

# 최 종 보 고 서

<p>(뒷면)</p>	<p style="writing-mode: vertical-rl; text-orientation: upright;">과제번호 11111111111111111111</p> <p style="writing-mode: vertical-rl; text-orientation: upright;">기능적 사료첨가제 생산을 위한 신규 <math>\alpha</math>-galactosidase의 고정화</p> <p style="writing-mode: vertical-rl; text-orientation: upright;">남극세균 유래</p> <p style="writing-mode: vertical-rl; text-orientation: upright;">농림수산식품부</p>	<p style="text-align: right;">(앞면)</p> <p>보안과제( ), 일반과제(✓ )      과제번호 111111-1</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 10px auto; width: 80%;"> <p style="text-align: center;">발간등록번호</p> <p style="text-align: center;">11-1541000-001698-01</p> </div> <p style="text-align: center;">← 4.5 cm →      ↑ 2 cm ↓      ↑ 5 cm ↓</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">기능적 사료첨가제 생산을 위한 신규 남극세균 유래 <math>\alpha</math>-galactosidase의 고정화 (Immobilization of <math>\alpha</math>-galactosidase from novel Antarctic bacterial isolate for a functional feed additive production)</p> <p style="text-align: center;">건국대학교 산학협력단</p> <p style="text-align: center;">↑ 9cm ↓</p> <p style="text-align: center;">농림수산식품부</p> <p style="text-align: center;">↑ 4cm ↓</p>
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 80px; margin: 0 auto;"> <p style="text-align: center;">주      의 (편집순서 8)</p> </div> <p style="text-align: center;">(15 포인트 고딕계열)</p> <p style="text-align: center;">↑ 6cm ↓</p>		

# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “기능적 사료첨가제 생산을 위한 신규 남극세균 유래  $\alpha$ -galactosidase의 고  
정화” 과제의 보고서로 제출합니다.

2013년 2월 22일

주관연구기관명 : 건국대학교

주관연구책임자 : 조 재 순

연 구 원 : 박 인 경

연 구 원 : 박 영 지

# 요 약 문

## I. 제 목

기능적 사료첨가제 생산을 위한 신규 납극세균 유래  $\alpha$ -galactosidase의 고정화

## II. 연구개발의 목적

사료 내 항영양성 인자로 작용하는 갈락토올리고당(galactooligosaccharide)의 선택적 이용률을 극대화 할 수 있는 신규 극지 미생물 유래  $\alpha$ -galactosidase의 특성규명 및 고정화(immobilization)된 효소의 적용을 통한 가축사료용 효소제 개발의 가능성 규명

## III. 연구개발 내용

- 극지미생물로부터 신규  $\alpha$ -galactosidase 생산 세균 분리
- 분리된 균주로부터 생산된  $\alpha$ -galactosidase의 효소학적 특성규명
- 고정화시킨  $\alpha$ -galactosidase를 통한 효소학적 특성 규명 및 동물장내 이용가능성 평가
- $\alpha$ -Galactosidase 적용을 통한 원료사료 내 함유된 galactooligosaccharide 분해이용률 평가
- $\alpha$ -Galactosidase와 고정화 효소의 사료 첨가제로서의 실효성 평가

## IV. 연구개발결과

- 납극 토양으로부터  $\alpha$ -galactosidase를 생산하는 균주를 분리하였고, 16S rDNA를 이용한 분석을 통하여 *Bacillus* sp. LX-1으로 명명하였다.
- *Bacillus* sp. LX-1 유래  $\alpha$ -galactosidase의 생산배지 최적화에 있어서, galactose, peptone 그리고  $Mn^{2+}$ 을 첨가 했을 때 효소 생산이 증가 되었다.
- *Bacillus* sp. LX-1 유래  $\alpha$ -galactosidase는 pH 7.0과 40°C에서 최적 활성을 나타내었고, 열안정성에서 0~45°C까지 88% 이상의 활성을 유지하였다. 더불어 이 효소는 Aryl- $\alpha$ -galactosidic 기질에 엄격한 기질 특이성 바탕으로, melibiose, raffinose 그리고 stachyose에 대하여 D-galactose를 생산하였고, 장관내 단백질 분해효소인 trypsin과 pancreatin으로부터 저항성을 나타내었다.
- *Bacillus* sp. LX-1 유래  $\alpha$ -galactosidase는 Eudragit L-100에 고정화 시켰고 약 6회까지 재활용이 가능하였다. 고정화로 인한 pH와 온도의 변화는 없었으며, 18일 동안 상온에서 저장시, 고정화 효소가 고정화 하지 않은 효소보다 저장성이 우수하였다.
- 인공 소화관으로부터, 대두박 첨가시 고정화 효소는 약 16  $\mu$ g/g(대두박)의 D-galactose를 유리 하였고, 고정화 하지 않은 효소는 14  $\mu$ g/g(대두박)의 D-galactose를 유리 하였다.

종합 결론: *Bacillus* sp. LX-1 유래 고정화  $\alpha$ -galactosidase는 식품이나 사료 산업에서 대두의 영양적 가치를 향상 시키는 효과적인 첨가제로서 유능한 효소가 될 수 있음을 보여 주었다.

## V. 연구 성과

○ 논문 게재: Jaekoo Lee, Inkyung Park and Jaiesoon Cho. Production and partial characterization of  $\alpha$ -galactosidase activity from an Antarctic bacterial isolate, *Bacillus* sp. LX-1. African Journal of Biotechnology Vol. 11(60), pp. 12396-12405, 26 July, 2012.

○ 특허 출원: 잠재적 사료첨가제로서 바실러스 sp. LX-1 유래 알파-갈락토시테이즈의 특성 및 효소 생산을 위한 고체발효의 최적화(출원번호 10-2012-0010358)

# SUMMARY

## (영문요약문)

### I. Project title

Immobilization of  $\alpha$ -galactosidase from novel Antarctic bacterial isolate for a functional feed additive production

### II. Project objective

- 1) To characterize  $\alpha$ -galactosidase from an Antarctic bacterial isolate, *Bacillus* sp. LX-1.
- 2) To prepare the immobilized enzyme and compare the properties between the immobilized and free one.
- 3) To potentially improve the nutritional digestibility of animals by applying the immobilized one.

### III. Research results

An Antarctic *Bacillus* sp. isolate was found to exhibit extracellular  $\alpha$ -galactosidase activity. On the basis of the results of 16S rRNA sequencing, the strain was named *Bacillus* sp. LX-1. In a one-factor-at-a-time experiment, galactose, peptone and  $Mn^{2+}$  were found to be the medium components that facilitated enzyme production. The new strain showed optimal  $\alpha$ -galactosidase activity at pH 7.0 and temperature of 40°C. The enzyme exclusively hydrolyzed  $\alpha$ -D-galactosides such as *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -galactopyranoside, melibiose, raffinose and stachyose, and showed no effect with proteases such as trypsin, pancreatin, and pronase. Enzyme activity was almost completely inhibited by the presence of  $Ag^+$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ , and sodium dodecylsulfate (SDS) but was unaffected by  $\beta$ -mercaptoethanol and ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA). The  $\alpha$ -galactosidase was non-covalently immobilized on a reversibly soluble-insoluble polymer, Eudragit L-100, and an immobilization efficiency of 0.93 was obtained. The optimum pH of the free and immobilized enzyme was 6.5–7.0 and 7.0, respectively, while there was no change in optimum temperature between the free and immobilized  $\alpha$ -galactosidase. The immobilized  $\alpha$ -galactosidase was reutilized six times without significant loss in activity. The immobilized enzyme showed good storage stability at 37°C, retaining about 50% of its initial activity even after 18 days at this temperature, while the free enzyme was completely inactivated. Based on *in vitro* digestion analysis, the immobilized enzymes effectively liberated D-galactose from natural substrates such as soybean meal, lupin and palm kernel meal containing  $\alpha$ -galactooligosaccharide.

### IV. Application

The immobilization of  $\alpha$ -galactosidase from *Bacillus* sp. LX-1 on Eudragit L-100 may be a promising candidate as a biocatalyst for soybean processing in food and feed industries.

CONTENTS  
(영 문 목 차)

Chapter 1. Research outline-----	7
A. Description on the objective and the background of the research-----	7
C. Description on the scope of the research-----	11
Chapter 2. Developmental status-----	12
A. Situation in Korea-----	12
B. Worldwide situation-----	12
C. Current research status-----	12
Chapter 3. Materials and method and results-----	12
A. Materials and method-----	12
B. Results-----	18
Chapter 4. Achievement and contribution to the related field-----	34
A. Research objective and achievement-----	34
B. Contribution to the related field-----	34
Chapter 5. Progress and future plans of research results-----	35
A. Progress in research applications-----	35
B. Future plans for research applications-----	36
C. Major technologies developed-----	36
Chapter 6. Oversea information collected during the research-----	37
Chapter 7. References-----	38

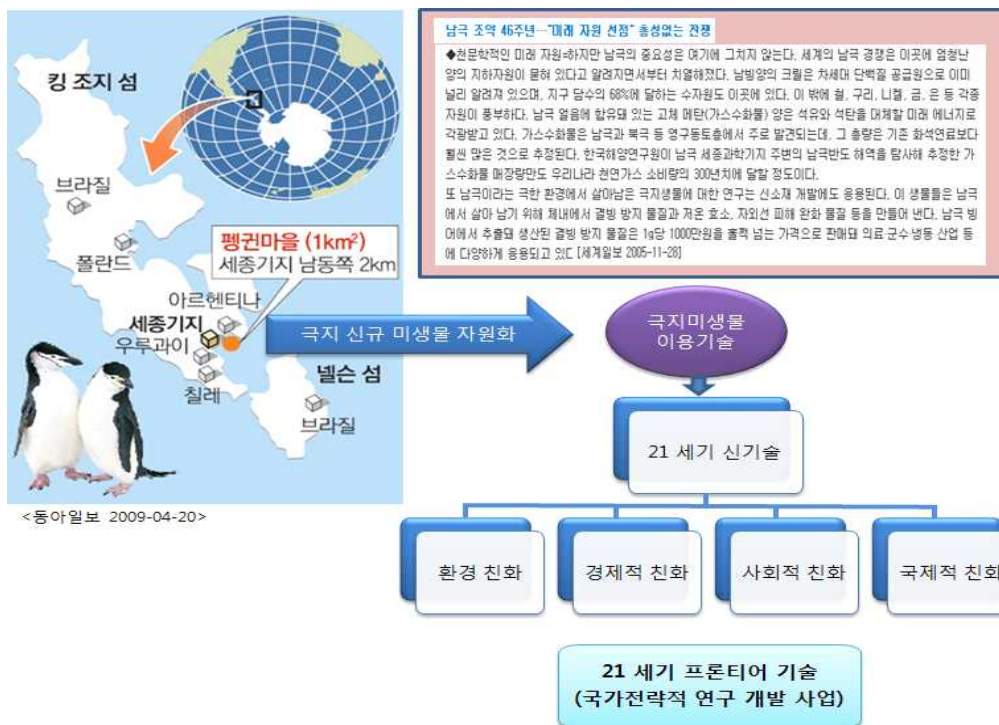
# 목 차

제 1 장 연구 개발 과제의 개요-----	7
1절 연구개발의 목적 및 배경-----	7
2절 연구 개발의 범위-----	11
제 2 장 국내외 기술개발 현황-----	12
1절 국내기술개발 현황-----	12
2절 국외 기술 개발 현황-----	12
3절 연구개발 기술의 국내외 위상-----	12
제 3 장 연구 개발수행 내용 및 결과-----	12
1절 연구 개발 수행 방법-----	12
2절 연구 개발 수행 결과-----	18
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도-----	34
1절 연구개발 목표의 달성도-----	34
2절 연구개발 관련분야에의 기여도-----	34
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획-----	35
1절 연구개발 성과-----	35
2절 연구개발 성과활용 계획-----	36
3절 핵심기술-----	36
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보-----	37
제 7 장 참고문헌-----	38

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 1 절 연구개발의 목적 및 배경

기존의 미생물로부터 분리된 대다수의 α-galactosidase는 실제 사료원료인 대두에 함유되어 있는 항영양성인자로 알려진 small α-galactooligosaccharide (melibiose, raffinose, stachyose 등)기질을 분해함에 있어 상대적으로 이들 기질 뿐만 아니라 비전분성 다당류인 mannan도 분해하는 부정확한(promiscuous) 기질 특이성을 나타낸다. 하지만 본 연구에서 극지 미생물 유래 효소는 기질특이성에 있어서 대두 내 다량 함유된 small α-galactooligosaccharide를 독점적으로 분해하는 ①엄격한(strict) 기질특이성, ②단백질 분해 효소 저항성, 그리고 ③동물의 생리적 중온성 온도와 pH 조건에서 원활한 활성을 보이는 효소 선별에 기존 연구와 차별성을 추구하며, 더불어 효소의 고정화 기술 확립을 통해 단 위동물의 인공 소화관 실험으로 사료원료의 소화율에 미치는 실효성을 규명하는데 의의가 있다. 그러므로, 본 연구의 최종목적은 사료 첨가제로서, 극지미생물 유래 신규 α-galactosidase 및 효소 고정화기술을 적용하여, 사료원료 내에 항영양성 인자로 작용하는 α-galactooligosaccharide를 선택적으로 분해시켜 동물 체내 영양소 이용률 향상을 모색하는데 있다.



[극지 신규 미생물 및 소재 활용의 필요성]

지구상에는 생명체가 서식하기 어렵다고 생각되는 극한 환경이 존재하고 있다. (예: 고온 환경(온천수 및 화산), 엄한 추위의 땅(남극 및 북극대륙), 그리고 염농도가 높거나, pH가



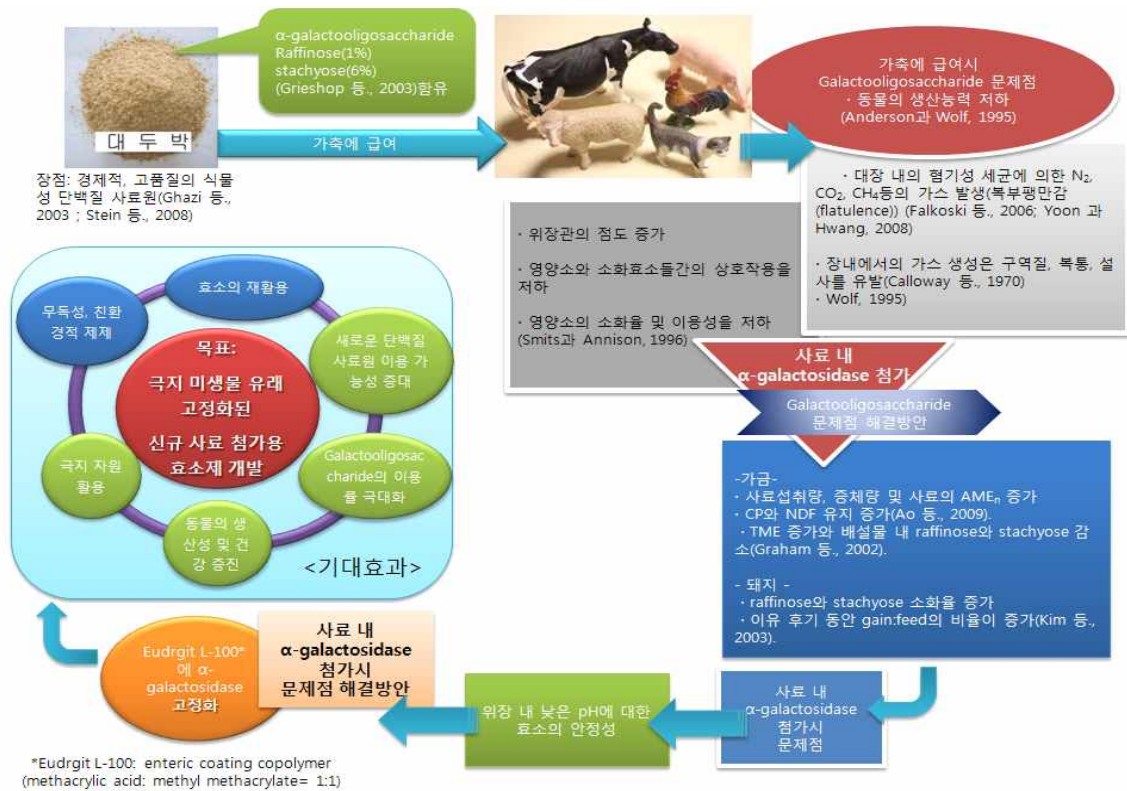
극단적으로 산성 또는 알칼리성으로 편재된 장소) 생명체의 서식이 불가능하다고 생각되는 극한 환경에도 각각의 환경에 적응하여 서식하는 미생물이 분리되어 보고되고 있다.

신규 미생물의 자원화 기술은 극한 환경에 적응하여 생육하는 극한 미생물의 탐색, 분리, 보존 및 체계적인 계통적 분류체계의 구축을 바탕으로 하고 있으며, 극한 미생물 이용 기술은 신규로 탐색 분리된 극한 미생물의 산업적 이용기술을 포함하고 있다. 이러한 기술들은 21세기 신기술의 개념인 환경친화, 경제적 친화, 사회적 친화 및 국제적 친화의 개념이 적극적으로 도입된 21세기 프론티어 기술로 대두되고 있어 국가 전략적 연구개발 사업으로 추진될 필요성이 매우 높다고 판단된다.

극한 미생물에서 유래하는 효소는 일반효소와 달리 구조역학상 안정하여 강산, 강알칼리, 고온, 저온 등에서도 안정한 상태를 유지(Haki 등., 2003; Feller 등., 1994)하는 것으로 보고되어져 왔으며 지금까지 국내외적으로 극한 미생물에 관한 연구의 주요핵심은 바로 극한 미생물이 보유한 극한효소의 산업적 응용에 있다. 특히 초고온성 미생물 분야는 가장 빨리 연구가 진행되고 집중되어 이들 미생물이 생산하는 각종 내열성 효소들, protease, amylase, DNA polymerase, DNA modifying enzyme 등이 현재 산업적으로 널리 이용되고 있다(Haki 등., 2003). 그러나 남극과 북극 같은 환경에서 살아가는 극지미생물들에 관한 연구는 국내외적으로 극히 초기단계로 몇몇 연구자들에 의해 밝혀진 보고에 따르면 현재까지 약 1000여종 미생물이 극지에서 분리되었다(Turkiewiz 등., 2000; Garsoux 등., 2004; Feller 등., 1992). 저온환경인 극지 미생물에서 유래된 효소는 소위 “cold active” 하거나 “cold-adaptive” 한 특성을 가지고 있어서 주로 실제 산업적 응용에 있어서도 저온 환경(0~20℃)에서 효소활성이 가장 우수하며 상대적으로 동물의 장관 내 생리적인 중온성 범위(37~45℃)에서 효소활성이 미약하거나 상실된다(Groudieva 등., 2004; Marx 등., 2007). 그러나 비록 극지 미생물에서 유래한 효소 중에서도 예외적으로 저온성과 특히 장관 내 생리적 중온성 범위에서도 최적의 효소활성을 보여 사료 첨가제로서 이용 될 수 있으며, 그 예로 사료 첨가제로 활용하기 위한 phytase의 경우에서, 가금과 돼지의 생리적 활성 온도가 39℃라 할지라도, 사료 섭취 시 소화관내 발생하는 최초 온도는 낮아지게 되며(Boyce 등., 2006), 이는 20~29℃의 특정 범위에서 높은 활성을 가지는 효소가 산업적 이용에 많은 잠재성을 가질 것이라 보고 했다(Huang 등., 2009). 또한 사료 첨가제로서 잠재적 이용 가능성을 제시한 극지 미생물 유래 xylanase와 amylase에서도 최적 활성이 중온성(25~40℃)을 나타내었다(Park과 Cho, 2010a; Park과 Cho 2010b). 한편 극지미생물에서 유래된 효소는 본질적으로 특성상 저온환경에서 유래되어 효소의 내열성을 발휘할 수는 없지만 그 효소의 사료첨가제로서의 이용에 있어 사료를 먼저 펠렛팅과 같은 가공공정을 거친 후 나중에 액상이나 분말제품의 형태로 혼합하여 가축에게 급여하는 방식으로 이용한다면 내열성 문제를 극복할 수 있으며 다른 관점에서 보면 내열성이 좋은 효소라도 다수의 경우 실제 동물의 생리적인 중온범위 온도환경에서 효소활성이 매우 약하기 때문에 문제점이 있다. 즉 Bacillus의 phytase 경우에 효소활성 최적온도는(70℃)이지만 동물의 생리적 중온범위의 온도(20~40℃)에서는 효소활성이 60~85%의 감소가 일어난다고 보고 되었다(Kim 등., 1998). 이러한 특징은 활용 목적에 따른 가공 공정의 선택으로 극지 미생물 유래의 신규효소가 동물 사료 산업에 다양하게 응용될 수 있음을 나타낸다.

대두박(soybean meal, SBM)은 동물에게 급여하는 고품질의 식물성 단백질 사료원료로 콩으로부터 기름을 짤 때 생기는 부산물이다. SBM은 전 세계에 걸쳐 가금과 가축의 사료

산업에 이용되는 제1의 단백질 자원(Ghazi 등., 2003 ; Stein 등., 2008)으로서 단백질 자원 중 전세계 사용량의 50% 이상을 차지한다(Kohlmeier, 1990). 그러나 가공되지 않은 soybean은 단백질, 기타 다른 미네랄과 같은 영양소의 흡수이용을 저해하는 항영양성 인자들을 포함하고 있는데 대부분의 항영양성 인자들은 열에 불안정하고 soybean에서 SBM로 가공 처리되는 동안에 제거될 수 있다(Liener, 1994). 하지만 SBM는 raffinose, stachyose를 각각 약 1%, 6% 포함(Grieshop 등., 2003)하고 있는데 이와 같은  $\alpha$ -galactooligosaccharide는 SBM로의 가공처리 후에도 여전히 존재한다(Hartwig 등., 1997; Rackis, 1981). 이러한 oligosaccharide는 digesta의 점도를 증가시키고 소장에서 영양소와 소화효소들간의 상호작용을 저하시킴으로서 영양소의 소화율 및 이용성을 저하(Smits과 Annison, 1996)시키기 때문에 동물의 생산능력을 줄일 수 있는 항영양성 인자들로 간주된다(Anderson과 Wolf, 1995). Raffinose, stachyose 등의 galactooligosaccharide는 소화가 되지 않은 상태로 대장에 도달하게 되고, 대장 내의 혐기성 세균에 의해 분해되어  $N_2$ ,  $CO_2$ ,  $CH_4$ 등의 가스가 발생하여 복부팽만감(flatulence)의 원인(Falkoski 등., 2006; Yoon 과 Hwang, 2008)이 되며, 장내에서의 가스 생성은 구역질, 복통, 설사를 야기한다고 보고되고 있다(Calloway 등., 1966).  $\alpha$ -galactosidase는 galactose 잔기를 함유한 melibiose, raffinose, stachyose와 같은 galactooligosaccharide 및 galactolipids, galactomannan의 비환원성 말단으로부터  $\alpha$ -1,6-결합의 D-galactosyl 잔기를 가수분해하는 exo-glycosidase이며, 기질 특이성에 따라 family 36과 family 27 그룹으로 분류된다. family 36 그룹은 오직 pNPGal, melibiose, oligosaccharide와 같은 저분자량의  $\alpha$ -galactosides에 대해서만 특이성을 가지는 반면에 family 27 그룹은 저분자량의  $\alpha$ -galactosides 뿐만 아니라 galactomannan에 대해서도 특이성을 가진다(Wang 등., 2010; Fialho 등., 2008). 또한 항영양성인자를 제거하여 사료 내 영양적 가치를 높이는 효소의 산업적 적용에서 단백질 분해 효소에 대한 저항성도 실효성을 높인데 매우 중요한 기준이 된다(Liu 등., 2009).



## [대두박 내 항영양인자 제거를 위한 α-galactosidase 적용 및 고정화 방안 및 기대 효과]

일반적으로 동물, 식물, 미생물에 널리 존재하지만 미생물 유래의 효소가 산업적으로 응용성이 높다. 하지만 인간을 포함한 단위동물들은 α-galactooligosaccharide에 존재하는 α-galactosidic 결합을 가수분해하는데 필요한 α-galactosidase가 결여되어 있기 때문에 soy product를 소비하는데 있어서 부분적으로 제한되어 있다.

한편 이전 연구 결과들을 고찰해보면 α-galactosidase를 첨가한 사료를 섭취한 가금에서는 사료섭취량, 증체량 및 사료의 nitrogen-corrected apparent metabolizable energy (AME<sub>n</sub>)이 증가하였고 Crude protein (CP)과 neutral detergent fiber (NDF)의 유지가 증가하였다(Ao 등., 2009). 또한 true metabolizable energy (TME)가 증가하고 배설물의 raffinose와 stachyose가 감소되었다고 보고되었다(Graham 등., 2002). 돼지의 경우 raffinose와 stachyose의 소화율을 증가시킴으로써 이유기간의 후기 동안 gain:feed의 비율이 증가되었다는 보고가 있다(Kim 등., 2003).

일반적으로, 산업적 효소는 그들의 pH와 온도 안정성을 강화하고, 최적 pH와 온도에 범위를 증가시키고, 그리고 재활용하기 위함으로, solid support에 고정화(immobilization) 되어 왔다(Rasiah와 Rehm, 2009 ;Tee와 Kaletunç, 2009). 고정화는 효소 분해 과정에 대한 연속적 설비를 수립 할 수 있고, 이는 효소, 노동력 그리고 간접비를 절약하는데 도움을 준다(Tee and Kaletunç, 2009). 지금까지, 주요 선행 연구 결과 중 *Aspergillus niger* (Sardar 등., 2000), *Melanocarpus albomyces* (Roy 등., 2003) 그리고 *Trichoderma reesei* (Dourado 등., 2002)에서 곰팡이 xylanases를 Eudragit L-100에 고정화시킨 보고가 있다. Methacrylic acid과 methyl methacrylate을 1:1비율로 혼합된 Eudragit L-100은 선행연구에서 인간의 대

장질병(colonic diseases)의 치료를 위한 약제의 효과적인 대장내 특이적인 delivery system 으로 그 효과와 안전성이 이미 확보되어(Venkatesh 등., 2009), 인체에 무해한 효과적인 장내 전달 고분자 물질(enteric coating copolymer)로서 널리 이용 되어 왔으며(Dourado 등., 2002; Roy 등., 2003), 특히 Eudragit는 pH 4 이하에서는 불용성이고 pH 5 이상에서는 용해되는 특징을 가지는데, 이 pH에 따른 Eudragit의 용해성으로 인하여 고정화된 효소를 효율적으로 재활용 할 수 있다(Xu 등., 2011). 하지만 Eudragit를 이용한  $\alpha$ -galactosidase의 고정화에 대한 보고는 아직 전무한 실정이다.

## 2 절 연구 개발의 범위

### 1. 가축 사료용 효소제 개발 기술

#### 가. 극지미생물로부터 신규 $\alpha$ -galactosidase 생산 세균 분리

- (1) 극지토양으로부터  $\alpha$ -galactosidase 효소생산 세균의 탐색 및 선별
- (2) 선별된  $\alpha$ -galactosidase 효소생산세균의 분류학적 동정

#### 나. 분리된 균주로부터 생산된 $\alpha$ -galactosidase의 효소학적 특성규명

- (1) 선별균주로부터 생산된  $\alpha$ -galactosidase의 효소활성 탐색
- (2)  $\alpha$ -Galactosidase 효소생산 세균으로부터 효소의 partial purification
- (3)  $\alpha$ -Galactosidase의 생화학적 특성 규명

### 2. 효소 고정화 기술 및 microencapsulation/delivery system 개발기술

#### 가. 고정화시킨 $\alpha$ -galactosidase를 통한 효소학적 특성 규명 및 동물 장내 이용 가능성 평가

- (1) Eudragit L-100을 이용하여 고정화 시킨  $\alpha$ -galactosidase의 특성 및 인공 장액 내 효소 활성을 free form  $\alpha$ -galactosidase와 비교 분석

#### 나. $\alpha$ -galactosidase와 고정화 효소의 사료 첨가제로서의 실효성 평가

- (1) 단위 동물의 인공 소화관을 설계하여 사료원료인 대두박, 루핀 그리고 팜박을 투여하고, 고정화 또는 고정화 되지 않은 효소를 공급하여 방출된 D-galactose 함량으로 소화율을 비교 평가한다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 1 절 국내 기술 개발 현황

위장관용 고정화(Immobilization) 기술 개발은 일반화된 방법은 아니며, 인체 의약품 분야에서 주로 시도 되어 왔었다. 따라서 이 기술에 대한 축산 분야에 대한 이용사례는 동물 약품 산업에서 소수의 시도가 있었으며, 사료 첨가제에 대한 부분은 거의 전무하다.

### 2 절 국외 기술 개발 현황

표2-1은 국외에 다양한 고정화 재료를 사용하여  $\alpha$ -galactosidase를 고정화 시켜 효소를 안정화 하거나, 재활용, 그리고 식품 또는 사료에 대한 난분해성 영양소의 분해 능력을 증가 시키려한 시도를 나타내고 있다.

표 2-1. 국외에서 시도한  $\alpha$ -galactosidase의 고정화 개발

고정체	연도	국가	목적
galactotose-polymeric beads	2010	Turkey	안정성
tetraethylortosilicate (TEOS)	2010	Bulgaria	고정화 시도
cyanogen bromide agarose	2008	Spain	안정성
polyacrylamide gel	2002	India	재활용, 분해능
chitosan bead	1987	Japan	저장성, 분해능
mycelia	1982	USA	안정성

### 3 절 연구개발 기술의 국내 외 위상

고정화 재료로 Eudragit를 사용한 기술은 xylanase (Roy 등., 2003), lipase (Rodrigues 등., 2002), amylase (Ertan 등., 2006) 등에서는 시도가 여러 차례 있어 왔지만 축산분야에 활용 하기 위하여 Eudragit를 이용한  $\alpha$ -galactosidase 고정화는 국내외를 통틀어 본 과제가 처음 실시 하였다.

## 제 3 장 연구 개발 수행 내용 및 결과

### 1 절 연구 개발 수행 방법

#### 1. 가축 사료용 효소제 개발 기술 수행 방법

##### 가. 극지 토양 자원 미생물의 확보

한국해양연구원 부설 극지연구소의 극지바이오센터(Korea Polar Research Institute, KOPRI)의 협조를 받아 남극세종기지 주변의 현화식물이 자라는 지역 근처의 유기물

토양으로부터 배양·분리된 미생물 균락들을 분양받았다. 분양받은 미생물 균락은 본 연구의  $\alpha$ -galactosidase를 생산하는 미생물 분리를 위한 시료로 이용하였다.

#### 나. $\alpha$ -Galactosidase 생산 균주 분리 및 배양조건

분양받은 균락을 0.2% lactose가 포함된 Luria Bertani (LB) [1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, pH 7.2] 배지에 접종하고 28°C 진탕배양기(shaking incubator)에서 4일 동안 220 rpm의 속도로 진탕 배양하였다. 균체가 성장함을 배지의 혼탁도로 확인한 후 표본을 채취하여 순차 희석 후  $1 \times 10^0 \sim 1 \times 10^{-6}$ 농도의 표본을 0.2% lactose와  $32 \mu\text{g/ml}$  농도의 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\alpha$ -D-galactopyranoside (X- $\alpha$ -Gal, Sigma)이 첨가된 LB 평판배지에 도말한 후 28°C incubator에서 2일간 배양하여 과란색을 나타내는 균주를 분리하였다. 분리된 균주의 균락을 위와 같은 LB평판배지에 streaking 방법으로 3회 계대 배양하여 순수 분리하였다(Goulas 등., 2009).

#### 다. 분리 균주의 분류학적 동정

분리균의 16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 통해 균주를 동정하였다. 균주의 16S rRNA 유전자 서열분석을 위해 FastDNA kit (Qbiogene)을 사용하여 분리균주로부터 genomic DNA를 추출한 다음 polymerase chain reaction (PCR)을 수행하여 16S rRNA 유전자를 증폭하였다. PCR을 위한 primer는 27F (5'-AGAGTTTGGATCCTGGCTCAG-3')와 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')을 사용하였다(William 등., 1991). 증폭된 단편은 ABI PRISM 3730 XL DNA analyzer (Applied Biosystems)을 이용하여 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열은 NCBI의 GenBank database에 등록된 정보를 대상으로 BLAST 프로그램을 이용하여 상동성 검사를 실시하였다. 계통 분석은 CLUSTAL W 프로그램을 이용하여 정렬하였다(Thompson 등., 1994). Maximum Composite Likelihood method와 GenBank database에 등록된 *Bacillus*속 균주들의 16S rRNA 유전자 염기서열 정보를 이용하여 염기서열간의 유전적 거리를 계산하였고, MEGA 4.0 프로그램을 사용하여 phylogenic tree를 그렸다(Tamura 등., 2004; Tamura 등., 2007).

#### 라. 뉴클레오타이드 염기서열 기탁번호

16S rRNA 뉴클레오타이드 염기서열은 HQ660811로 Genbank database에 기탁하였다.

#### 마. $\alpha$ -Galactosidase 생산배지 조성의 최적화

배지성분의 최적화를 위해 다른 모든 요소들을 일정수준으로 고정시키고 하나의 요소만 변화시켜 실험하는 one factor at a time (OFAT) 방법을 이용하여(Liu 등., 2007),  $\alpha$ -galactosidase 생산에 효과적인 배지성분을 선별하는 실험을 수행하였다.

$\alpha$ -galactosidase 생산을 위한 배지 조성을 찾기 위하여, 탄소원(1% galactose, 2% galactose,

1% wheat bran 그리고 2% wheat bran), 질소원(1% yeast extract, 1% tryptone, 1% soybean meal, 1% peptone 그리고 1% ammonium sulfate), 그리고 미네랄 요소(1% NaCl, 0.01% CaCl<sub>2</sub>, 0.01% MgSO<sub>4</sub>, 0.07% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.001% MnSO<sub>4</sub> 과 0.001% FeSO<sub>4</sub>) 들이 실험 되었다. 배지성분의 최적화를 위해 다른 모든 요소들을 일정수준으로 고정시키고 하나의 요소만 변화시켜 실험하는 one factor at a time (OFAT) 방법을 이용하여(Liu 등., 2007), α-galactosidase 생산에 효과적인 배지성분을 선별하는 실험을 수행하였다. 이 데이터는 평균± 표준오차로 값을 나타내었고, 그들의 유의성은 Student's *t*-test로 검증하였다.

#### 바. α-Galactosidase 생산 및 효소액의 부분 정제

0.2% lactose가 포함된 1 L의 LB 배지를 제조 후, 2개의 2 L Erlenmeyer flask에 각각 500 mL 분주 후 autoclave 한다. 그런 다음 순수 분리된 균락을 배지에 접종 후, 28°C 진탕 배양기에서 96 시간 동안 220 rpm의 속도로 진탕 배양한 후 저온(4°C)에서 10,000 × g, 20 분간 원심분리하여 배양 상등액을 얻었다. 그런 다음 배양 상등액에 50% ammonium sulfate를 첨가하고 6 시간 동안 magnetic stirrer에서 일정 속도로 교반한 후 다시 원심분리(10,000 × g; 30 min; 4°C)하여 침전물을 얻었다. 이 후에 침전물을 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)에 녹이고 동일 buffer에 12 시간 동안 투석하여 효소액 (enzyme preparation)을 제조하였다. 모든 과정은 4°C에서 수행하였고, 이 효소액은 효소특성에 관한 실험에 사용하였다.

#### 사. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel 전기영동(SDS-PAGE) 및 zymogram 분석

부분정제된 효소액의 SDS-PAGE는 Xcell II 과 NuPAGE Novex 4에서 12 % Bis-Tris gel (Invitrogen)을 사용하여 제조사의 설정대로 실행하였다. 이렇게 분리된 단백질들은 Simply Blue Safe Stain (Invitrogen)으로 염색 후 gel 속에 나타내었다. 또 한편으로는 이 조효소액을 6.5% non-denaturing polyacrylamide gel에 투입하여 Modular Mini-Protein II Electrophoresis System (Bio-Rad)를 이용하여 4°C에서 50 V 전압으로 5~6 시간 동안 전기영동을 실시하였다. 전기영동 후에, gel을 4 mg/ml X-α-Gal이 포함된 1.5% bacto agar plate에 얹고 40°C에서 12 시간 배양하였다. α-galactosidase의 활성은 파란색의 띠가 나타나는 것을 통해 확인하였다.

#### 아. α-galactosidase 활성 측정 및 기질 특이성

α-galactosidase의 활성 측정시 *p*-nitrophenyl-α-D-galactopyranoside (*p*NPG)를 기질로 이용하여 측정하였다. 1 mM *p*NPG와 50 mM Na-phosphate buffer (pH 7.0)를 포함한 반응액에 최종 반응부피가 1 mL가 되도록 효소를 첨가하고 40°C에서 15 분간 반응시킨 후 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>용액 1 mL를 첨가하여 반응을 종결시켰으며, 발색현상은 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성은 *p*-nitrophenol (*p*NP) 표준곡선으로부터 산출하였다. 다른 기질에 대한 α-galactosidase 활성을 조사하기 위하여 nitrophenyl-conjugated glycoside 기질인

*p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-galactopyranoside, *p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-xylopyranoside, *p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-cellobioside, *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside, *o*-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside 및 *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -L-arabinofuranoside를 각각 1 mM의 농도로 첨가하고 최적 pH (7.0)와 온도 (40°C) 조건 하에서 각 기질에 대한 효소의 활성을 측정하였다. 모든 기질에 대하여, 정량적 효소활성 단위 1 U은 상기 조건에서 반응시간(분)당 기질로부터 1  $\mu$ mol의 *p*-nitrophenol 또는 *o*-nitrophenol을 유리시키는 효소의 양으로 정의하였다(Patil 등., 2010).

또한 melibiose, raffinose, stachyose, lactose와 같은 natural 기질을 1 mM 농도로 첨가하고 최적 pH (7.0)와 온도(40°C) 조건 하에서 3시간 동안 반응시킨 후 galactose test kit (Boehringer Mannheim GmbH)을 사용하여 기질로부터 유리된 D-galactose양을 kit에 명시된 메뉴얼에 의해 측정하고 효소 활성을 계산하였다. 이 때 정량적 효소활성 단위 1 U은 상기 조건에서 반응시간(분)당 기질로부터 1  $\mu$ mol의 galactose를 유리시키는 효소의 양으로 정의하였다.

carboxymethylcellulose (CMC), xylan, mannan, starch 등과 같은 saccharogenic 기질은 dinitrosalicylic acid (DNS) 법으로 최적조건 하에서 효소 활성을 측정하였다(Miller, 1959). 기질의 농도는 0.4% 였으며, 효소활성 단위 1 U은 상기 조건에서 반응시간(분)당 기질로부터 1  $\mu$ mol의 환원당을 유리시키는 효소의 양으로 정의하였다(Park 과 Cho, 2010a; Park 과 Cho, 2010b).

자.  $\alpha$ -Galactosidase 활성에 미치는 pH와 온도의 영향

$\alpha$ -Galactosidase의 활성에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위하여, 반응 온도 40°C에서 pH 3.0부터 pH 8.5까지의 범위로  $\alpha$ -galactosidase의 활성을 측정하였다. pH 3.0은 50 mM glycine-HCl buffer, pH 4.0~5.5의 범위에서는 50 mM sodium acetate buffer, pH 6.0~7.0에서는 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4~8.5에서는 50 mM Tris-HCl buffer를 각각 사용하였다. 또한 활성에 미치는 반응 온도의 영향을 조사하기 위하여 조효소액 5  $\mu$ l에 10 mM *p*NPG 용액 100 $\mu$ l와 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) 800  $\mu$ l를 넣어 효소 반응온도 0~70°C까지의 범위에서 각각 효소 활성을 측정한 후 상대적 활성으로 나타내었다.

차. 열 안정성

$\alpha$ -galactosidase의 열 안정성을 조사하기 위하여 조효소액을 40~70°C까지 각각의 온도에서 30 분간 방치한 후 온도(40°C)와 pH (7.0)조건 하에서 효소 활성을 측정하였다.

카.  $\alpha$ -galactosidase 활성에 미치는 금속이온 및 화학물질

$\alpha$ -galactosidase 활성에 미치는 금속이온과 화학물질의 영향을 조사하기 위하여 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{K}^{+}$ ,  $\text{Na}^{+}$ ,  $\text{Ag}^{+}$ ,  $\beta$ -mercaptoethanol, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), sodium dodecyl sulfate (SDS) 및 phenylmethylsulfo



nyl fluoride (PMSF)가 포함된 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)에 조효소액을 첨가하고 25°C에서 20 분간 배양한 후, 표준조건(pH 7.0, 40°C) 하에서 효소활성을 측정하였다.

다. 단백질을 분해효소에 대한  $\alpha$ -galactosidase의 저항성

$\alpha$ -Galactosidase의 단백질을 분해효소에 대한 저항성을 조사하기 위하여 Cao 법(Cao 등., 2010)을 약간 변형하여 수행하였다. 단백질을 분해효소는 trypsin (Sigma), pronase (Sigma), pancreatin (Sigma), subtilisin carlsberg (Sigma) 및 proteinase K (Sigma)를 사용하였다. 조효소액(9  $\mu$ g)과 단백질을 분해효소(0.9  $\mu$ g)의 단백질을 양을 bradford 법(Bradford, 1976)으로 측정 한 후, 10:1 비율로 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)에 첨가하여 37°C에서 30 분간 배양한 후 표준조건(pH 7.0, 40°C) 하에서 효소활성을 측정하여 상대적 활성으로 나타내었다.

## 2. 효소고정화 기술 및 microencapsulation/delivery system 개발 기술 수행 방법

### 가. Eudragit L-100

Eudragit L-100은 methacrylic acid와 methylmethacrylate가 1:1 비율로 혼합된 copolymer로서 Rohm Pharma (Weiterstadt, Germany)에서 생산된 것을 이용하였다.

### 나. 조효소 액(free $\alpha$ -galactosidase)의 조제

250 ml 삼각 플라스크 속에 1% galactose을 함유한 25 ml Luria-Bertani (LB) 배지 조제하여  $\alpha$ -galactosidase을 생산하는 *Bacillus* sp. LX-1을 접종하여 28°C에서 24 시간 동안 호기 배양 하였다. 그 후, 2 L의 삼각 플라스크에 같은 배지 1 L 2개를 조제하여 앞에서 배양한 용액 10 ml (1% v/v)를 각각 접종하여 220 rpm으로 교반하면서, 28°C에서 48 시간 호기 배양 하였다. 배양이 끝난 후,  $\alpha$ -galactosidase가 함유된 배양액을 10,000  $\times$  g, 20 분 동안 4°C에서 원심 분리하여, 상등액을 수집하였다. 그 다음 배양 상등액에 ammonium sulfate (75% 포화)를 첨가하고 6 시간 동안 magnetic stirrer에서 일정 속도로 교반한 후 다시 원심분리(10,000  $\times$  g, 30 min; 4°C)하여 침전물을 얻었다. 이 후에 침전물을 25 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)에 녹이고 동일 buffer에 12 시간 동안 투석하여 조효소액(crude enzyme)을 제조하였다. 모든 과정은 4°C에서 수행하였고, 이 조효소액은 효소특성에 관한 실험에 사용하였다.

### 다. Eudragit L-100을 이용한 $\alpha$ -galactosidase 고정화 및 수율

#### (1) 2% Eudragit L-100 용액 제조

눈금이 있는 50 ml tube에 파우더 형태의 Eudragit L-100 1g과 증류수 40 ml을 첨가하여 교반 시켰다. 교반 중 3M NaOH로 pH 11까지 맞추어 완전히 용해시켰다. 용해 후 3M Acetic acid로 pH 7까지 맞추고 증류수를 50 ml 눈금까지 첨가하여, 이용 시까지 4°C에서 보관하였다(Roy 등., 2003).

#### (2) 고정화 효소 제조 및 수율

2% Eudragit L-100 용액 0.75 ml과  $\alpha$ -galactosidase 조효소액을 0.1~2.0 ml 범위에서 혼합하여 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)로 전체 부피를 5.0 ml로 일정하게 만들었다. 상온에서 1시간 교반 시키고, 3 M acetic acid로 pH 4로 맞춘 후 20 분간 상온에서 정치하였고, 정치후, 12,000×g에서 20분간 원심분리하여 상층액은 모으고 펠렛은 10 mM sodium acetate (pH 4.0) 4 ml로 효소 활성이 없을 때 까지 약 3회 세척하였다. 세척액은 따로 모으고 펠렛은 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) 5 ml 첨가 하여 용해시켜 고정화 효소를 제작하였다. 효소에 활성은 고정화 효소, 상층액 그리고 세척액에서 측정하였으며 수율을 구하는 공식은 식 1과 같다.

$$\text{수율} = \frac{\text{고정화 효소 활성}}{\text{이론적 효소 활성} - (\text{상층액 효소 활성} + \text{세척액 효소 활성})} \quad (\text{식 1})$$

#### 라. 고정화된 효소의 측정

조효소액 활성 측정 방법과 같으며 조효소액 대신 고정화된 효소를 이용하였다.

#### 마. 고정화 효소의 재활용도

고정화된  $\alpha$ -galactosidase 재활용도는 고정화 과정을 여러회(5~10회) 반복 실시하여 매회 효소활성을 측정하여 재활용정도를 평가하였다. 이 때 효소 활성 측정은 50 mM sodium phosphate (pH 7.0)에서 1 mM pNPG와 함께 효소 최적 온도인 40°C에서 15분간 유지하여 가수분해를 유도하였고, 3 M acetic acid 0.2 ml를 첨가(pH 4)하여 고정화 효소를 침전시켜 원심분리(12,000 × g, 20 분)하여 펠렛과 상등액을 분리하였다. 그리고 상등액 1.0 ml에 NaCO<sub>3</sub> 1.0 ml를 첨가하여 O.D. 405 nm 효소활성을 측정하였다. 또한 펠렛 부분은 50 mM sodium phosphate (pH 7.0) 5.0 ml를 첨가하여 용해 시켜 두 번째 재활용에 이용하였고, 이후에는 앞에서 설명한 방법을 반복적으로 실시하여 재활용도를 평가 하였다.

#### 바. 고정화 효소의 최적 pH

고정화 효소와 조효소액에 대하여 pH 3~8.5 범위에서 효소 활성을 측정하였다. 이때 사용한 완충 용액으로는 모두 50 mM을 기준으로 glycine-HCl (pH 3), sodium acetate (pH 4~5.5), sodium phosphate (pH 6~7), 그리고 Tris-HCl (pH 7.4~8.5)을 30°C에서 이용 하였다.

#### 사. 고정화 효소의 최적 온도

고정화 효소와 조효소액에 대하여 0~80°C 범위에서 효소 활성을 측정하였다. 이 때 50 mM sodium phosphate pH 7.0을 기준으로 효소 활성을 측정 하였다.

#### 아. 고정화 효소의 저장성

고정화 효소와 조효소액에 대하여 37°C에서 18일 동안 저장하면서 일정기간 효소 활성을 측정하여 저장성을 측정하였다.

자. 고정화 효소의 인공 소화관내 소화율

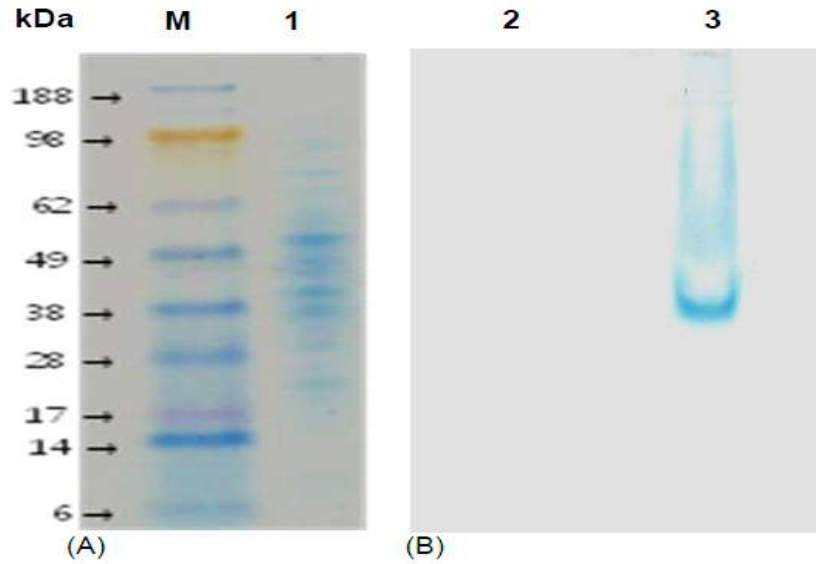
Boisen 등(1997)에 의한 방법을 변형 시켜 측정하였다. 사료 샘플(대부박, 팜박, 루핀) 0.5 g을 125 ml 삼각 플라스크에 넣은 후 고정화 효소와 조효소액을 각각 약 200 U/사료 kg을 첨가 하였다. 그 후 0.1 M sodium phosphate (pH 6.0) 25 ml을 투여한 후 0.2 M HCl을 이용하여 pH 5.0으로 낮추었다. 이 때 1 ml pepsin solution (0.025 g/ml)을 첨가 하였고 39°C에서 2시간 동안 배양 하였다. 배양 후 0.2 M sodium phosphate (pH 6.8) 10 ml을 투여 하였고 0.6 M NaCl을 이용하여 pH를 약 7.0정도로 증가 시켰다. 여기에 1 ml pancreatin (0.1 g/ml)과 0.1 g oxgall (0.3% v/v)을 첨가 하여 다시 39°C에서 4시간 배양 후 원심 분리하여 상층액속에 있는 유리된 D-galactose의 양을 galactose test kit (Boehringer Mannheim GmbH)으로 측정하여 고정화 효소와 조효소액의 분해 능력을 조사하였다.

## 2 절 연구 개발 수행 결과

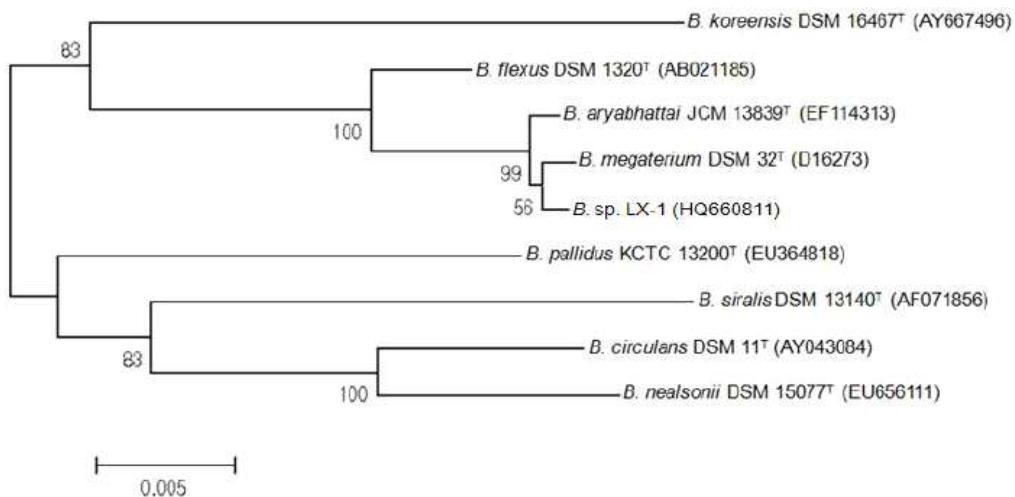
### 1. 가축 사료용 효소제 개발 기술 수행 결과

가. 균주의 분리 및 동정

$\alpha$ -Galactosidase 활성 (Figure 3-1)을 나타내는 분리된 균주(LX-1)를 동정과 계통적 유연 관계를 조사하기 위하여, 16S rRNA gene 으로부터 1446 bp의 염기서열을 결정하여 계통수를 작성하였으며, 그 결과는 Figure 3-2에 나타내었다. NCBI의 BLAST search 결과, 분리균인 LX-1은 *Bacillus megaterium*과 가장 가까웠으며, 이로 미루어 LX-1은 *Bacillus* sp.의 한 종으로 판단된다. MEGA 4.0 프로그램을 사용하여 GenBank상에 등록된 *Bacillus* sp.의 type strain들과의 비교결과 LX-1은 유연관계가 가장 가까운 *Bacillus megaterium* DSM 32<sup>T</sup>와 99.4%의 상동성을 보였다. 이를 근거로 본 연구에서 분리한 균주는 *Bacillus* sp. LX-1로 명명하였으며, 16S rRNA gene의 염기서열은 GenBank database에 Accession No. HQ660811로 등록되었다.



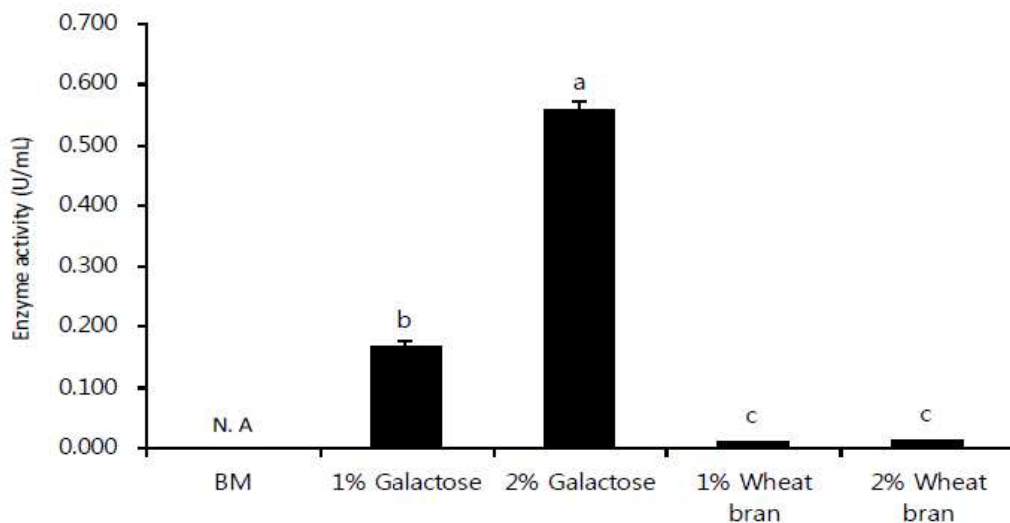
**Figure 3-1.** SDS-PAGE (A) of partially purified enzyme and zymogram analysis, (B) showing  $\alpha$ -galactosidase activity on a non-denaturing electrophoretic gel. Lane M, Seeblue plus2 pre-stained standard (Invitrogen); Lane 1, partially purified enzyme; lane 2, bovine serum albumin (negative control); lane 3, LX-1  $\alpha$ -galactosidase.



**Figure 3-2.** Phylogenetic tree constructed using 16S rRNA sequences of *Bacillus sp.* LX-1 and eight other *Bacillus* strains. Bootstrap values (based on 1,000 trials and only values more than 50%) are shown at the nodes. The GenBank accession numbers are indicated with parentheses. *Bar*, 5-base substitutions per 1,000 nucleotide positions.

나. α-Galactosidase 생산에 대한 탄소원의 영향

α-Galactosidase 생산에 미치는 탄소원의 영향은 Figure 3-3에 나타내었다. 탄소원으로 2% galactose를 첨가 하였을 때, 가장 높은 α-galactosidase 생산(0.558 ± 0.014 U/ml)을 관찰 하였다. *Aspergillus parasiticus* MTCC2796을 이용한 이전 연구에서도 galactose가 α-galactosidase 생산을 위한 가장 좋은 탄소원임을 나타내었다(Shivam 등., 2009). 이 LX-1 균주는 탄소원으로 wheat bran을 기질로 사용 되었을 때 적은 α-galactosidase 생산을 나타내었다. 그러나, *Aspergillus foetidus* ZU-G1 경우에는 같은 기질에서 최대의 α-galactosidase 활성을 나타내었다(Liu 등., 2007). 그러므로 미생물 균주 마다 α-galactosidase 생산은 기질 특이성을 갖는 것을 알 수 있었다.

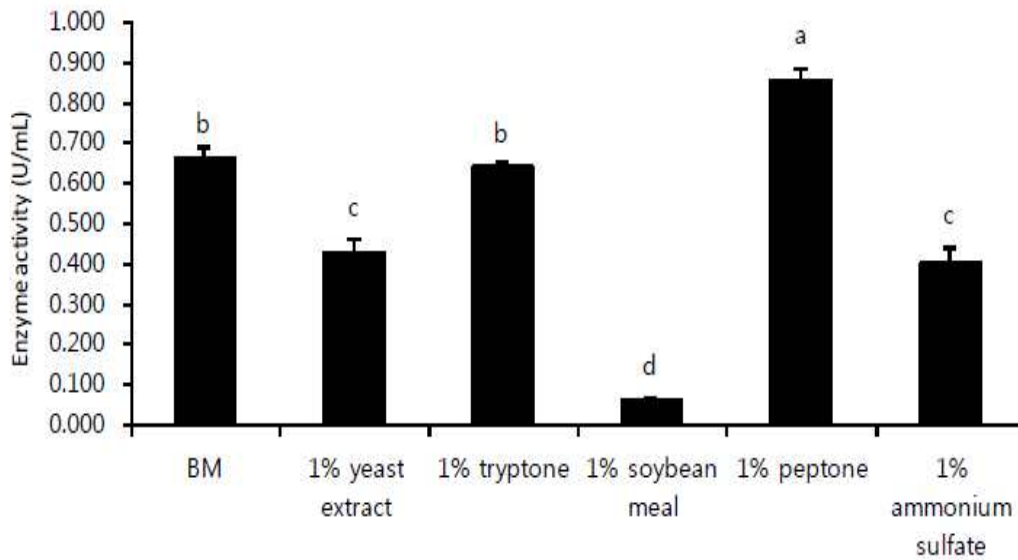


**Figure 3-3.** Effect of carbon sources on α-galactosidase production by *Bacillus* sp. LX-1. The basal medium (BM) is composed of 0.5% yeast extract, 1% tryptone, 1% NaCl, 0.01% CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.01% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.07% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.001% MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O, and 0.001% FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (initial pH, 7.0; culture time, 24 h). N.A: no activity. Data were expressed as mean ± standard errors from three experiments. Values with unlike lower case letter differ (P < 0.05).

다. α-Galactosidase 생산에 대한 질소원의 영향

0.5% yeast extract와 1% tryptone이 존재하는 기본 배지에, 추가적으로 각각 1% tryptone, yeast extract, ammonium sulfate [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] 또는 대두박 첨가는 α-galactosidase 생산을 높이거나 낮추었는데(Figure 3-4), 이중 대두박은 효소활성 대부분을 억제 하였고, peptone을 첨가는 α-galactosidase 생산을 유의하게 증가 시켰다(Figure 3-4). 이것은 Liu 등(2007)이 보고한 *Aspergillus foetidus* ZU-G1을 이용하여 α-galactosidase를 생산 하였을 때, 대두박 농도에 따라

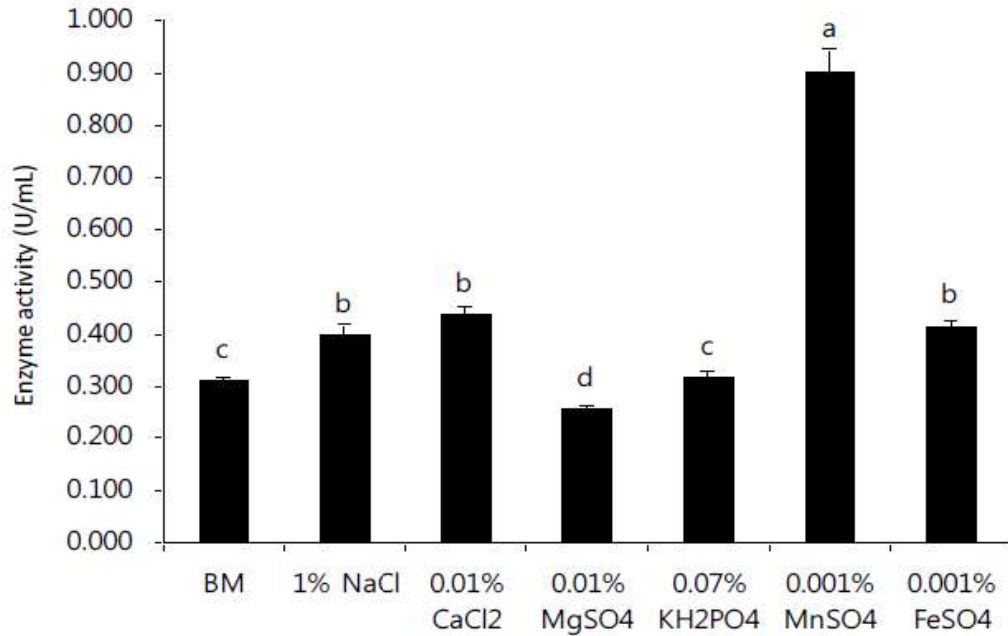
증가한 결과는 상반 되는 것이었다.



**Figure 3-4.** Effect of additional nitrogen sources on  $\alpha$ -galactosidase production by *Bacillus* sp. LX-1. The basal medium (BM) is composed of 2% galactose, 0.5% yeast extract, 1% tryptone, 1% NaCl, 0.01%  $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.01%  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.07%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.001%  $\text{MnSO}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , and 0.001%  $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (initial pH, 7.0; culture time, 24 h). Data were expressed as mean  $\pm$  standard errors from three experiments. Values with unlike lower case letter differ ( $P < 0.05$ ).

라.  $\alpha$ -Galactosidase 생산에 대한 광물질의 영향

실험한 광물질 중에는  $\text{MnSO}_4$ 가 가장 뛰어난  $\alpha$ -galactosidase 생산을 증가 시켰으며,  $\text{MgSO}_4$ 만이 효소 생산을 약간 감소 시켰으며, 나머지 NaCl,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  또는  $\text{FeSO}_4$ 는 효소 생산에 뛰어난 효과는 나타내지 않았다(Figure 3-5).



**Figure 3-5.** Effect of essential elements on  $\alpha$ -galactosidase production by *Bacillus* sp. LX-1. The basal medium (BM) is composed of 2% galactose, 0.5% yeast extract, 1% tryptone, and 1% peptone (initial pH, 7.0; culture time, 24 h). Data were expressed as mean  $\pm$  standard errors from three experiments. Values with unlike lower case letter differ ( $P < 0.05$ ).

#### 마. $\alpha$ -Galactosidase 활성에 미치는 pH의 영향

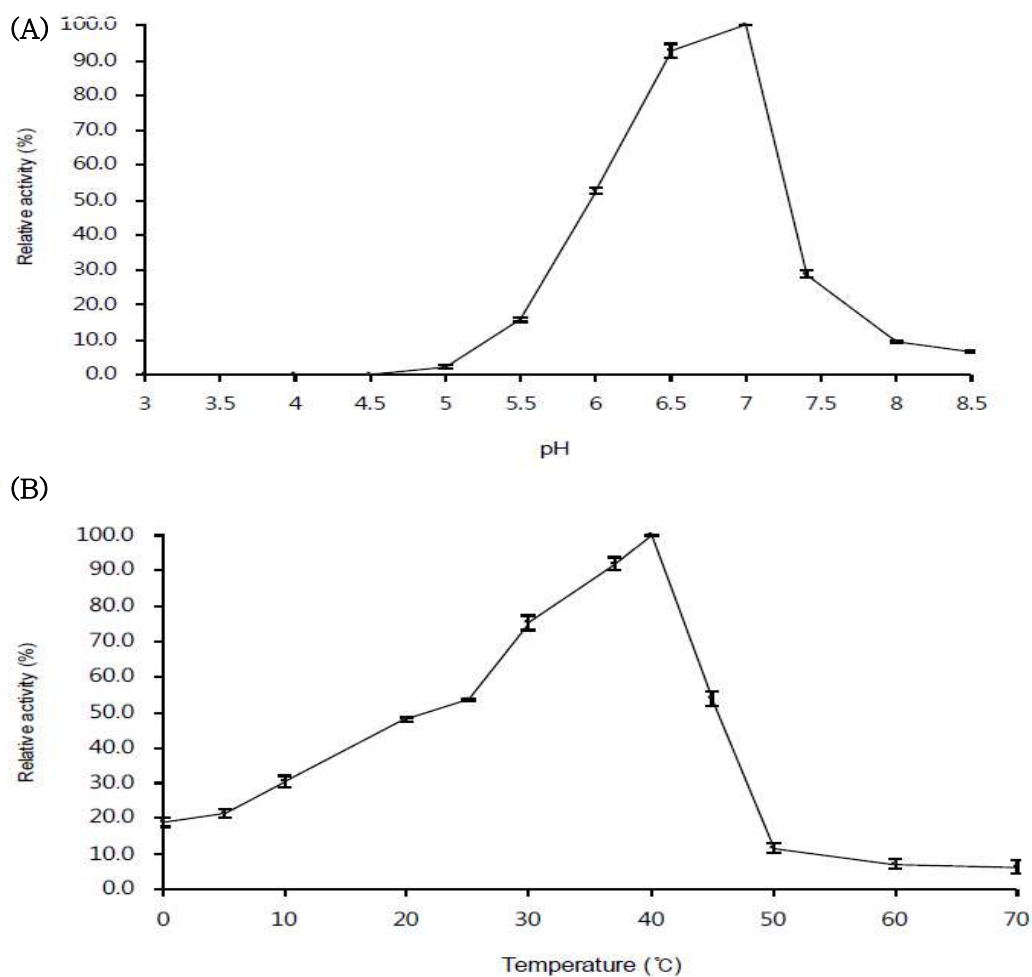
Figure 3-6A에 나타난 것처럼, 최대 효소 활성은 pH 7.0에서 관찰 되었다. 그리고 최대 효소 활성의 50% 이상이 pH 6.0~7.0 사이에서 나타내었다. 그러나 산성의 조건인 pH 3~5에서는 효소 활성이 관찰되지 않았다. 일반적으로 박테리아  $\alpha$ -galactosidase에 대한 최적 pH는 약간의 알칼리성을 나타내지만, 곰팡이와 효모에 대한 효소는 산성을 나타내었다(Patil 등., 2010). 또한 산성 pH 4.0에서 젖산균인 *Leuconostoc mesenteriodes* JK55와 *Streptomyces griseoloalbus* 는  $\alpha$ -galactosidase 최대 효소의 90과 70%의 활성을 각각 나타내었다(Yoon과 Hwang, 2008; Anisha 등., 2009). 더불어, 두유의 pH는 중성(pH 6.2~6.4)범위지만 pH가 낮아지면 대두단백(soy protein)의 침전이 발생하고 신맛이 나게 되므로 산성의  $\alpha$ -galactosidase는 두유의 가수분해에 적당하지 않다(Patil 등., 2010). 따라서 *Bacillus* sp. LX-1 유래  $\alpha$ -galactosidase는 pH 7.0에서 최대의 활성을 보이므로 두유에 존재하는  $\alpha$ -galactooligosaccharide의 가수분해에 있어서 적당하다고 판단된다. 또한 동물의 장내 환경(pH 6.0~7.0)에서도 활성능력을 상실하지 않고 사료첨가제로서의 기능을 할 수 있을 것으로 보인다.

#### 바. 온도 변화에 따른 $\alpha$ -galactosidase 활성 및 열 안정성

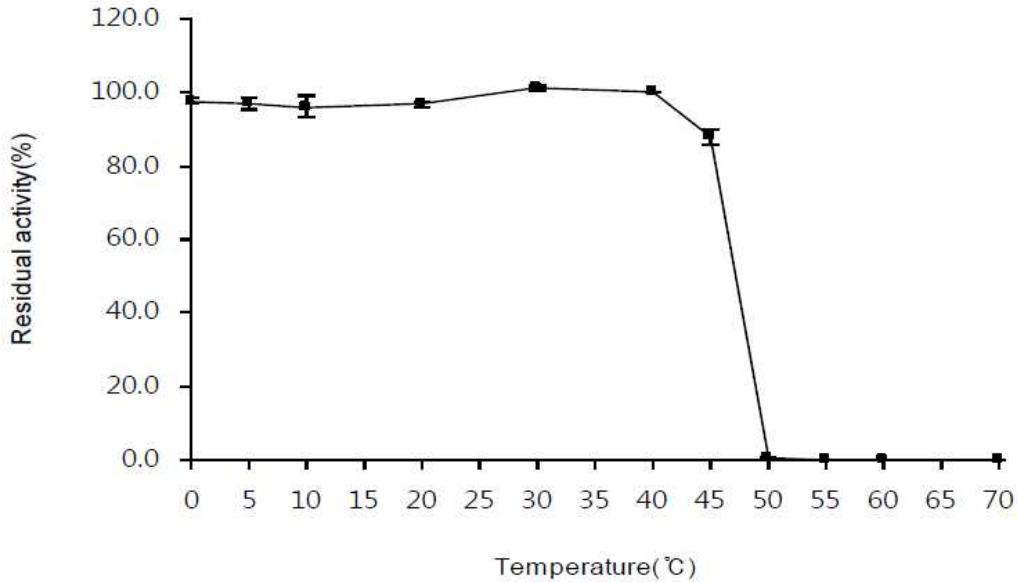
온도 변화에 따른  $\alpha$ -galactosidase 활성 결과는 Figure 3-6B에서 보는 것과 같다. 40°C에서 최대의 활성을 보였으며, 25~45°C 범위에서 최대 활성의 50% 이상을 유지하였다. 그러나 50°C 이상의 고온에서는 효소활성이 불활성화 되었다. 열 안정성을 조사하기 위해 0~70°C 범위에서 조효소

액을 30 분간 방치한 후 잔존활성을 측정한 결과 45°C에서 약 88%의 활성이 유지되었지만, 50°C 이상의 고온에서는 효소활성이 완전히 상실되었다(Figure 3-7). 중온성 미생물에 대한 오염을 보다 낮추고 보다 높은 온도에 대하여 증가된 반응 속도 때문에 효소의 열 안정성은 산업적 적용에 있어서 이점이 된다(King 등., 2002; patil 등., 2010). 그러나 열안정성이 있는 효소가 산업적인 적용에 있어서 항상 바람직하지는 않다(King 등., 2002). 예를 들어 두유의 영양적 그리고 감각적 특성을 향상 시키기 위하여, 종종 25~45°C 범위에서  $\alpha$ -galactosidase 활성을 나타내는 젓산균을 이용하여 두유의 발효가 수행된다(Yoon 과 Hwang, 2008). 또한 사료산업에 이용되는 경우에는 가금이나 돼지와 같은 단위 동물의 생리적인 온도가 37에서 40°C이지만 사료로서 효소를 포함한 사료의 온도는 보다 더 낮고 사료 공급후, 소화 초기 단계는 더욱 낮아지게 된다(Boyce와 Walsh, 2006). 따라서 LX-1  $\alpha$ -galactosidase는 식품과 사료 산업에서 대두박 처리 과정에 적당한 효소가 될 수 있음을 나타내었다.





**Figure 3-6.** Optimal pH (A) and temperature (B) activity profiles. (A) Relative activity at 40°C and various pH levels, where 100% equates to  $1.55 \pm 0.037$  U/ml; (B) relative activity at pH 7 and various temperatures, where 100% equates to  $1.57 \pm 0.012$  U/ml. The assays were performed at a final concentration of 1 mM *p*-NP- $\alpha$ -galactopyranoside. Data were expressed as mean  $\pm$  standard errors from three experiments.



**Figure 3-7.** Thermal stability of LX-1  $\alpha$ -galactosidase activity. One hundred percent of the residual activity equates to  $1.544 \pm 0.053$  U/ml. Data were expressed as mean  $\pm$  standard errors from three experiments.

사.  $\alpha$ -Galactosidase 활성에 대한 금속이온 및 화학물질의 영향

다양한 금속 이온과 화학물질에 대한 LX-1  $\alpha$ -galactosidase 활성이 Table 3-1에 나타내었다. 이 효소는  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  금속에 의해 효소활성이 매우 강력하게 저해되었다. 이것은 이전에 보고된 *Bacillus megaterium* (Patil 등., 2010), *Aspergillus terreus* (Falkoski 등., 2006), 그리고 *Penicillium griseoroseum* (Falkoski 등., 2009) 유래  $\alpha$ -galactosidase의 결과와 일치하였다.

몇몇  $\alpha$ -galactosidase에서  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ 와 같은 sulfhydryl reactive 금속이온들은 활성부위에 존재하는 cysteine 잔기와 결합하여 기질과 효소의 상호작용을 방해하였다(Wang 등., 2010). 이 효소 활성은  $\text{Zn}^{2+}$ 과  $\text{Ni}^{2+}$  존재 하에서 각각 효소활성이 48%, 63% 감소하였다. 반면에 *figal Bispora* sp. 유래  $\alpha$ -galactosidase의 활성은  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  그리고  $\text{Cu}^{2+}$ 에 의하여 약간 상승하였다(Wang 등., 2010). 그러나  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  그리고  $\text{K}^+$  존재 하에서는 효소활성의 변화가 거의 나타나지 않았다. 또한 LX-1 유래  $\alpha$ -galactosidase는 음이온성 계면활성제인 SDS에 의해 강력하게 저해되었으며, 이는 효소 구조의 붕괴로 효소 기능을 완전하게 잃어버림을 알 수 있었다(Falkoski 등., 2006). 이황화 결합을 끊는  $\beta$ -mercaptoethanol과 chelating agent인 EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)는 효소활성에 거의 영향을 주지 않는 것으로 보아 LX-1 유래  $\alpha$ -galactosidase는 활성부위에 이황화 결합이 존재하지 않고 효소 활성시 금속이온을 필요로 하는 금속효소(metalloenzyme)가 아닌 것으로 판단된다(Viana 등., 2006). 부수적으로 serine protease 저해제로 알려진 PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride)에 의해 부분적으로 저해되는 경향을 보였다(Hutadilok-Towatana 등., 1999).

**Table 3-1.** Effect of metal ions and chemicals on LX-1  $\alpha$ -galactosidase activity

Reagent <sup>a</sup>	Relative activity (%) <sup>b</sup>
No addition	100.0
Ca <sup>2+</sup>	92.3±1.8
Co <sup>2+</sup>	79.2±3.1
Fe <sup>2+</sup>	81.1±4.3
Mg <sup>2+</sup>	98.4±4.0
Mn <sup>2+</sup>	95.8±4.1
Ba <sup>2+</sup>	100.0±0.3
Cu <sup>2+</sup>	3.6±0.6
Zn <sup>2+</sup>	52.1±2.1
Ni <sup>2+</sup>	37.1±1.7
Hg <sup>2+</sup>	0.7±0.7
K <sup>+</sup>	103.8±2.7
Na <sup>+</sup>	101.0±1.9
Ag <sup>+</sup>	0.0
$\beta$ -mercaptoethanol	98.5±2.1
EDTA	103.5±0.7
SDS	2.9±0.7
PMSF	82.3±0.9

<sup>a</sup>The final concentration of each reagent was 2 mM in the assay buffer.

<sup>b</sup>The activity in the absence of all reagents was considered 100%, which equates to  $1.626 \pm 0.029$  U/ml. Data were expressed as mean  $\pm$  standard errors from three experiments.

#### 아. 기질 특이성

Table 3-2에 나타낸 것처럼, 이 효소는 *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -galactopyranoside인 합성 aryl- $\alpha$ -galactosidic 기질에 대하여 엄격한 특이성을 나타내었다. 그러나 maltose, lactose 그리고  $\beta$  결합 또는 arabinose와 glucose 잔기를 가진 합성 기질과 같은 기질은 거의 분해하지 않았다. 또한 데이터에서 나타내지 않았지만 이 효소는 CMC, xylan, galactomannan (locust bean gum) 그리고 starch와 같은 polysaccharide을 가수분해 할 수 없었다. melibiose, raffinose, 그리고 stachyose와 같은 galactooligosaccharide들 중에서, melibiose가 가장 우수하게 분해되었다. 이와 유사한 효과는 *Penicillium* sp. 23 (Varbanets 등., 2001)과 *B. stearrowthermophilus* (Talbot와 Sygusch, 1990) 유래  $\alpha$ -galactosidase에서 관찰 되었다. 일반적으로, 대부분의  $\alpha$ -galactosidase는 raffinose는 빠르게 그리고 stachyose는 느리게 분해를 한다(Ishiguro 등., 2001). 더불어, family 27 계열의  $\alpha$ -galactosidase는 손상되지 않은 galactomannan polymer로부터 galactose의 유리를 촉진 할 수 있지만, family 36 계열의 기질 특이성은 raffinose와 stachyose 같은 작은 oligosaccharides에 제한되어진다(Wang 등., 2010). 따라서, LX-1 유래  $\alpha$ -galactosidase는 family 36 그룹에 속하는 것으로 보인다.

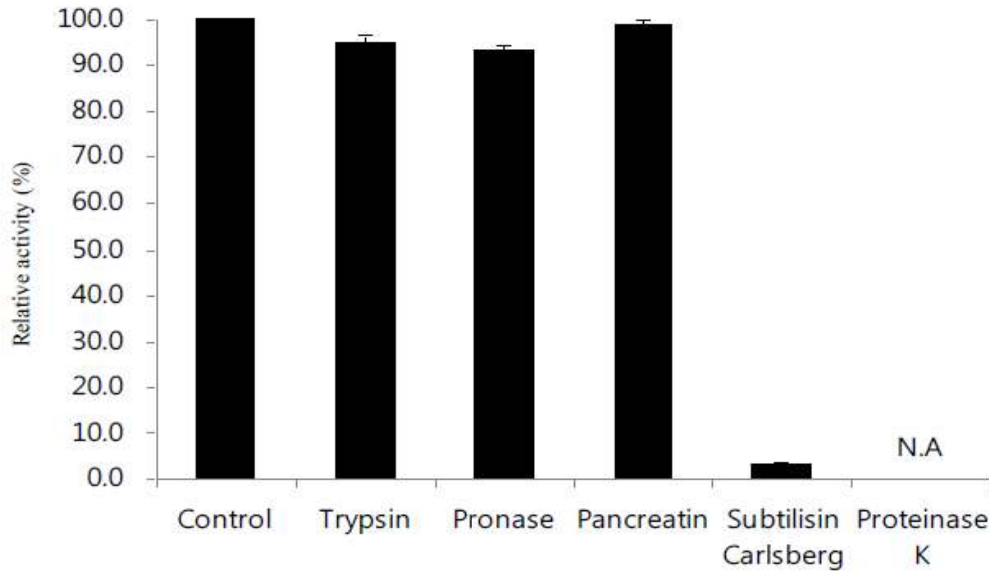
**Table 3-2.** Substrate specificity of LX-1  $\alpha$ -galactosidase

Substrates	Concentration	Enzyme activity (U/ml)
<i>p</i> -nitrophenyl- $\alpha$ -D-galactopyranoside	1 mM	1.622 $\pm$ 0.063
<i>o</i> -nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside	1 mM	0.036 $\pm$ 0.010
Raffinose	1 mM	1.384 $\pm$ 0.073
Melibiose	1 mM	14.563 $\pm$ 0.146
Stachyose	1 mM	1.777 $\pm$ 0.064

Data were expressed as mean  $\pm$  standard errors from three experiments. No activity was detected on the substrates such as *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside, *p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-xylopyranoside, *p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-cellobioside, *o*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-galactopyranoside, *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -L-arabinofuranoside, lactose, CMC, xylan (birchwood), galactomannan (locust bean gum), starch and maltose

자.  $\alpha$ -Galactosidase 활성에 미치는 단백질분해효소의 영향

LX-1 유래  $\alpha$ -galactosidase의 단백질분해효소에 대한 저항성은 Figure 3-8에 나타내었다. 효소활성은 배양 30분 후에 proteinase K와 subtilisin carlsberg에 의해 완전히 저해되었다. 반면에 trypsin, pronase, pancreatin 처리 시 저해 효과가 거의 없었다. 이것은 단백질 가수분해의 공격으로부터 사료첨가 효소의 감수성이 어떤 효소의 불활성의 비율과 부위를 밝혀내는데 도움을 줄 수 있기에 중요하다. 추가적으로, *Rhizomucor miehei*의 RmGal36 와 *Rhizopus* sp. F78 ACCC30795의 Aga-F78 같은  $\alpha$ -galactosidase들은 trypsin에 저항성이 있다고 발견되었다(Cao 등., 2009; Katrolia 등., 2012). 한편, *Streptomyces* sp. S27 유래  $\alpha$ -galactosidase는 30 분 trypsin 처리 후, 50%의 효소 활성을 잃었다(Cao 등., 2010).



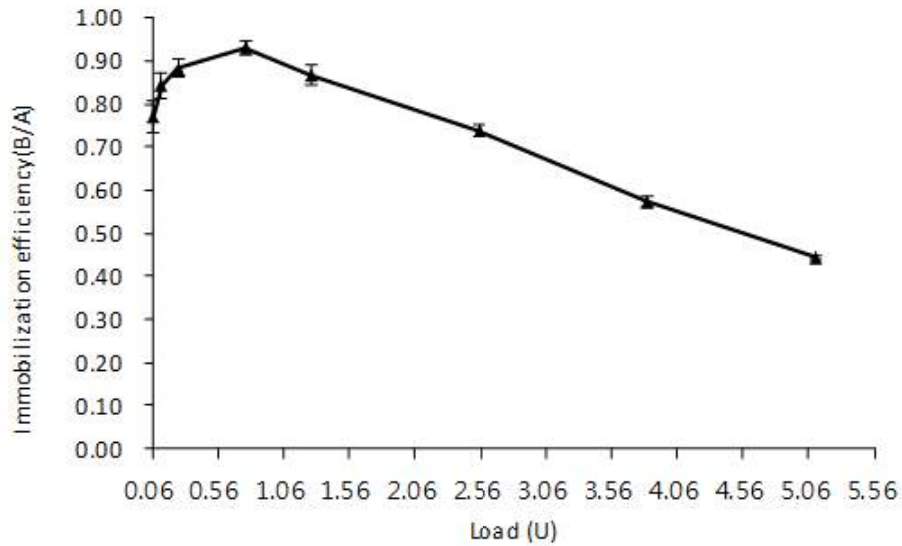
**Figure 3-8.** Effect of proteases on LX-1  $\alpha$ -galactosidase activity. The activity of protease-untreated control was defined as 100%, which equates to  $1.678 \pm 0.008$  U/ml. N.A: no activity. Data were expressed as mean  $\pm$  standard errors from three experiments.

따라서 가축 사료용 효소제 개발 기술 수행 결과 LX-1 유래  $\alpha$ -galactosidase는 식품이나 사료 산업에서 대두 처리과정 중에 매우 유용한 촉매제가 될 것이다. 그러한 이유는 LX-1 유래  $\alpha$ -galactosidase가 생리적으로 적절한 그리고 이용하기 알맞은 온도와 pH에 최적의 효소 활성을 가지고, trypsin과 pancreatin 같은 장관내 단백질 분해효소에 대하여 좋은 안정성을 가졌기 때문이다.

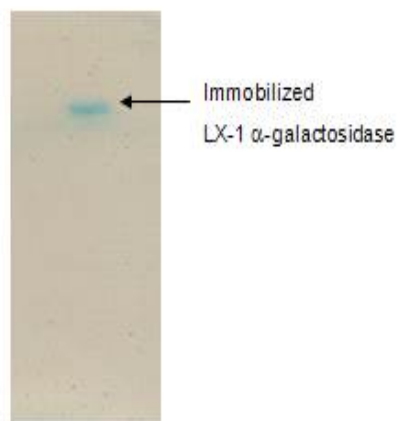
## 2. 효소고정화 기술 및 microencapsulation/delivery system 개발 기술 수행 결과

### 가. LX-1 유래 $\alpha$ -galactosidase의 고정화 및 수율

값이 싸고, 취급이 용이 하며, 수용성이고 단백질을 비공유적으로 결합 하는 특징을 지닌 Eudragit L-100을 이용하여 LX-1 유래  $\alpha$ -galactosidase를 고정화 하였다(Gaur 등., 2005). 0.77 U의 효소를 주입하여 고정화를 시도 하였을 때 0.93으로 최대 고정화 효율을 나타내었다 (Figure 3-9). 최대 효율을 넘어 효소량을 증가시키면 고정화 효율은 감소 하였고, 이는 일반적으로 Eudragit 표면적에 효소의 과잉이 원인이 된다(Sardar 등., 2000; Roy 등., 2003). 한편 Falkoski 등(2009)의 보고에 의하면, *Penicillium griseoroseum* 유래  $\alpha$ -galactosidase를 glutaldehyde 연결을 이용한 silica gel에 고정화를 시도하였고, 이때 최적 고정화 효율은 0.55 정도에 불과 하였다. Figure 3-10은 고정화된 효소의 활성을 X- $\alpha$ -gal 분해를 이용하여 나타내었다.



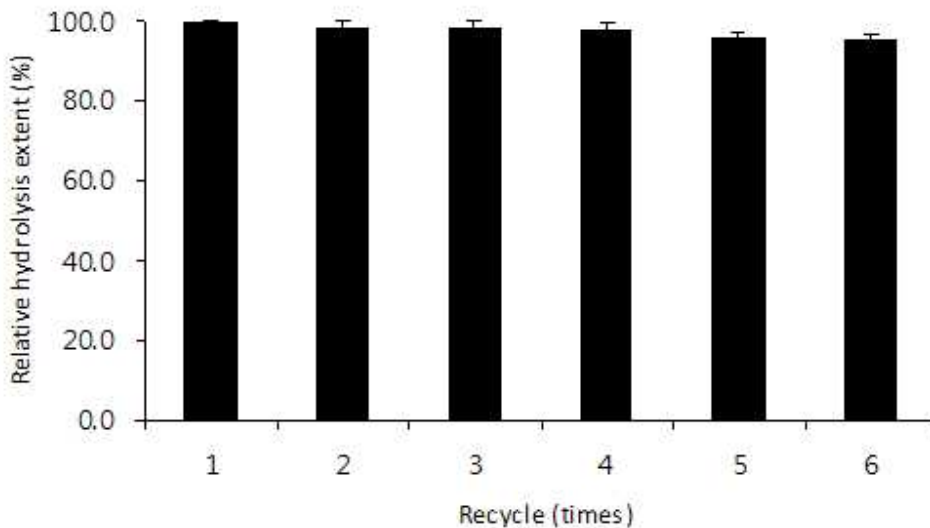
**Figure 3-9.** Immobilization of LX-1  $\alpha$ -galactosidase on Eudragit L-100. “A” represents the amount of enzyme theoretically bound to the matrix. This is calculated by subtracting the unbound activity in the supernatant from initially added enzyme. “B” represents the expressed activity of the particular immobilized preparation, measured after incubating the immobilized enzyme with the substrate. Data were expressed as mean  $\pm$  standard error from three experiments.



**Figure 3-10.** Zymogram analysis of  $\alpha$ -galactosidase activity in the immobilized enzyme.

#### 나. 고정화 효소의 재활용성

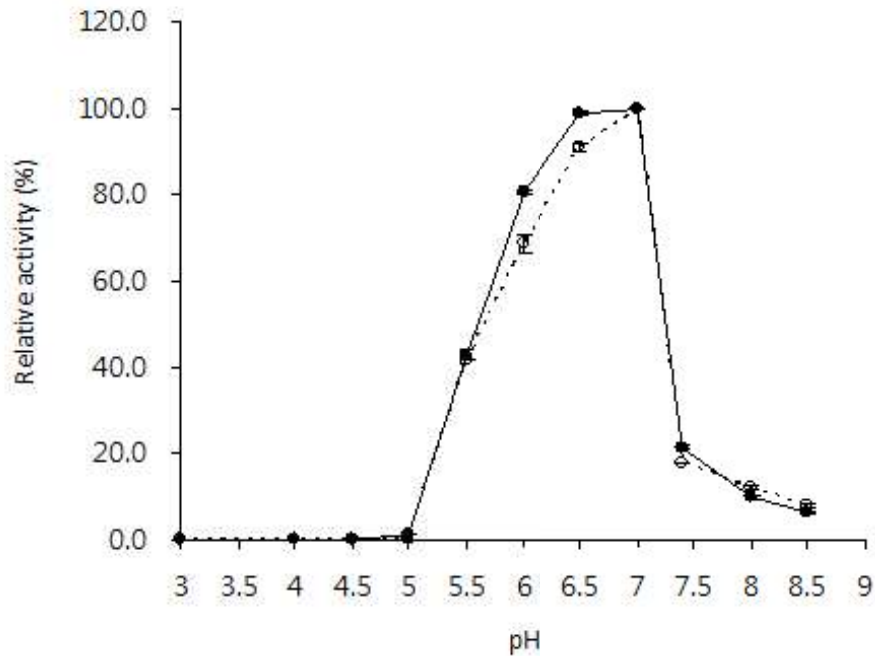
고정화 물질로서 Eudragit L-100의 장점은 중성 pH에서 수용액 상태로 있다가 pH 4.0 이하에서 불용성으로 바뀌어 침전 하며, 이를 이용하여 효소를 회수 할 수 있고, 다시 재활용 할 수 있다는 점이다(Roy 등., 2003; Gaur 등., 2005). 고정화된 효소의 재활용성은 반복된 배치 또는 연속적인 처리 과정 중에서 이용되어 경제적으로 매우 중요하게 활용 될 수있다(Bayraktar 등., 2011). Figure 3-11에서 나타낸 것처럼, 재활용성 측정 시 pH 4.0까지 낮추어 회수함에도 불구하고, 고정화된 LX-1 유래  $\alpha$ -galactosidase는 그 활성의 손실 없이 6회 까지 재활용이 가능함을 나타내었다. Eudragit을 이용하여 고정화된 다른 효소들(Gaur 등., 2005; Silva 등., 2006; Zhang 등., 2010)의 효소 회수 과정에서 빈번하게 이용되는 이 산성의 처리 과정은 LX-1 유래  $\alpha$ -galactosidase 활성에 부정적인 영향을 미치지 않았다. 이것은 Eudragit L-100에 *Aspergillus niger* 유래 xylanase 고정화는 pH 4.0와 5.5에 번갈아 노출 된 효소에 안정성을 이끌었다는 이전의 연구 보고와 연관 지을 수 있을 것이다(Sardar 등., 2000).



**Figure 3-11.** Reusability of the immobilized LX-1  $\alpha$ -galactosidase. Data were expressed as mean  $\pm$  standard error from three experiments.

#### 다. 조효소와 고정화 효소 활성에 pH가 미치는 영향

Figure 3-12에서 나타낸 것처럼, LX-1 유래된 효소의 최적 pH는 조효소의 경우에는 6.5~7.0이고, 고정화 효소에서는 7.0 이었다. 고정화된 효소에서 pH 변화는 아주 일반적이지만 (Thippeswamy와 Mulimani, 2002; Sanjay와 Sugunan, 2005; Bora 등., 2005), Eudragit L-100 과 Eudragit S-100 처럼 수용성과 불용성을 가역적으로 할 수 있는 polymer에 효소의 고정화는 최적 pH 활성에 미비한 영향을 미친다(Ai 등., 2005). 예를 들어, Eudragit L100으로 고정화 시킨 *Aspergillus niger*와 *Scytalidium thermophilum* 유래 xylanase는 최적 pH가 변화가 없거나 약간만 변화 되었다(Sardar 등., 2000; Gaur 등., 2005). 더불어, galactose를 함유한 polymeric bead에 고정화된 토마토  $\alpha$ -galactosidase와 고정화되지 않은 효소에 pH는 4.0으로 동일하였다(Okutucu 등., 2010).

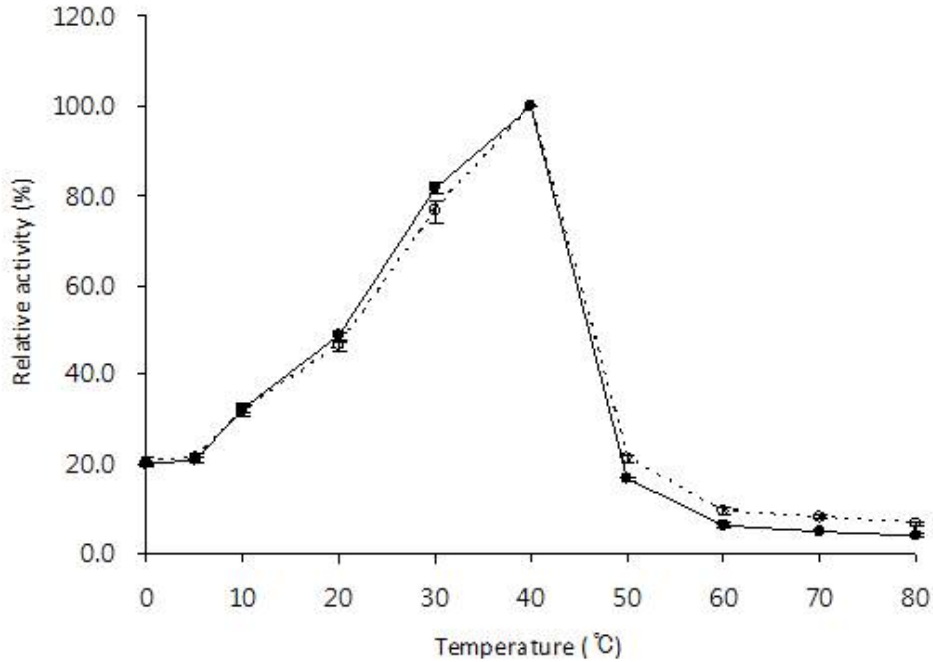


**Figure 3-12.** Effect of pH on LX-1  $\alpha$ -galactosidase activity. Data were expressed as mean  $\pm$  standard error from three experiments. Immobilized enzyme (open circle with dotted line); Free enzyme (closed circle with solid line).

라. 조효소와 고정화 효소 활성화에 온도가 미치는 영향

LX-1 유래 조효소와 고정화 효소에 대한 최적 온도는 모두 40°C를 나타내었다(Figure 3-13). 고정화는 이 효소의 최적 온도에 영향을 미치지 않았으며, 또한 이러한 현상은 Eudragit S-100에 고정화 된 상업적 protease 인 Esperase (Silva 등., 2006), silica gel에 고정화 시킨 *Penicillium griseoroseum* 유래  $\alpha$ -galactosidase (Falkoski 등., 2009) 그리고 galactose를 함유한 polymeric bead에 고정화 시킨 토마토  $\alpha$ -galactosidase (Okutucu 등., 2010)에서 관찰 되었다. 그러나, Eudragit S-100에 고정화 된 *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 유래 xylanase는 고정화 되지 않은 효소가 최적 온도가 60°C를 나타내었지만 고정화 후에는 65°C로 조금 이동되었다(Ai 등., 2005).

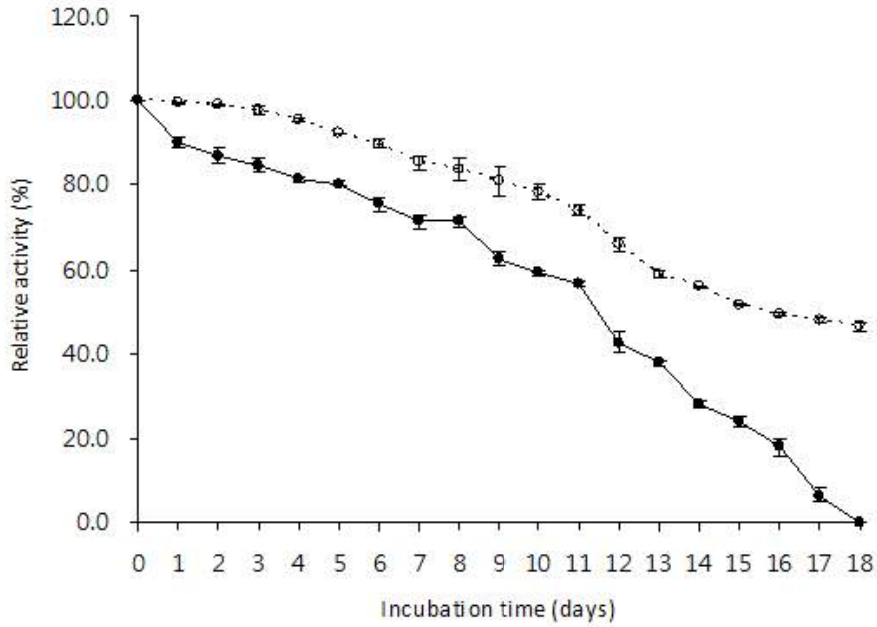




**Figure 3-13.** Effect of temperature on LX-1  $\alpha$ -galactosidase activity. Data were expressed as mean  $\pm$  standard error from three experiments. Immobilized enzyme (open circle with dotted line); Free enzyme (closed circle with solid line).

#### 마. 조효소와 고정화 효소의 저장 안정성

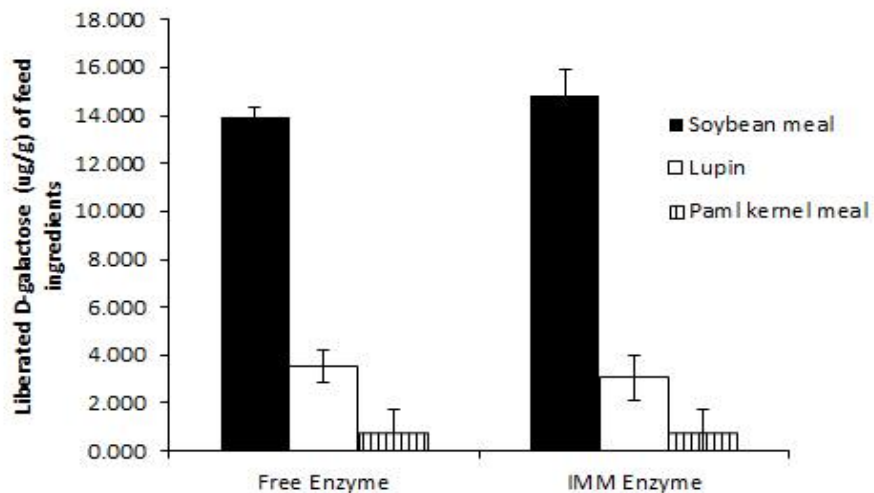
일반적으로, 효소액은 저장성에 안정적이지 않으며, 시간이 지남에 따라 활성은 서서히 감소하게 된다(Bayraktar 등., 2011). 실질적인 관점에서, 동물 사료에 첨가할 목적을 가진 효소는 상온에서 우수한 저장성의 보유가 중요한 기준이 된다(Francesch와 Perez-Vendrell, 1997; Sulabo 등., 2011). Figure 3-14에 나타난 것처럼, 37°C에서 저장 안정성이 고정화를 통하여 향상 될 수 있다. 고정화된 효소의 향상된 안정성은 자가분해(autolysis)의 방어와 연관 지을 수 있을 것이다(Sharma 등., 2003). 더불어, 고정화 효소의 저장 안정성은 고정화 방법과 저장 조건에 따라 다양하게 적용 될 수 있다(Onal과 Telefoncu, 2003; Celem과 Onal, 2009; Okutucu 등., 2010).



**Figure 3-14.** Storage stability of free and immobilized LX-1  $\alpha$ -galactosidase at 37°C. Data were expressed as mean  $\pm$  standard error from three experiments. Immobilized enzyme (open circle with dotted line); Free enzyme (closed circle with solid line).

바. 조효소와 고정화 효소의 *in vitro* 소화율

조효소와 고정화 효소의 *in vitro* 소화율을 Figure 3-15에 나타내었다. 대두박에서 조효소에 비하여 고정화 효소에서 D-galactose 함량이 조금 높았고, 루핀과 팜박에서는 조효소 활성과 고정화 효소의 활성이 매우 유사 하여 고정화가 효소 활성에 부정적인 영향을 미치지 않음을 알 수 있다.



**Figure 3-15.** *In vitro* digestion rate of free and immobilization enzyme for feed additives.

결과적으로 요즘, 최신의 사료 생산기법은 생명공학적인 방법을 필요로 한다. 따라서 Eudragit L-100으로 *Bacillus* sp. LX-1 유래  $\alpha$ -galactosidase 고정화는 내구성 있는 효소와 우수한 저장 안정성에 기인하여 사료 산업에서 대두박이나 다른 콩과 원료에 있는 raffinose와 stachyose 같은  $\alpha$ -galactooligosaccharides를 제거하여 에너지 이용성과 사료효율을 증가시킬 수 있는 선점적인 전략이 될 것이다(Suarez 등., 1999; Vila와 Mascarell, 1999).

## 제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도

### 1 절 연구개발 목표의 달성도

연구목표	달성도 (%)	연구범위
1. 가축 사료용 효소제 개발 기술 가능성 규명	100%	○ 극지미생물로부터 신규 $\alpha$ -galactosidase 생산 세균 분리 ○ 분리된 균주로부터 생산된 $\alpha$ -galactosidase의 효소학적 특성규명
2. 효소고정화 기술 및 microencapsulation/delivery system 개발기술	100%	○ 고정화시킨 $\alpha$ -galactosidase의 효소학적 특성 규명 및 동물 장내 이용 가능성 평가 ○ $\alpha$ -Galactosidase와 고정화 효소의 사료 첨가제로서의 실효성 평가

### 2 절 연구개발 관련분야에의 기여도

#### 1. 기술적 측면

- 가. 극지미생물로부터 생산된 신규 효소의 사료첨가용 효소제 개발 기술과 고정화 기술 방안에 대한 정보 (다양한 극지미생물 유래의 물질 연구 촉진, 신규 극지미생물 탐색기술 신속화)
- 나. 응용연구로 유전자 조작기술, 단백질공학기술의 획기적인 발전(신개발된 기술에 의한 효소의 대량생산, 재활용 및 안정화)
- 다. 값비싼 공정을 요구하는 의약 및 바이오산업의 단점 극복
- 라. 효소 이용 공정은 인류가 요구하는 무공해, 저에너지 공정
- 마. 기술의 활용범위 확대

#### 2. 경제, 산업적 측면

- 가. 극지미생물로부터 개발된 신규효소제제가 산업화될 경우 관련업계의 시장 매출증가
- 나. 소화촉진효소( $\alpha$ -galactosidase)의 사료내 첨가는 사료원료(야자박, 팜박 및 루핀시드)의 에너지가 증진
- 다. 값비싼 단백질 자원인 대두박을 저렴한 사료원료(팜박 및 루핀 시드)로 대체

- 라. 사료생산원가를 절감
- 마. 가축의 성장 촉진 및 생산능력 자극

3. 부수적 측면

- 가. 친환경 고품질의 축산물을 생산
- 나. 국제경쟁력이 강화된 축산업의 선진화
- 다. 극지미생물에서 생산되는 효소를 활용
  - (1) 식품산업(기능성식품 및 고부가가치 식품소재 개발)
  - (2) 의료산업(신기능 의약품 개발)
  - (3) 그 외 환경산업 등에 폭넓게 응용
- 라. 미래 산업용 효소제제 활용가치 상승기대

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 1 절 연구개발 성과

1. 연구 성과 목표

구분	특허		논문		기타 (포스터)
	출원	등록	SCI	비SCI	
목표	1		1		
달성	1		1		
추가			1(심사중)		1

가. 특허 성과

(1) 특허 출원

- (가) 출원명: 잠재적 사료첨가제로서 바실러스 sp. LX-1 유래 알파-갈락토시다이스의 특성 및 효소 생산을 위한 고체발효의 최적화
- (나) 특허출원인: 건국대학교 산학협력단
- (다) 출원번호: 10-2012-0010358
- (라) 출원일: 2012년 2월 1일

나. 논문 게재

- (1) Jaekoo Lee, Inkyung Park and Jaiesoon Cho. Production and partial characterization of  $\alpha$ -galactosidase activity from an Antarctic bacterial isolate, *Bacillus* sp. LX-1. African Journal of Biotechnology Vol. 11(60), pp. 12396-12405, 26 July, 2012.

- (2) Jaekoo Lee, Inkyung Park, and Jaiesoon Cho. Immobilization of the Antarctic *Bacillus* sp. LX-1  $\alpha$ -galactosidase on Eudragit L-100 for the production of a functional feed additive. (2012) Asian-Australasian journal of animal scirnces. (심사중)

다. 학회 발표

- (1) Inkyung Park, Jaekoo Lee and Jaiesoon Cho. Immobilization of  $\alpha$ -galactosidase from *Bacillus* sp. LX-1 using Eudragit L-100. 2012. 사단법인 한국동물 자원 과학회 proceeding Vol. II, PF12010, P 202. (6. 28 ~ 6. 29, 국립 충남 대학교)

## 2 절 연구개발 성과활용 계획

본 과제의 연구 성과는 다음과 같은 분야에서 활용 중 또는 활용 예정에 있다.

1. 확보된 고정화 효소의 자료 수집을 통하여 논문 투고 진행 중
2. 확보된 고정화 효소를 활용한 후속 연구에 적용
3. 확보된 고정화 효소를 대량 생산 기법에 확대 적용 가능성 모색
4. 확보된 고정화 효소를 실제로 사료에 첨가하여 동물에 급여함으로써 효능 검증

## 3 절 핵심기술

본 연구 과제의 핵심기술

- 가축사료 첨가제용 균주 탐색 및 효소 생산 기술

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

다양한 고정화 기질을 활용하여 미생물 유래 효소를 고정화 시킨 사례를 나타내었다.

Substrate	Microorganism	Enzyme(s)	Author(s)/year
Eudrgit S-100	<i>Chromobacterium viscosum</i>	lipase	Rodrigues 등 (2002)
Chitosan	<i>Candida rugosa</i>	lipase	Betigeri과 Neau (2002)
Alginate			
Agarose			
Chitosan	<i>Candida rugosa</i> type VII	lipase	Hung 등 (2003)
carbodiimide	<i>Candida rugosa</i>	lipase	Chang 등 (2008)
Eudrgit L-100	<i>Aspergillus niger</i>	xylanase	Sardar 등 (2000)
Eudragit S 100	<i>Trichoderma viride</i>	xylanase	Gupta 등 (1994)
Eudragit L 100	<i>Melanocarpus albomyces</i> IIS 68	xylanase	Roy 등 (2003)
Eupergit C	<i>Aspergillus oryzae</i>	$\alpha$ -galactosidase	Hernaiz와 Crout (2000)
Eupergit C	<i>Bacillus circulans</i>	$\beta$ -galactosidase	Hernaiz와 Crout (2000)
Silica	<i>Kluyveromyces lactis</i>	$\beta$ -galactosidase	Giacomini 등 (1998)
agarose			
Eudrgit L-100	<i>Paenibacillus</i> sp.	$\alpha$ -galactosidase	Park 등 (2012)
Eudragit S 100	<i>Penicillium griseofulvum</i>	$\alpha$ -amylase	Ertan 등 (2006)
E p o x y - A m i n o Sepabeads	<i>Aspergillus oryzae</i>	$\beta$ -galactosidase	Torres 등 (2003)
calcium alginate beads	<i>Bacillus circulans</i> GRS 313	$\alpha$ -amylase	Dey 등 (2003)
CNBr-activated Sepharose	<i>Myceliophthora thermophila</i> D-14	$\alpha$ -amylase	Sahukhan 등 (1993)
Silica	<i>Bacillus licheniformis</i>	$\alpha$ -amylase	Dobrevva 등 (1996)
agarose			
chitosan	<i>Bacillus mycoides</i>	protease	Abdel-Naby 등 (1998)
Amberlite IR-120			
Silica	<i>Bacillus licheniformis</i>	protease	Ferreira 등 (2003)
calcium alginate beads	<i>Bacillus licheniformis</i>	protease	Potumarthi 등 (2008)
Gelatin	<i>Aspergillus ficuum</i>	phytase	Liu 등 (1999)
Alginate	<i>Candida krusei</i>	phytase	Quan 등 (2003)
Agarose	<i>Aspergillus ficuum</i>	phytase	Dischinger 등 (1992)

## 제 7 장   참고문헌

- Abdel-Naby MA, Ismail AMS, Ahmed SA, Fattah AFA (1998). Production and immobilization of alkaline protease from *Bacillus mycooides*. *Bioresource Technol.* 64: 205 - 210.
- Ai Z, Jiang Z, Li L, Deng W, Kusakabe I, Li H (2005). Immobilization of *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 xylanase on Eudragit S-100 for xylo-oligosaccharide production. *Process Biochem.* 40: 2707-2714.
- Ao T, Cantor AH, Pescatore AJ, Ford MJ, Pierce JL, Dawson KA (2009). Effect of enzyme supplementation and acidification of diets on nutrient digestibility and growth performance of broiler chicks. *Poult. Sci.* 88:111-117.
- Anderson RL, Wolf WJ (1995). Compositional changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavones related to soybean processing. *J. Nut.* 125: 581S-588S.
- Anisha GS, John RP, Prema P (2009). Biochemical and hydrolytic properties of multiple thermostable  $\alpha$  - galactosidases from *Streptomyces griseoloalbus*: Obvious existence of a novel galactose-tolerant enzyme. *Process. Biochem.* 44: 327-333.
- Bayraktar H, Serilmez M, Karkas T, Celem EB, Onal S (2011). Immobilization and stabilization of  $\alpha$  - galactosidase on Sepabeads EC-EA and EC-HA. *Int. J. Biol. Macromol.* 49: 855-860.
- Betigeri SS, Neau SH (2002). Immobilization of lipase using hydrophilic polymers in the form of hydrogel beads. *Biomaterials.* 23: 3627 - 3636.
- Boisen, S, Fernandez JA (1997). Prediction of the total tract digestibility of energy in feedstuffs and pig diets by in vitro analyses. *Anim. Feed Sci. Technol.* 68: 277 - 286.
- Bora U, Kannan K, Nahar P (2005). A simple method for functionalization of cellulose membrane for covalent immobilization of biomolecules. *J. Membrane Sci.* 250: 215-222.
- Boyce A, Walsh G (2006). Comparison of selected physicochemical characteristics of

commercial phytases relevant to their application in phosphate pollution abatement. J. Environ. Sci. Health A 41: 789–798.

Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 72:248 - 254.

Calloway DH, Colasito DJ, Mathews RD (1966). Gases produced by human intestinal Microflora. Nature 212: 1238.

Cao Y, Wang Y, Luo H, Shi P, Meng K, Zhou Z, Zhang Z, Yao B (2009). Molecular cloning and expression of a novel protease-resistant GH-36  $\alpha$ -galactosidase from *Rhizopus* sp. F78 ACCC 30795. J. Microbiol. Biotechnol. 19: 1295–1300.

Cao Y, Yuan T, Shi P, Luo H, Li N, Meng K, Bai Y, Yang P, Zhou Z, Zhang Z, Yao B (2010). Properties of a novel  $\alpha$ -galactosidase from *Streptomyces* sp. S27 and its potential for soybean processing. Enzyme Microb. Tech. 47: 305–312.

Celem EB, Onal S (2009). Immobilization of phytase on epoxy-activated Sepabead EC-EP for the hydrolysis of soymilk phytate. J. Mol. Cat. B:Enzym. 61:150–156.

Chang SW, Shaw JF, Yang KH, Chang SF, Shieh CJ (2000). Studies of optimum conditions for covalent immobilization of *Candida rugosa* lipase on poly( $\gamma$ -glutamic acid) by RSM. Bioresource Technol. 99: 2800 - 2805.

Dey G, Singh B, Banerjee R (2002). Immobilization of  $\alpha$ -amylase produced by *Bacillus circulans* GRS 313 on coconut fiber. Applied Biochem. Biotechnol. 102–103: 302 - 313.

Dischinger HC, Ullah AHJ (1992). Immobilization of *Aspergillus ficuum* Phytase by Carbohydrate Moieties onto Cross-linked Agarose. Enzyme Engineering 672: 583 - 587.

Dobreva E, Ivanova V, Tonkova A, Radulova E (1996). Influence of the immobilization conditions on the efficiency of  $\alpha$ -amylase production by *Bacillus licheniformis*. Process Biochem. 31: 229 - 234.

Dourado F, Bastos M, Mota M, Gama FM (2002). Studies on the properties of Celluclast/Eudragit L-100 conjugate. J. Biotechnol 99: 121–131.



- Ertan F, Yagar H, Balkan B (2006). Some Properties of Free and Immobilized  $\alpha$ -Amylase from *Penicillium griseofulvum* by Solid State Fermentation. *Preparative Biochem. Biotechnol.* 36: 81-96
- Falkoski DL, Guimaraes VM, Callegari CM, Reis AP, De Barros EG, De Rezende ST (2006). Processing of soybean products by semipurified plant and microbial  $\alpha$ -galactosidases. *J. Agric. Food Chem.* 54: 10184-10190.
- Falkoski DL, Guimaraes VM, De Queiroz MV, De Araujo EF, De Almeida MN, De Barros EG, De Rezende ST (2009). Covalent immobilization of  $\alpha$ -galactosidase from *Penicillium griseoroseum* and its application in oligosaccharides hydrolysis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 158: 540-551.
- Feller G, Lonhienne T, Deroanne C, Libioulle C, Beeumen JV, Gerday C (1992). Purification, characterization and nucleotide sequence of the thermolabile  $\alpha$ -amylase from the Antarctic psychrotroph *Alteromonas haloplanctis* A23. *J. Biol. Chem.* 267: 5217-5221.
- Feller G, Narinx E, Arpigny JL, Zekhnini Z, Swings J, Gerday C (1994). Temperature dependence of growth, enzyme secretion and activity of psychrophilic Antarctic bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41: 477-479.
- Ferreira L, Ramos MA, Dordick JS, Gil MH (2003). Influence of different silica derivatives in the immobilization and stabilization of a *Bacillus licheniformis* protease (subtilisin carlsberg). *J. Mol. Cat. B* 21:189 - 199.
- Fialho LS, Guimaraes VM, Callegari CM, Reis AP, Barbosa DS, Borges EE, Moreira MA, Rezende ST (2008). Characterization and biotechnological application of an acid  $\alpha$ -galactosidase from *Tachigali multijuga* Benth. seeds. *Phytochemistry* 69:2579-2585.
- Francesch M, Perez-Vendrell AM (1997). Recent studies on enzyme application in animal feeding. *Cahiers Options Mediterraneennes.* 26:149-159.
- Garsoux G, Lamotte J, Gerday C, Feller G (2004). Kinetic and structural optimization to

catalysis at low temperatures in a psychrophilic cellulase from the Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis*. Biochem. J. 384:247-253.

Gaur R, Lata, Khare SK (2005). Immobilization of xylan-degrading enzymes from *Scytalidium thermophilum* on Eudragit L-100. World J. Microbiol. Biotechnol. 21: 1123-1128.

Ghazi S, Rooke JA, Galbraith H (2003). Improvement of the nutritive value of soybean meal by protease and  $\alpha$ -galactosidase treatment in broiler cockerels and broiler chicks. Br.Poult Sci. 44: 410-418.

Giacomini C, Villarino A, Franco-Fraguas L, Batista-Viera F (1998). Immobilization of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on silica and agarose: comparison of different methods. J. Mol. Catal. B 4: 313 - 327

Goulas T, Goulas A, Tzortzis G, Gibson GR (2009). A novel  $\alpha$ -galactosidase from *Bifidobacterium bifidum* with transgalactosylating properties :gene molecular cloning and heterologous expression. Appl Microbiol Biotechnol.82: 471-477.

Graham KK, Kerley MS, Firman JD, Allee GL (2002). The effect of enzyme treatment of soyben meal on oligosaccharide disappearance and chick growth performance. poult. Sci. 81: 1014-1019.

Grieshop CM, Kadzere CT, Clapper GM, Flickinger EA, Bauer LL, Frazier RL, Fahey Jr GC (2003). Chemical and nutritional characteristics of United States soybeans and soybean meals. J. Agric. Food Chem. 51: 7684-7691.

Groudieva, T, Kambourova M, Yusef H, Royter M, Grote R, Trinks H, Antranikian G (2004). Diversity and cold-active hydrolytic enzymes of culturable bacteria associated with Arctic sea ice, Spitzbergen. Extremophiles 8:475-488.

Gupta MN, Guoqiang D, Kaul R, Mattiasson B (1994). Purification of xylanase from *Trichoderma viride* by precipitation with an anionic polymer Eudragit S 100. Biotechnol.

Tech. 8: 117–122.

Haki GD, Rakshit SK (2003). Developments in industrially important thermostable enzyme: a review. *Bioresour. Technol* 89: 17–34.

Hartwig EE, Kuo TM, Kenty MM (1997). Seed protein and its relationship to soluble sugars in soybean. *Crop Sci.* 37: 770–773.

Hernaiz MJ, Crout DHG (2000). Immobilization/stabilization on Eupergit C of the  $\beta$ -galactosidase from *B. circulans* and an  $\alpha$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme Microb. Technol.* 27: 26 - 32.

Huang H, Luo H, Wang Y, Fu D, Shao N, Yang P, Meng K, Yao B (2009). Novel low temperature active phytase from *Erwinia carotovora* var, *carotovota* ACCC 10276. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 19: 1085–1091.

Hung TC, Giridhar R, Chiou SH, Wu WT (2009). Binary immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan. *J. Mol. Catal. B.* 26: 69 - 78.

Hutadilok-Towatana N, Painupong A, Suntainalert P (1999). Purification and characterization of an extracellular protease from alkaliphilic and thermophilic *Bacillus* sp. PS 719. *J. Biosci. Bioeng.* 87: 581–587.

Ishiguro M, Kaneko S, Kuno A, Koyama Y, Yoshida S, Park GG, Sakakibara Y, Kusakabe I, Kobayashi H (2001). Purification and characterization of the recombinant *Thermus* sp. T2  $\alpha$ -galactosidase expressed in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1601–1606.

Katrolia P, Jia H, Yan Q, Song S, Jiang Z (2012). Characterization of a protease-resistant  $\alpha$ -galactosidase from the thermophilic fungus *Rhizomucor miehei* and its application in removal of raffinose family oligosaccharides. *Bioresour. Technol.* 110: 578–586.

Kim SW, Knabe DA, Hong KJ, Easter RA (2003). Use of carbohydrase in corn-soybean meal-based nursery diets. *J. Anim. Sci.* 81: 2496–2504.

Kim YO, Kim HK, Bae KS, Yu JH, Oh TK (1998). Purification and properties of a

thermostable phytase from *Bacillus* sp. DS11 *Enzyme Microb. Technol.* 22: 2-7

King MR, White BA, Blaschek HP, Chassy BM, Mackie RI, Cann IKO (2002). Purification and characterization of a thermostable  $\alpha$ -galactosidase from *Thermoanaerobacterium polysaccharolyticum*. *J. Agric. Food Chem.* 50: 5676-5682.

Kohlmeier RH (1990). World production, storage and utilization of various defatted animal and vegetable mid-high protein meals. pp 390. in world conf. edible fats oils processing basic principles and modern practices. Erikson DR, ed. Am. Oil. Chem Soc. Champaign, IL.

Liener IE (1994). Implications of antinutritional components in soybean foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 34: 31-67.

Liu BL, Jong CH, Tzeng YM (1999). Effect of immobilization on pH and thermal stability of *Aspergillus ficuum* phytase. *Enzyme Microb. Technol.* 25: 517 - 521.

Liu CQ, Ruan H, Shen H, Chen QH, Zhou B, Li Y, He G (2007). Optimization of the fermentation medium for alpha-galactosidase production from *Aspergillus foetidus* ZU-G1 using response surface methodology. *J. Food. Sci.* 72:120-125.

Liu X, Meng K, Wang Y, Shi P, Yuan T, Yang P, Luo H, Bai Y, Yao B (2009) Gene cloning, expression and characterization of an  $\alpha$ -galactosidase from *Pedobacter nyackensis* MJ11 CGMCC 2503 with potential as an aquatic feed additive. *world J. Microbiol. Biotechnol.* 25: 1633-1642

Marx JC, Collins T, D'Amico S, Feller G, Gerday C (2007). Cold-adapted enzymes from marine Antarctic microorganisms. *Mar. Biotechnol (NY)*. 9: 293-304.

Miller GL (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31: 426-428.

Okutucu B, Celem EB, Onal S (2010). Immobilization of  $\alpha$ -galactosidase on galactose-containing polymeric beads. *Enzyme Microb. Technol.* 46: 200-205.

Onal S, Telefoncu A (2003a). Comparison of chitin and Amberlite IRA-938 for

alpha-galactosidase immobilization. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 31:19-33.

Onal S, Telefoncu A (2003b). Preparation and properties of  $\alpha$ -galactosidase chemically attached to activated chitin. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 31:339-355.

Park IK, Cho JS (2010a). Partial characterization of extracellular xylanolytic activity derived from *Paenibacillus* sp. KIJ1. *African. J. Microbiol.* 4: 1257-1264.

Park IK, Cho JS (2010b). Partial characterization of extracellular cold-adaptive  $\alpha$ -amylolytic activity produced by the Antarctic bacterial isolate, *Flavobacterium* sp. PCK1. *African. J. Microbiol.* 9: 7915-7921.

Park IK, Lee JK, Cho JS (2012). Partial characterization of  $\alpha$ -galactosidic activity from the Antarctic bacterial isolate, *Paenibacillus* sp. LX-20 as a potential feed enzyme source. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 25: 852-860.

Patil AG, K PK, Mulimani VH, Veeranagouda Y, Lee K (2010).  $\alpha$ -galactosidase from *Bacillus megaterium* VHM1 and its application in removal of flatulence-causing factors from soymilk. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20: 1546-1554.

Potumarthi R, Subhakar C, Pavani A, Jetty A (2008). Evaluation of various parameters of calcium-alginate immobilization method for enhanced alkaline protease production by *Bacillus licheniformis* NCIM-2042 using statistical methods. *Bioresource Technol.* 99: 1776 - 1786.

Quan CS, Fan SD, Ohta Y (2003). Immobilization of *Candida krusei* cells producing phytase in alginate gel beads: an application of the preparation of myo-inositol phosphates. *Appl. Microb. Biotechnol.* 62: 41-47.

Rackis JJ (1981). Flatulence caused by soya and its control through processing. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 58: 503-511.

Rasiah IA, Rehm BHA (2009). One step production of immobilized  $\alpha$ -amylase in recombinant *Escherichiacoli*. *Appl. Environ. Microbiol* 75: 2012-2016.

- Rodrigues AR, Cabral JMS, Taipa MA (2002). Immobilization of *Chromobacterium viscosum* lipase on Eudragit S-100: coupling, characterization and kinetic application in organic and biphasic media. *Enzyme Microb. Technol.* 31: 133 - 141.
- Roy I, Gupta A, Khare SK, Bisaria VS, Gupta MN (2003). Immobilization of xylan-degrading enzymes from *Melanocarpus albomyces* II68 on the smart polymer EudragitL-100. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61: 309-313.
- Sahukhan R, Samir K, Roy I, Chakrabarty SL (1993). Immobilization of  $\alpha$ -amylase from *Myceliophthora thermophila* D-14 (ATCC 48104). *Enzyme Microb. Technol.* 15: 801 - 804
- Sanjay G, Sugunan S (2005). Immobilization of  $\alpha$ -amylase onto K-10 montmorillonite: characterization and comparison of activity in a batch and a fixed-bed reactor. *Clay Minerals.* 40: 499-510.
- Sardar M, Roy I, Gupta MN (2000). Simultaneous purification and immobilization of *Aspergillusniger* xylanase on the reversibly soluble polymer Eudragit<sup>TM</sup> L-100. *Enzy. Microb Technol.* 27: 672-679.
- Sharma S, Kaur P, Jain A, Rajeswari MR, Gupta MN (2003). A smart bioconjugate of chymotrypsin. *Biomacromolecules.* 4: 330-336.
- Shivam K, Tripathi CPM, Mishra SK (2009). Culture conditions for the production of  $\alpha$ -galactosidase by *Aspergillus parasiticus* MTCC-2796: a novel source. *Electronic J. Biotech.* 12: 1-8.
- Silva CJSM, Zhang Q, Shen J, Cavaco-Paulo A (2006). Immobilization of proteases with a water soluble-insoluble reversible polymer for treatment of wool. *Enzyme Microb. Technol.* 39: 634-640.
- Smits CHM, Annison G (1996). Non-starch plant polysaccharides in broiler nutrition-towards a physiologically valid approach to their determination. *World's Poultr Sci. J.* 52: 204-221.

- Stein HH, Berger LL, Drackley JK, Fahey Jr GC, Hernot DC, Parsons CM (2008). Nutrition properties and feeding values of soybeans and their coproducts. pp 613–660. in soybeans, chemistry, production, processing, and utilization. Johnson A, White PJ, Galloway R. ed. AOCS press, Urbana,IL.
- Suarez FL, Springfield J, Furne JK, Lohrmann TT, Kerr PS, Levitt MD (1999). Gas production in humans ingesting a soybean meal derived from beans naturally low in oligosaccharides. *Am. J. Clin. Nutr.* 69: 135–139.
- Sulabo RC, Jones CK, Tokach MD, Goodband RD, Dritz SS, Campbell DR, Ratliff BW, DeRouchev JM, Nelssen JL (2011). Factors affecting storage stability of various commercial phytase sources. *J. Anim. Sci.* 89: 4262–4271.
- Talbot G, Sygusch J (1990). Purification and characterization of thermostable  $\beta$  - mannase and  $\alpha$  - galactosidase from *Bacillus stearothermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 3505–3510.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007). MEGA4: Molecular evolution genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24:1596–1599.
- Tamura K, Nei M, Kumar S (2004). Prospect for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining methods. *Proc. Nat. Aca. Sci. USA.* 101:11030–11035.
- Tee BL, Kaletunç G (2009). Immobilization of a thermostable- $\alpha$ -amylase by covalent binding to an alginate matrix increases high temperature usability. *Biotechnol. Prog.* 25: 436–445.
- Thippeswamy S, Mulimani VH (2002). Enzymatic degradation of raffinose family oligosaccharides in soymilk by immobilized  $\alpha$  - galactosidase from *Gibberella fujikuroi*. *Process Biochem.* 38: 635–640.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673–4680.
- Torres R, Mateo C, Fernández-Lorente G, Ortiz C, Fuentes M, Palomo JM, Guisan JM,

- Fernández-Lafuente R (2003). A Novel Heterofunctional Epoxy-Amino Sepabeads for a New Enzyme Immobilization Protocol: Immobilization-Stabilization of  $\beta$ -Galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Biotechnol. Progress* 19: 1056 - 1060.
- Turkiewiz M, Kalinowska H, Zielinska M, Bielecki S (2000). Purification and characterization of two endo-1,4-beta-xylanases from Antarctic krill, *Euphausia superba Dana*. *Comp Biochem. Physiol. BComp. Biochem. Mol. Biol.* 127:325-335.
- Varbanets LD, Malanchuk VM, Buglova TT, Kuhlmann RA (2001). *Penicillium* sp. 23 alpha-galactosidase: purification and substrate specificity. *Carbohydr. Polymers* 44: 357-363.
- Venkatesh DN, Reddy AK, Samanta MK, Suresh B (2009). Development in vitro evaluation of colonic drug delivery systems for tegaserod maleate. *Asian J. Pharmaceutics* 3: 50-53.
- Viana PA, DE Rezende ST, Marques VM, Trevizano LM, Passos FML, Oliveira MGA, Bemquerer MP, Oliveira JS, Guimaraes VM (2006). Extracellular  $\alpha$ -galactosidase from *Debaryomyces hansenii* UFV-1 and its use in the hydrolysis of raffinose oligosaccharides. *J. Agric. Food Chem.* 54: 2385-2391.
- Vila B, Mascarell J (1999).  $\alpha$  - Galactosides in soybean meal: can enzyme help. *Feed Inter.* 6:24-29.
- Wang H, Luo H, Li J, Bai Y, Huang H, Shi P, Fan Y, Yao B (2010). An  $\alpha$  - galactosidase from an acidophilic *Bispora* sp. MEY-1 strain acts synergistically with  $\beta$  - mannase. *Bioresour. Tech.* 101: 8376-8382.
- William GW, Susan MB, Dale AP, David JL (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173:697-703.
- Yoon MY, Hwang HJ (2008). Reduction of soybean oligosaccharides and properties of  $\alpha$  -D-galactosidase from *Lactobacillus curvatus* R08 and *Leuconostoc mesenteroides* JK55. *Food Microbiol.* 25: 815-823.
- Xu Z, Miao Y, Chen JY, Jiang X, Lin L, Ouyang P (2011). Co-immobilization mechanism of cellulase and xylanase on a reversibly soluble polymer. *Appl Biochem Biotechnol.* 163: 153-161.



Zhang Y, Xu J, Yuan Z, Xu H, Yu Q (2010). Artificial neural network-genetic algorithm based optimization for the immobilization of cellulase on the smart polymer Eudragit L-100. *Bioresource Technol.* 101: 3153-3158.

## 주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 2011년 생명산업기술 사업의 연구 보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 2011년 생명산업기술 사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.

## 연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 기능적 사료첨가제 생산을 위한 신규 남극세균 유래 α-galactosidase의 고정화 (영문) Immobilization of α-galactosidase from novel Antarctic bacterial isolate for a functional feed additive production				
주관연구기관	건국대학교 산학협력단	주 관 연 구 책 임 자	(소속) 건국 대학교 동물생명과학대학 동물생산·환경학 전공		
참 여 기 업			(성명) 조재순		
총연구개발비  (30,000천원)	계	30,000천원	총 연 구 기 간	2011년 11월 ~ 2012년 11월(년 월)	
	정부출연 연구개발비	30,000천원	총 참 여 연 구 원 수	총 인 원	3
	기업부담금			내부인원	3
	연구기관부담금			외부인원	0
<p>○ 연구개발 목표 및 내용</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 목표: 사료 내 항영양성 인자로 작용하는 갈락토올리고당(galactooligosaccharide)의 선택적 이용률을 극대화 할 수 있는 신규 극지 미생물 유래 α-galactosidase의 특성규명 및 사료첨가제로서 고정화(immobilization)된 효소의 적용을 통한 동물의 영양소 소화율 개선모색</li> <li>- 내용: 남극 토양에서 α-galactosidase을 생산하는 미생물을 분리 동정하여 α-galactosidase 생산을 위한 배지조성 및 특징을 조사 하였고, 나아가 이 효소를 산업적으로 활용하기 위하여, pH 5.0 이상에서는 수용액으로 존재하고 산성의 조건(pH4.0)에서 고체화 되어 침전하는 공중합체(copolymer) Eudragit 특성을 활용한 고정화 기술을 도입하여 동물 산업에 사료 첨가제로서 실제 이용 가능성을 조사하였다.</li> </ul> <p>○ 연구결과</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 가축 사료용 효소제 개발 기술 수행 결과 우선적으로 <i>Bacillus</i> sp. LX-1 유래 α-galactosidase는 식품이나 사료 산업에서 대두 처리과정 중에 매우 유용한 촉매제가 될 것이다. 그러한 이유는 이 α-galactosidase가 생리적으로 적절한 그리고 이용하기 알맞은 온도와 pH에 최적의 효소 활성을 가지고, trypsin과 pancreatin 같은 장관내 단백질 분해효소에 대하여 좋은 안정성을 가졌기 때문이다. 또한 이 α-galactosidase를 Eudragit L-100으로 고정화 했을 시 효소의 내구성, 재활용성 그리고 저장 안정성 모두를 향상시켰으며, in vitro 소화율 측정에서 대두박 원료를 분해하여 D-galactose을 방출하였다. 따라서 사료 산업에 사료 첨가제로서 적용 시 대두박이나 다른 콩과 원료에 있는 α-galactooligosaccharides를 제거하여 에너지 이용성과 사료효율을 증가 시킬 수 있는 선점적인 전략이 될 것이다.</li> </ul> <p>○ 연구성과 활용실적 및 계획</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 성과 및 활용 실적: 연구 계획서 작성시 목표로 하였던 특허 출원 1건, 논문 출간 1편 모두 달성하였고 추가적으로 SCI급 논문 1편을 심사 중에 있다.</li> <li>- 계획: 본 과제로 발생된 기술로 실제적 동물 사료첨가제로 이용되도록 기술 이전 계획을 수립 할 예정이다.</li> </ul>					

[별첨 2]

## 자체평가 의견서

연구개발분야	동물사료/사육	과제구분	<input type="checkbox"/> 지정공모과제 <input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제	관리번호	111111-1
연구과제명	기능적 사료첨가제 생산을 위한 신규 남극세균 유래 α-galactosidase의 고정화				
주관연구기관	건국대학교 산학협력단				
연구담당자	주관연구책임자	조재순			
	협동/위탁/세부 연구책임자	기관(부서)		성명	
		기관(부서)		성명	
		기관(부서)		성명	
	기관(부서)		성명		
연구기간	총 기간	2011.11.21. - 2012.11.20		당해년도기간	2011.11.21. - 2012.11.20
연구비(천원)	총 규모	30,000		당해년도규모	30,000

1. 연구는 당초계획대로 진행되었는가?

당초계획 이상으로 진행     
  계획대로 진행     
  계획대로 진행되지 못함

○ 계획대로 수행되지 않은 원인은?

2. 당초 예상했던 성과는 얻었는가?

예상외 성과 얻음     
  어느 정도 얻음     
  얻지 못함

3. 연구과정 및 성과가 농림어업기술의 발전·진보에 공헌했다고 보는가?

공헌했음     
  현재로서 불투명함     
  그렇지 않음

4. 경제적인 측면에서 농림어가의 소득증대에 공헌했다고 보는가?

- 공헌했음                       현재로서 불투명함                       그렇지 않음

5. 얻어진 성과와 발표상황

5-1 경제적 효과

- 기술료 등 수익                      수 익 :  
 기업 등에의 기술이전              기업명 :  
 기술지도 등                      기업명 :

5-2 산업·지식재산권 등

- 국내출원/등록                      출원 1건,              등록              건  
 해외출원/등록                      출원              건,              등록              건

5-3 논문게재·발표 등

- 국내 학술지 게재                      건  
 해외 학술지 게재                      1 건  
 국내 학·협회 발표                      건  
 국내 세미나 발표                      1 건  
 기 타                      건

5-4 인력양성효과

- 석 사                      1 명  
 박 사                      명  
 기 타                      명

5-5 수상 등

- 있 다                      상 명칭 및 일시 :  
 없 다

5-6 매스컴 등의 PR

- 있 다                      건  
 없 다

6. 연구개발착수 이후 국내 다른 기관에서 유사한 기술이 개발되거나 또는 기술 도입함으로 연구의 필요성을 감소시킨 경우가 있습니까?

- 없다                       약간 감소되었다                       크게 감소되었다

○ 감소되었을 경우 구체적인 원인을 기술하여 주십시오?

7. 관련된 기술의 발전속도나 추세를 감안할 때 연구계획을 조정할 필요가 있다고 생각하십니까?

- 없다                       약간 조정필요                       전반적인 조정필요

8. 연구과정에서의 애로 및 건의사항은?

(※ 아래사항은 기업참여시 기업대표가 기록하십시오)

1. 연구개발 목표의 달성도는?

- 만족                       보통                       미흡

(근거 : \_\_\_\_\_ )

2. 참여기업 입장에서 본 본과제의 기술성, 시장성, 경제성에 대한 의견

가. 연구성과가 참여기업의 기술력 향상에 도움이 되었는가?

- 충분                       보통                       불충분

나. 연구성과가 기업의 시장성 및 경제성에 도움이 되었는가?

- 충분                       보통                       불충분

3. 연구개발 계속참여여부 및 향후 추진계획은?

가. 연구수행과정은 기업의 요청을 충분히 반영하였는가?

- 충분                       보통                       불충분

나. 향후 계속 참여 의사는?

- 충분                       고려 중                       중단

다. 계속 참여 혹은 고려중인 경우 연구개발비의 투자규모(전년도 대비)는?

- 확대                       동일                       축소

4. 연구개발결과의 상품화(기업화) 여부는?

- 즉시 기업화 가능     수년 내 기업화 가능     기업화 불가능

5. 기업화가 불가능한 경우 그 이유는?

구 분	소 속 기 관	직 위	성 명
주관연구책임자	건국 대학교	부교수	조재순 (인)
참여기업대표			(인)

[별첨 3]

## 연구결과 활용계획서

### 1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제		분 야	동물사료/사육
연구과제명	기능적 사료첨가제 생산을 위한 신규 남극세균 유래 α-galactosidase의 고정화			
주관연구기관	건국 대학교 산학협력단		주관연구책임자	조재순
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	30,000천원			30,000천원
연구개발기간	2011.11.21. ~ 2012.11.20.			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타(                      ) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:                      )			

### 2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 가축사료용 효소제 개발	① 본 과제에서 신규 분리 동정한 <i>Bacillus</i> sp. 유래 α-galactosidase는 동물의 생리적으로 적절하고 이용하기 알맞은 온도와 pH에 최적의 효소 활성을 가졌으며, trypsin과 pancreatin 같은 장관 내 단백질 분해효소에도 매우 좋은 안정성을 나타냄으로 가축 사료용 효소제로서 사용함에 적절하다 할 수 있다.
② 효소고정화 기술 및 microencapsulation/delivery system 개발기술	② ①에서 개발된 효소를 Eudragit L-100에 고정시켰을 때, 효소의 내구성, 재활용성 그리고 저장 안정성 모두를 향상시켰으며, <i>in vitro</i> 소화율 측정에서 대두박 원료를 분해하여 galactose을 방출하였다. 따라서 사료 산업에 사료 첨가제로서 이 효소를 적용 시 대두박 또는 다른 콩과 원료에 있는 α-galactooligosaccharides을 제거하여 에너지 이용성과 사료효율을 증가시킬 수 있는 선점적인 전략이 될 것으로 보인다.

\* 결과에 대한 의견 첨부 가능



### 3. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	가축사료 첨가제용 균주 탐색 및 효소 생산 기술

### 4. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복	외국기술 제	외국기술 소화·흡수 개선·개량	특히 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해	정책 자료	기타
①의 기술					v	v	v			

\* 각 해당란에 v 표시

### 5. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	활용계획: 산업화를 목적으로 생물공학적 기법을 통한 α-galactosidase의 대량 생산 계획 기대효과: 가축의 항 영양성인자(α-galactooligosaccharide) 제거, 영양소 이용률증가, 가축의 생산성 증대, 사료 원료비 절감

### 6. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	천원
이전방식	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타( )		
이전소요기간		실용화예상시기	
기술이전시 선행조건			

\* 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성

\*\* 기술이전시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)

\*\*\* 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등