32.6	280	8.58	5.1	23.3
Gel filtration on Sephadex G-100	25	2.1	239	113.8	68.0	19.9

Table 2. Bead formation in metal alginate gel

Gelation reagent	Shape	Strength	Enzyme activity (U/g of bead)
CaCl ₂	globose	excellent	551
AlCl ₃	ellipse	good	93
FeCl ₃	globose	fragile	121
KCl		no bead formed	
NH ₄ Cl		no bead formed	

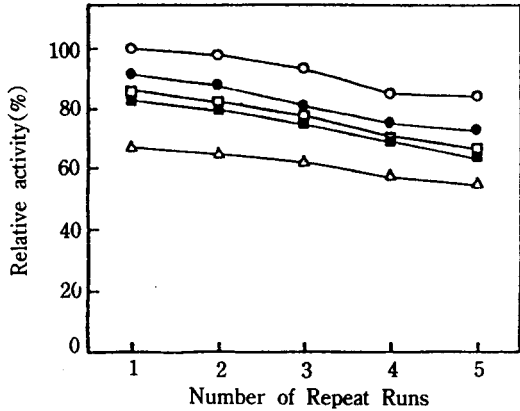


Fig. 3. Effect of sodium alginate concentrations on the immobilized enzyme activity
 ●—● : 1.5% ○—○ : 2% □—□ : 2.5%
 ■—■ : 3% △—△ : 3.5%

활성증진에 비효과적이었다. 이 점은 오랜 교반시간이 bead의 구조를 조밀하게 하므로서 담체내부로 기질확산이 제한되었기 때문이며, 엄 등⁽¹⁷⁾은 교반속도에 의해서 bead의 구조가 영향을 받기때문에 담체내부로의 기질확산이 제한된다고 하였다. 본 실험의 결과는 기질확산에 의한 영향으로 고정화효소의 겔보기활성이 저하된 것으로 검토되었으며, 이 점은 이와 김⁽¹³⁾의 보고와 일치하였다.

진탕속도의 영향

진탕속도가 고정화효소의 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 진탕속도를 0~180 stroke/min(spm), 4 cm까지 조절하면서 그 영향을 조사한 결과는 Fig. 7에 나타난 바와 같이 120 stroke/min(spm), 4 cm에서 최적 조건으로 검토되었다.

고정화효소의 특징

온도의 영향

고정화효소의 활성에 미치는 온도의 영향을 조사하기 위하여 35°C에서 70°C까지 5°C 간격으로 조사하였다. Fig. 8에서 보여준 바와 같이 고정화효소와 수용성효소의 최적온도는 55°C로 일치하였으며, 고정화효소의 경우 60°C

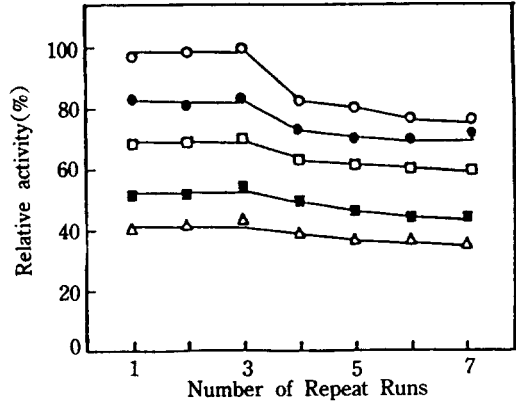


Fig. 4. Effect of enzyme concentrations on the immobilized enzyme activity
 △—△ : 5% ■—■ : 10% □—□ : 15%
 ●—● : 20% ○—○ : 25%

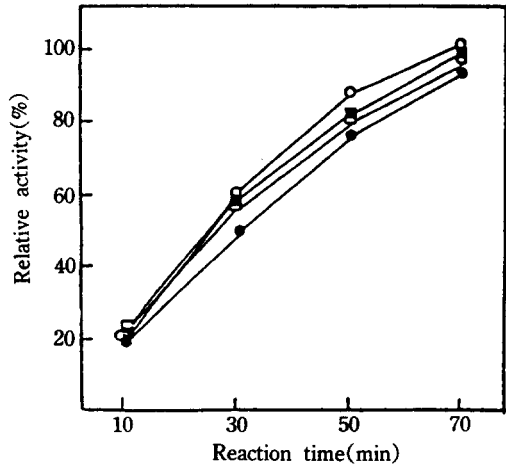


Fig. 5. Effect of CaCl₂ concentration on the preparation of immobilized enzyme at various reaction time
 ●—● : 1% ○—○ : 2% ■—■ : 3% □—□ : 4%

에서 65%의 활성을 보여준 반면, 수용성효소는 21°C로서 효소활성이 급격히 감소하였다. 이러한 결과는 D' Souza와 Nadkarni⁽¹⁸⁾가 보고한 바와 같이 효소를 고정화 하므로서 고온에서 보다 더 안정하게 효소활성을 유지 하였다는 점과 일치하였다.

pH의 영향

고정화효소의 활성에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위해서 pH 4.0에서 8.0까지 검토하였다. 그림에 나타난 바와 같이 고정화효소와 수용성효소의 최적 pH는 각각 6.5와 6.0이었는데, 이 점은 송 등⁽¹⁹⁾이 보고한 바와 같이 담체내부의 정전기적 현상에 의한 것으로 검토되었다.

열 안정성

고정화효소 및 수용성효소를 35°C에서 70°C까지 5°C

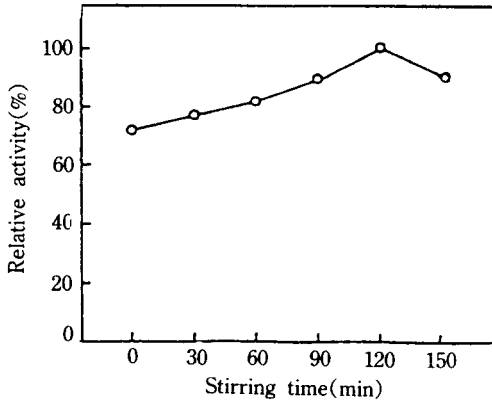


Fig. 6. Effect of stirring times for the preparation of immobilized enzyme in 2% of CaCl₂ solution

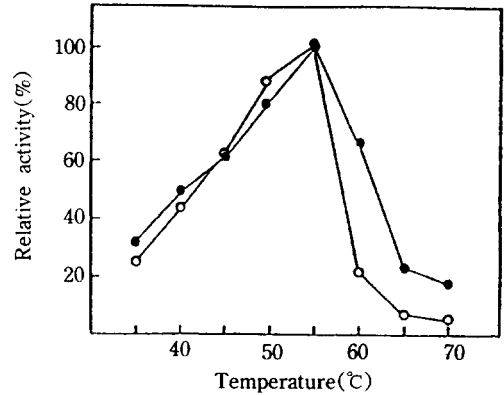


Fig. 8. Effect of temperature on activities of the immobilized β -galactosidase and soluble enzyme
○—○ : soluble enzyme ●—● : immobilized enzyme

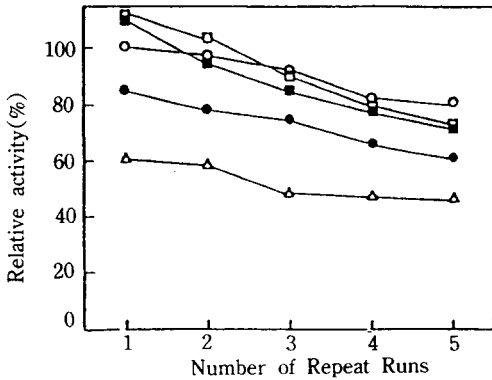


Fig. 7. Effect of shaking rate for the preparation of immobilized enzyme

△—△ : 0 spm ●—● : 90 spm ○—○ : 120 spm
□—□ : 150 spm ■—■ : 180 spm

간격으로 각 온도에서 1시간 정지 후 잔존활성을 조사한 Fig. 10의 결과에 의하면 고정화효소와 수용성효소는 60°C에서 각각 95%와 25%의 잔존활성을 보였으며, 이러한 점은 D'Souza와 Nadkarni⁽¹⁸⁾가 보고한 바와 같이 효소를 고정화하므로서 비교적 고온에서도 효소단백질이 안정화된다고 한 사실과 일치하였다. 수용성효소는 60°C 이상에서 급격한 활성저하를 나타내었으며 고정화효소보다 고온에서 불안정함을 보였다.

pH 안정성

고정화효소의 pH안정성을 조사하기 위하여 각 pH값에서 2시간 정지 후 잔존활성을 측정된 결과는 Fig. 11에 나타난 바와 같이 고정화효소는 수용성효소에 비하여 pH 6.0에서 8.0까지 안정하게 효소활성을 유지하고 있음을 보였다. 이러한 결과는 D'Souza와 Nadkarni⁽¹⁸⁾가 보고한 바와 같이 고정화효소의 경우 수용성효소 보다 높은 pH값에서도 효소 단백질의 안정성이 증가된다고

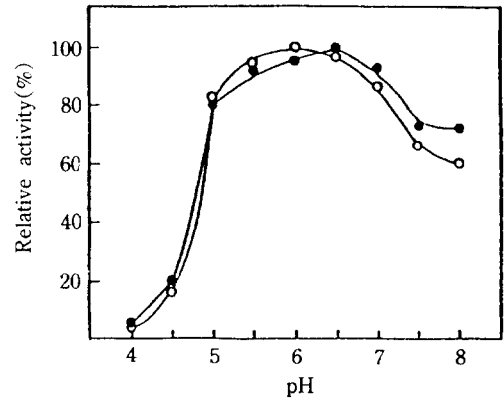


Fig. 9. pH profile of soluble and immobilized β -galactosidase

pH 3.5~6.0 : 0.2 M Sodium acetate buffer
pH 6.5~7.5 : 0.2 M Imidazole-HCl buffer
pH 8.0~9.0 : 0.2 M Tris-maleate buffer

○—○ : soluble enzyme ●—● : immobilized enzyme

한 점과 일치함을 보여주었다.

금속이온의 영향

여러 가지 금속이온과 chelating agent를 비롯한 기타 effector들이 효소활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각각의 농도를 10⁻³ M에서 10⁻⁴ M까지 변화시켜 조사한 결과는 Table 3과 같다. EDTA, KCN과 같은 chelating agent나 Fe²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺ 등의 금속이온, 그리고 2-mercaptoethanol은 효소활성에 영향을 미치지 않은 반면에 Cu²⁺와 Hg²⁺의 경우는 효소활성을 크게 저해하였다. 이러한 점은 SH group이 효소작용에 필수적이며, 2-mercaptoethanol이 효소활성에 영향을 주지않은 것은 효소 작용이나 conformation유지에 disulfide결합이 관여하지 않았음을 알 수 있었으며, Tanaka 등⁽¹²⁾은 Cu²⁺가 효

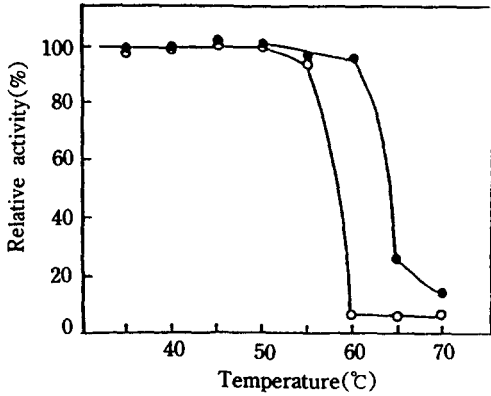


Fig. 10. Effect of temperature on the stability of immobilized enzyme
○—○ : soluble enzyme ●—● : immobilized enzyme

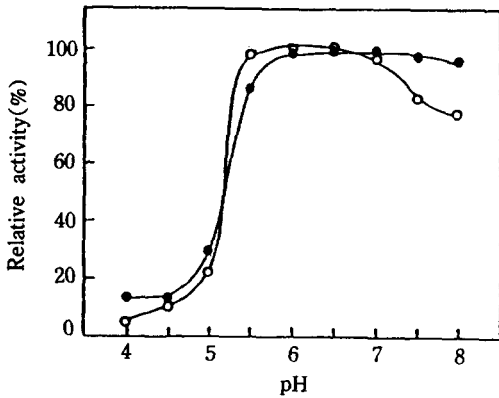


Fig. 11. Effect of pH on the stability of immobilized enzyme
○—○ : soluble enzyme ●—● : immobilized enzyme

소활성을 저해하는 것으로 보고하였는데 이 점은 본 실험의 결과와 일치하였다.

효소보호제에 의한 영향

보호제의 첨가에 의한 효소활성변화를 조사하기 위하여 각 보호제의 농도를 10^{-2} M에서 10^{-4} M까지 변화시켜 검토하였다. Table 4에 나타난 바와 같이 glucono- δ -lactone, 1,4-Dithiothreitol(DTT), L-glutathione, 그리고 L-cysteine의 보호제는 효소활성에 큰 영향을 주지않았다. Ohmiya 등⁽²⁰⁾은 *Aspergillus oryzae*은 β -galactosidase를 polyacrylamide에 고정화하기 위하여 조제한 용액에 glutathion과 glucono- δ -lactone을 첨가한 경우 효소의 활성증진 효과를 얻었다고 하였는데, 이들이 결과와는 큰 차이를 보였다.

기질농도에 의한 영향

기질농도가 효소의 반응속도에 미치는 영향을 조사하

Table 3. Effect of various metal ions and enzyme inhibitors on the β -galactosidase activity

Reagent	Relative activity(%)			
	soluble enzyme		immobilized enzyme	
Concentration	10^{-3} M	10^{-4} M	10^{-3} M	10^{-4} M
Urea	95	96	88	100
FeCl ₂	98	105	107	102
EDTA	109	97	104	108
NH ₄ Cl	89	99	103	100
MnCl ₂	98	96	87	108
CaCl ₂	100	92	100	102
HgCl ₂	13	11	15	6
NaCl	94	110	100	107
KCN	98	96	94	93
CuCl ₂	8	9	11	16
2-Mercapto-ethanol	102	103	96	104
None	100	100	100	100

Table 4. Effect of protective agents on the β -galactosidase activity

Reagent	Relative activity(%)					
	soluble enzyme			immobilized enzyme		
Concentration	10^{-2} M	10^{-3} M	10^{-4} M	10^{-2} M	10^{-3} M	10^{-4} M
Glucono- δ -lactone	94	97	97	101	107	102
DTT	101	100	97	97	110	98
L-Glutathione	97	102	95	94	95	93
L-Cysteine	95	101	97	93	91	93
None	100	100	100	100	100	100

기 위하여 Lineweaver-Burk plot에 의한 Michaelis-Menten 상수(K_m)와 최대 반응속도값(V_{max})을 구한 결과는 Fig. 12와 13과 같다. 유당이 기질인 경우에는 고정화효소가 수용성효소보다 기질친화도가 좋았는데, Hornby 등⁽²¹⁾은 이러한 현상이 효소를 고정화하므로서 담체와 기질간의 상호 정전기적 작용에 의하여 기질친화도에 영향을 주는 것으로 보고하였다.

효소의 저장안정성

고정화효소의 저장에 대한 효소활성변화를 조사하기 위하여 4°C에서 40일간 저장하면서 잔존활성을 조사한 결과는 Fig. 14에 나타난 바와 같이 95% 이상의 높은 효소활성을 유지하였다. 이러한 점은 Morisi 등⁽²²⁾이 효모에서 추출한 β -galactosidase를 cellulose triacetate에 고정화하여 50일간 2~5%가 실행되었다고 하였고, Cabral 등⁽²³⁾이 다공성 무기담체에 생세포를 고정화하여 60일간 계속적으로 활성을 조사한 결과 거의 활성이 감

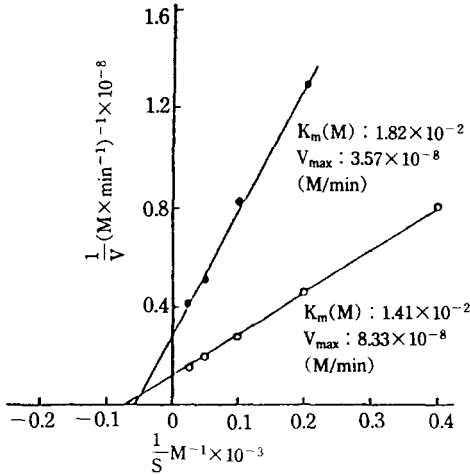


Fig. 12. Lineweaver-Burk plots for hydrolysis of ONPG by soluble and immobilized β -galactosidase
 ○—○ : soluble enzyme ●—● : immobilized enzyme

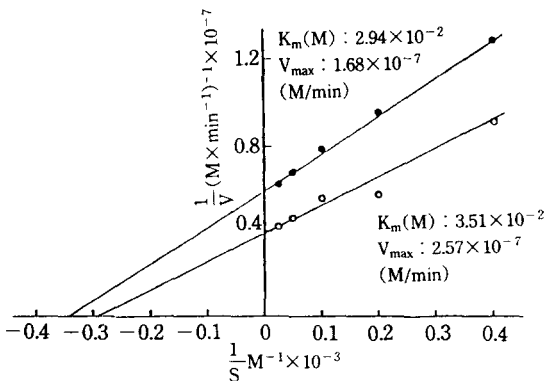


Fig. 13. Lineweaver-Burk plots for hydrolysis of lactose by soluble and immobilized β -galactosidase
 ○—○ : soluble enzyme ●—● : immobilized enzyme

소되지 않았다는 보고와 일치하였다.

유당의 분해

고정화효소를 이용하여 탈지유(4.8% 유당)와 5% 유당용액을 50°C에서 1~9 hr까지 2시간 간격으로 유당분해율을 조사하였던 바 Fig. 15에 나타낸 바와 같이 9시간 반응 후 탈지유는 51% 그리고 5% 당용액은 43%의 유당분해율을 보였는데, 탈지유에서 유당분해율이 5% 유당용액보다 약간 높은 점은 Dahlgvist 등⁽²⁴⁾과 Mahoney 등⁽²⁵⁾이 보고한 바와 같이 유단백질이 효소의 안정제로 작용하였기 때문인 것으로 사료되었다.

요 약

Bacillus subtilis HP-4의 β -galactosidase를 추출, 정

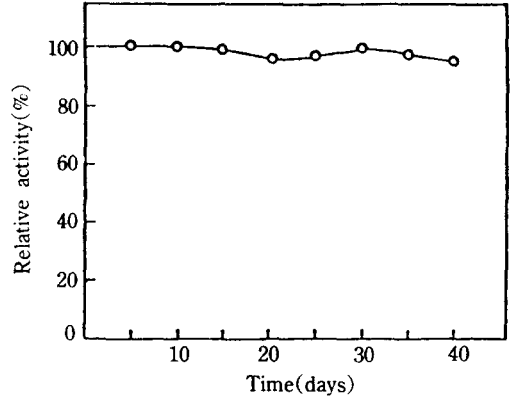


Fig. 14. Storage stability of immobilized enzyme at 4°C

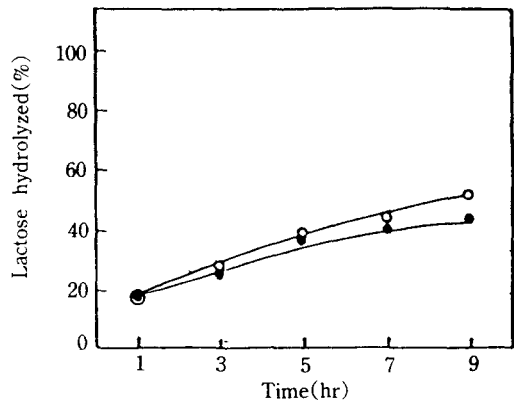


Fig. 15. Hydrolysis of lactose by immobilized enzyme (250 units)
 ○—○ : 5% skim milk ●—● : 5% lactose solution

제하여 효소의 고정화조건 및 고정화효소의 특성을 조사하였다. *B. subtilis*를 배양하여 얻은 조효소액을 acetone분획, DEAE-cellulose에 의한 ion exchange chromatography, Sephadex G-100에 의한 gel filtration과정을 통하여 정제하였던 바 약 68% 정제되었으며, 이 때의 회수율은 19.9%이었다. 본 효소의 최적 고정화조건은 2% (w/v)의 sodium alginate농도, 15%(v/v)의 효소농도, 그리고 2%(w/v)의 CaCl₂ 농도에서 2시간 교반하였을 때 이었다. 고정화효소의 최적온도와 pH값은 각각 55°C와 6.5이었다. 고정화효소의 활성은 Hg²⁺이온과 Cu²⁺이온에 의하여 저해되었으며, EDTA, 2-mercaptoethanol, KCN 등의 금속이온 그리고 보호제에 의한 영향은 없었다. 고정화효소의 ONPG와 유당에 대한 K_m값과 V_{max}값은 각각 1.82×10⁻² M과 2.94×10⁻² M 그리고 3.57×10⁻⁸ mole/min과 1.68×10⁻⁷ mole/min이었다. 고정화효소를 4°C에서 40일간 저장 후 잔존활성과 5회 재사용

후 잔존활성을 조사한 결과는 각각 95%와 81%이었으며, 탈지유(4.8% 유당)와 5% 유당용액에서 50°C, 9시간 반응시켰을 때 유당분해율은 각각 51%와 43%이었다.

문 헌

- Brand, J.C., Gracy, M.S., Spargo, R.M. and Dutton, S.P. : Lactose malabsorption in Australian aborigines. *Am. J. Clin. Nutr.*, **33**, 1049(1983)
- Mohr, W. and Koenen, K. : Lactose crystals of texture defects in dried milk. *Kieler Milchwissenschaft Forsh Berichtz*, **3**, 665(1951)
- Nickerson, T.A., Vujicic, I.F. and Lin, A.Y. : Colorimetric estimation of lactose and its hydrolytic products. *J. Dairy Sci.*, **59**, 386(1975)
- Holsinger, V.H. : Application of lactose modified milk and whey. *Food Technol.*, **32**, 35(1978)
- Anema, P.J. : Purification and some properties of β -galactosidase of *Bacillus subtilis*. *Biochem. Biophys. Acta*, **89**, 495(1964)
- Premi, L., Sandine, W.E. and Elliker, P.R. : Lactose hydrolyzed enzymes of *Lactobacillus* sp. *Appl. Microbiol.*, **24**, 51(1972)
- Mahoney, R.R. and Whitaker, J.K. : Purification and physicochemical properties of β -galactosidase from *K. fragilis*. *J. Food Sci.*, **43**, 584(1978)
- Wendorff, W.L. and Amundson, C.H. : Characterization of β -galactosidase from *Saccharomyces fragilis*. *J. Milk Food Technol.*, **34**(6), 300(1971)
- 이강흡 : 미생물 고정화에 관한 연구. 제 1보. *J. Korean Agric. Chem. Soc.*, **24**(2), 149(1981)
- Sorensen, S.G. and Crisan, E.V. : Thermostable lactose from thermophilic fungi. *J. Food Sci.*, **38**, 1184(1974)
- Olson, A.C. and Stanley, W.L. : The use of tannic acid and phenolformaldehyde resins with glutaldehyde to immobilized enzyme. In *Immobilized Enzymes in Food and Microbial Processes*, A.C. Olson and Cooney, C.L., J.(ed). Plenum Press, New York, NY., p.51(1974)
- Tanaka, Y., Kagamishi, A., Kiuchi, A. and Horiuchi, T. : Purification and properties of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *J. Biochem.*, **20**, 363(1975)
- 이규현, 김계용 : 고정화효소와 그 이용. *폴리머*, **8**(3), 159(1984)
- Lowry, O.H., Roebrough, N.J.R., Farr, A.C. and Randall, R.J. : Protein measurement with Folin reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265(1951)
- Park, Y.K., DeSanti, S.S. and Pastore, G.M. : Production and characterization of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *J. Food Sci.*, **44**, 100(1970)
- Raabo, E. and Terkilden, T.C. : On the enzymatic determination of blood glucose scan. *J. Clin. Lab. Invest.*, **12**, 402(1960)
- 엄태봉, 홍재식, 변시명 : Hydrolysis of sucrose by invertase entrapped in calcium alginate gel. *J. Korean Agric. Chem. Soc.*, **27**(2), 112(1984)
- D'Souza, S.F. and Nadkarni, G.B. : Continuous inversion of sucrose by gel-entrapped yeast cells. *Enzyme Microb. Technol.*, **2**, 217(1980)
- 송충석, 변유량, 유주현 : *Aspergillus nidulans*가 생산하는 naringinase에 관한 연구(4보). DEAE-Sephadex A-25에 의한 Naringinase의 고정화. *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **7**(3), 141(1979)
- Ohmiya, K., Terao, C., Shimizu, S. and Kobayashi, T. : Immobilization of β -galactosidase by polyacrylamide in the presence of protective agents. *Agric. Biol. Chem.*, **39**(2), 491(1975)
- Hornby, W.E., Lilly, M.D. and Crook, E.M. : The preparation and properties of ficin chemically attached to carboxymethyl cellulose. *J. Biochem.*, **94**, 420(1966)
- Morisi, F., Pastore, M. and Vigilla, A. : Reduction of lactose content of milk by entrapped β -galactosidase. 1. Characteristics β -galactosidase from yeast and *E. coli*. *J. Dairy Sci.*, **56**(9), 1123(1972)
- Cabral, M.S., Novis, J.M. and Kennedy, J.F. : Immobilization studies of whole microbial cells on transition metal activated inorganic supports. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 157(1986)
- Dahlqvist, A. and Morano, B. : Properties of lactose produced by *Candida pseudoropicalis*. *J. Dairy Sci.*, **66**, 215(1983)
- Mahoney, R.R. and Adamchuk, C. : Effect of milk constituents on the hydrolysis of lactose from *Kluveromyces fragilis*. *J. Food Sci.*, **45**, 962(1980)

(1990년 4월 27일 접수)