

# *Lactobacillus sporogenes*에 의한 $\beta$ -Galactosidase 생산에 관한 연구 (I)

— 菌体外  $\beta$ -Galactosidase의 생산 —

김영만, 이정치, 정필근, 최용진\*, 양한철\*\*

일동제약 주식회사 \*동덕여자대학 식품영양과, \*\*고려대학교 식품공학과  
(1983년 1월 14일 수리)

## Studies on the Production of $\beta$ -Galactosidase by *Lactobacillus sporogenes*

— Production of Extracellular  $\beta$ -Galactosidase —

Young-Man Kim, Jung-Chi Lee, Pil-Kun Chung

Yong-Jin Choi\* and Han-Chul Yang\*\*

1L Dong Pharm. Co., Ltd.

\*Dept. of Food and Nutrition, Dong Duck Women's University

\*\*Dept. of Food Technology, Korea University

(Received January 14, 1983)

Cultural conditions for the production of extracellular  $\beta$ -galactosidase by *Lactobacillus sporogenes*, a spore forming lactic acid bacterium, were investigated with shaken flask and jar fermentor cultures.

The fermentation medium giving maximum  $\beta$ -galactosidase yield was found to consist of 1% lactose as a carbon source, 1.5% peptone as an organic nitrogen source, 0.2% ammonium sulfate as an inorganic nitrogen source, 0.8% ammonium phosphate dibasic as a phosphorus source, and 0.05% potassium chloride and 0.001% ferric chloride as mineral source.

Optimal initial pH of the medium was 7.0 and the highest enzyme excretion was observed after 40 hours of cultivation at 37°C. In this experiment, the 500ml conical flask containing 50-200ml of medium was shaken at 140 strokes per minute with 7cm amplitude in a reciprocating shaker. The maximum enzyme value attained was 38 U/ml of the culture broth which was found to be slightly higher than the highest intracellular enzyme activity (30 U/ml) observed after 24 hours of incubation.

In the fermentor culture, the fermentation profile was shown to be similar to that observed in the shaken flask experiment. But the maximum extracellular enzyme activity was 45 U/ml to be even higher than the value obtained with the shaken flask culture.

$\beta$ -Galactosidase (Lactase,  $\beta$ -D-Galactoside galactohydrolase, EC 3.2.1.23)는 lactose의  $\beta$ -galactoside linkage를 분해하여 단당류인 glucose와 galactose를 생산하는 효소<sup>(1)</sup>로서 동물<sup>(2)</sup>, 식물<sup>(3)</sup>, 미생물 등<sup>(4-6)</sup> 자연에 널리 분포되어 있으며 낙농식품과<sup>(7-9)</sup> 발효<sup>(10)</sup>, 의약품<sup>(11)</sup> 등에 광범위하게 이용되고 있다.

$\beta$ -Galactosidase의 생산원은 주로 미생물이 이용되고 있으며 이중 대부분의 bacteria 및 yeasts는 균체내 효소로 inducible하게, 그리고 molds는 일반적으로 균체외 효소<sup>(12)</sup>로 constitutive하게 생

산하는 것으로 알려졌다.

그러나 본 연구에 사용된 유포자 유산균인 *Lactobacillus sporogenes*는 다른  $\beta$ -galactosidase 생산 bacteria<sup>(13)</sup>와는 달리 특이적으로 extracellular  $\beta$ -galactosidase를 다량 생산하는 것을 본 연구자들이 발견하였다.

따라서 본 연구는 *L. sporogenes*에 의한  $\beta$ -galactosidase 생산을 목적으로 한 체계적인 연구의 일환으로 먼저 효소생산을 위한 영양요구성 및 배양조건을 조사하여 보고한다.

## 실험재료 및 방법

### 사용균주

*Lactobacillus sporogenes*는 有孢子 乳酸菌으로 일동제약 중앙연구소 보존균주를 사용하였다.

### 기본배지의 선정

기본배지는 문헌에 보고된 bacteria에 의한  $\beta$ -galactosidase 생산용 몇가지 배지<sup>(6,14~21)</sup>를 검토한 예비실험결과 가장 높은 효소생산을 보였던 Table 1과 같은 배지를 본 실험의 기본배지로 사용하였다.

Table 1. Composition of basal medium

Ingredient	Content (%)
Lactose	1
Peptone	1
Yeast extract	0.5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.25
CH <sub>3</sub> COOH · 3H <sub>2</sub> O	1
Ascorbic acid	0.1

Sterilized at 121°C for 15minutes after adjusting pH 7.0.

### 배양방법

**진탕 flask배양** Peptone-Glucose-Yeast extract (PGY)-broth (150ml/500ml 용 진탕 flask) 를 사용 pH 6.8; 배양온도 45°C; 진탕속도 140strokes/min; 진폭 7cm 등의 배양조건에서 8 시간 진탕배양한 seed culture를 효소생산용 배지에 3% 접종한 후 동일한 조건에서 40시간 진탕배양하였다.

### Jar-fermentor 배양

30l 용 jar-fermentor (Marubishi Co., Ltd.) 에 15l의 배지를 주입, 살균, 냉각후 seed culture 3% 접종하여 배양온도; 37°C, aeration; 10l/min (0.67 v/v /min), agitation; 150rpm의 배양조건에서 통기배양하였다.

### Cell growth 측정

배양액을 10,000rpm에서 10분간 centrifuge 하여 균체를 포집한 다음 0.05M-sodium phosphate buffer 용액 (pH 6.8)을 사용 3회 세척하고 다시 동량의 상기 buffer 용액에 균체를 현탁시켜 660nm에서 흡광도를 측정하여 cell growth로 표시하였다.

### 조효소액의 조제

배양이 끝난다음 배양액을 5°C 정도의 저온으로 급냉하고 저온에서 10,000rpm으로 10분간 centrifuge하여 얻은 상등액을 균체외 조효소액으로 사용하였다.

한편 원심분리한 균체는 냉각한 0.05M-sodium phosphate buffer 용액 (pH 6.8)으로 3회 세척하고, 미리 냉각한 alumina powder (마쇄용 aluminum oxide)를 wet cell weight에 대해 42:1 비율로 가하여 motorized cell grinder로 2분동안 격렬하게 갈아서 세포를 파쇄시켰다. 파쇄한 균체를 동량의 sodium phosphate buffer 용액 (pH 6.8)에 현탁시켜 10,000rpm으로 30분간 centrifuge하여 분리된 상등액을 균체내 조효소액으로 사용하였다.

### $\beta$ -Galactosidase 활성 측정

$\beta$ -Galactosidase 활성측정은 Lederberg<sup>(23)</sup> 방법에 준하였다. 즉 0.05M-sodium phosphate buffer, (pH 6.8)에 o-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactoside (ONPG, Wako Pure Chemical Industries)를 5mM 되도록 용해한 기질용액 2ml를 60°C로 예온한 후 적절히 희석한 효소액 0.5ml를 가하고 60°C에서 10분간 반응후 급냉시키면서 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 2.5ml를 가해서 반응을 정지시킨 다음 발색된 황색의 흡광도를 420nm에서 측정하였다.

Blank는 기질액만을 10분간 incubation하고 급냉하면서 반응정지액 2.5ml를 먼저 가한 다음 동량의 효소액을 넣어서 흡광도를 측정하였다.

효소역가는 o-nitrophenol의 유리량을 표준곡선으로부터 산출, 표시하였으며 상기조건에서 1분 동안에 1 $\mu$ mole의 o-nitrophenol을 유리하는 효소량을 1단위로 하였다.

## 결과 및 고찰

### 탄소원의 영향

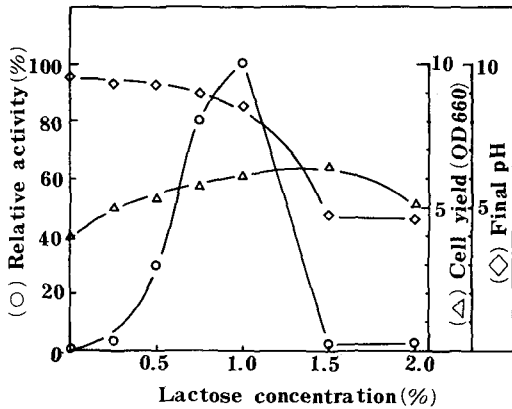
각종 탄소원을 기본배지에 각 1%씩 첨가하여 cell growth 및  $\beta$ -galactosidase 생산율을 조사한 결과 Table 2에 표시되어 있는 바와 같이 효소생산은 lactose를 첨가하는 5.19U/ml, lactulose는 4.78U/ml, galactose를 사용했을 때에는 2.18U/ml이었다.

따라서 효소생산에 가장 효과가 컸던 lactose의 첨가농도를 달리하여 농도에 따른 효소생산의 영향을 검토한 결과 Fig.1과 같이 lactose의 최적첨가농도는 1%였다.

이 결과는 Citti등<sup>(15)</sup>의 *Streptococcus lactis*를 이용한  $\beta$ -galactosidase 생산에 있어서 최적 lactose 농도에 관한 연구에서와 유사한 결과를 보였다. 또한 이 실험 결과는 *L. sporogenes*에 의한  $\beta$ -galactosidase 생산역시 lactose에 의해 induce 될 수 있을 것이다.

**Table 2. Effect of various carbon sources on the synthesis of the extracellular  $\beta$ -galactosidase**

Carbon source (1%)	Final pH	Cell yield (OD at 660nm)	Enzyme Activity (U/ml)
None	9.2	2.78	0.01
Dextrose	7.1	3.56	0.78
Galactose	8.1	4.25	2.18
Lactose	8.3	5.53	5.19
Lactulose	8.1	5.88	4.78
Maltose	6.8	4.78	0.23
Saccharose	6.6	1.41	0.07
Cellobiose	8.6	4.23	0.33
Mellibiose	8.3	4.28	0.75
Dextrin	8.9	3.17	0.07
Starch	8.8	3.35	0.08



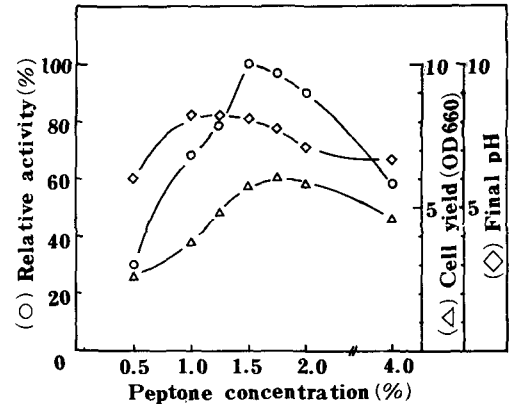
**Fig. 1. Effect of lactose concentration on the formation of the extracellular  $\beta$ -galactosidase.**

**질소원의 영향**

각종 유기질소원을 기본배지에 각각 1%씩 첨가하여 효소생산에 미치는 영향을 검토한 결과 Table 3과 같이 peptone 1%에서 5.85U/ml로 가장 좋은 효과를 보였으며, 가장 효과가 큰 pep-

**Table 3. Effect of organic nitrogen sources on the production of the extracellular  $\beta$ -galactosidase**

Organic nitrogen source (1%)	Final pH	Cell yield (OD at 660nm)	Enzyme Activity (U/ml)
Peptone	9.0	5.83	5.85
Casitone	8.9	5.32	4.07
Casamino acid	9.0	4.13	5.68
Proteose No.2	8.9	5.39	4.23
Proteose No.3	8.0	4.87	3.39
Soytone	8.7	5.42	5.11
Lab-Lemco	4.8	4.12	0.01
Beef extract	8.4	4.78	5.15
Yeast extract	8.9	6.21	3.03



**Fig. 2. Effect of peptone concentration on the production of the extracellular  $\beta$ -galactosidase.**

tone을 다시 농도별로 시험한 결과는 Fig. 2와 같이 peptone 1.5% 첨가에서 가장 높은 효소생산을 보였다.

또한 lactose 1%, peptone 1.5%를 첨가한 기본배지에 무기질소원의 효과를 시험하기 위하여  $(NH_4)_2SO_4$ 를 먼저 농도별 첨가, 그 효과를 검토한 결과 Fig. 3에 표시되어 있는 바와 같이 뚜렷한 첨가효과를 인정할 수 있었으며 0.2% 첨가시 가장 높은 효소생산을 나타내었다.

또  $(NH_4)_2SO_4$  이외의 다른 무기질소원의 종류별 효과를 조사한 결과 Table 4에 표시되어 있는 바와 같이 역시  $(NH_4)_2SO_4$  0.2% 첨가에서 7.68 U/ml로 가장 높은 효소생산량을 보였다.

이와같은 유기 및 무기질소원의 효과는 다른

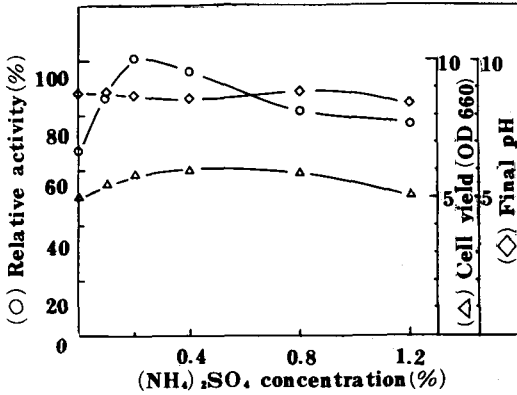


Fig. 3. Effect of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  concentration on the production of the extracellular  $\beta$ -galactosidase.

세균에 의한  $\beta$ -galactosidase 생산에 관한 연구결과<sup>(6)</sup>와 일반적으로 일치되는 경향을 보여주고 있으나, Ramana Rao와 Dutta는 *Streptococcus thermophilus*의 경우는 peptone 이외의 growth factor로 beef extract를 요구하였다고 하나 본 연구에 사용한 *L. sporogenes*는 효소생산에 특별한 growth factor를 요구하지 않았다.

Table 4. Effect of inorganic nitrogen sources on the production of the extracellular  $\beta$ -galactosidase

Inorganic nitrogen source (0.2%)	Final pH	Cell yield (OD at 660nm)	Enzyme Activity (U/ml)
None	8.5	5.75	6.45
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	7.0	5.96	7.68
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	8.2	4.35	6.23
$\text{NH}_4\text{Cl}$	8.4	5.45	1.94
$\text{NaNO}_3$	8.8	5.36	4.24

#### 인산염의 영향

Lactose 1%, peptone 1.5%,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.2%를 첨가한 기본배지에 각종인산염을 각각 0.25%씩 첨가하여 40시간 배양,  $\beta$ -galactosidase 생산에 미치는 인산염의 효과를 검토한 결과 (Table 5)  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  0.25% 첨가하였을 때 효소활성이 12.3U/ml로서 가장 좋았다.

한편 인산염중 가장 좋은 효과를 보였던  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 의 첨가농도를 달리하여 첨가농도에 따른 영향을 조사한 결과 Fig. 4에 표시되어 있는

Table 5. Effect of phosphorus sources on the production of the extracellular  $\beta$ -galactosidase

Phosphorus source (0.25%)	Final pH	Cell yield (OD at 660nm)	Enzyme Activity (U/ml)
None	5.3	5.30	0.45
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	5.6	5.78	3.06
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	6.5	5.24	5.81
$\text{Na}_3\text{PO}_4$	5.7	4.45	4.61
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	7.5	5.47	7.13
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	7.2	5.79	6.43
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	7.9	5.58	12.3

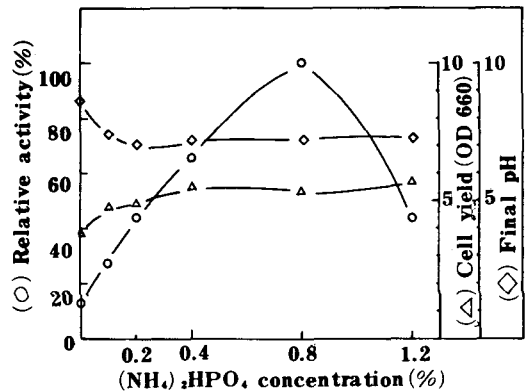


Fig. 4. Effect of  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  concentration on the extracellular  $\beta$ -galactosidase synthesis.

바와 같이 균체생산은 큰 변동을 보이지 않으나 효소생산은 현저한 첨가효과를 보였으며 동시에 최적첨가농도는 0.8%이었다.

#### Minerals 및 Vitamins 첨가 효과

Lactose 1%, peptone 1.5%,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.2%,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  0.8% 농도를 첨가한 기본배지에 Table 6에 표시되어 있는 각종의 mineral source를 농도별로 첨가하여  $\beta$ -galactosidase 생산에 미치는 효과를 검토한 결과 KCl 0.1% 첨가에 균체의 효소활성이 18.12U/ml,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.001% 첨가했을 때 17.53U/ml로 무첨가보다 다소 높은 효과를 보인 반면  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , NaCl 및  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 첨가했을 때에는 균체량에는 큰 차이를 나타내지 않았으나 효소생산은 크게 저해됨을 보여주고 있으나 그 원인은 더 이상 조사하지 못했다.

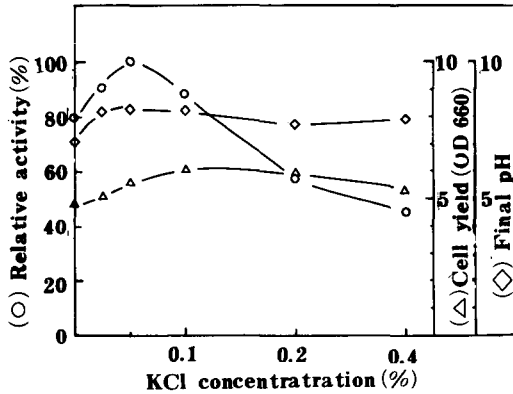
**Table 6. Effect of minerals on the production of the extracellular  $\beta$ -galactosidase**

Mineral	Final concentration (%)	Final pH	Cell yield (OD at 660nm)	Enzyme Activity (U/ml)
None		7.5	5.15	15.58
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.02	6.9	5.2	9.86
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.02	7.8	5.12	8.29
NaCl	0.3	7.5	5.91	9.5
KCl	0.1	7.2	5.54	18.12
CaCl <sub>2</sub>	0.02	6.6	4.56	12.68
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.001	7.4	5.26	17.53

**Table 7. Composition of the main culture medium**

Ingredient	Content (%)
Lactose	1
Peptone	1.5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.2
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.8
CH <sub>3</sub> COONa 3H <sub>2</sub> O	1
KCl	0.05
FeCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.01

Autoclaved at 121°C for 15minutes after adjusting pH 7.0.



**Fig. 5. Effect of KCl concentration on the production of the extracellular  $\beta$ -galactosidase.**

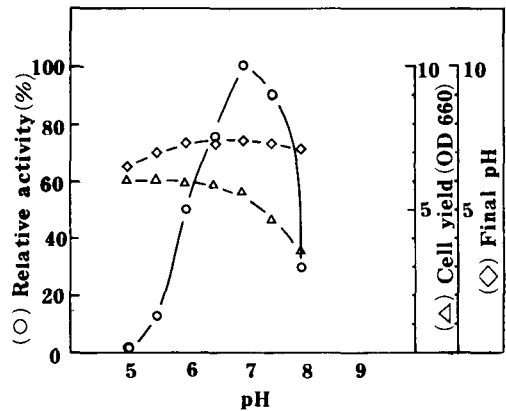
한편 Fig. 5는 각종 mineral 중에서 가장 효과가 큰 K<sup>+</sup>을 농도별로 첨가하여 균체생육 및 효소생산에 미치는 영향을 조사한 결과로서 KCl의 최적 첨가량은 0.05%이었으며 0.1% 이상 첨가했을 때에는 오히려 효소생산의 심한 저해효과를 보였다.

또한 ascorbic acid, biotin, niacin, folic acid, riboflavin, thiamin, pyridoxal, Ca-pantothenate 등 각종 vitamin을 몇가지 다른 농도로 배양액에 첨가하여 균체생육과 효소생산에 미치는 영향을 아울러 조사하였으나 어느 것도 뚜렷한 첨가효과를 인정할 수 없어 그 결과는 생략하였다.

이상의 영양요구성 시험에서 얻은 결과를 종합하여 *L. sporogenes*에 의한  $\beta$ -galactosidase 생산용 배지를 Table 7과 같이 확정, 이후의 효소생산 실험에 이용하였다.

**Initial pH**

Fig. 6은 *L. sporogenes*에 의한  $\beta$ -galactosidase 생산 및 균증식에 가장 적합한 배지의 초기 pH를 결정하기 위한 배양 시험결과로서 Fig. 6에서 보는 바와 같이 균체증식은 비교적 넓은 범위의 최적 pH (pH 5.0~7.0)를 보이는 반면 효소생산은 pH에 따라 극히 민감한 영향을 나타내었다. 본 시험균주를 이용한  $\beta$ -galactosidase 생산에 있어서는 배양온도와 더불어 배지의 초기 pH가 효소생산에 중요한 요인이 된다는 것을 인식할 수 있었다.



**Fig. 6. Relationship between initial pH of the medium and  $\beta$ -galactosidase formation by *L. sporogenes*.**

**배양온도**

*L. sporogenes*에 의한  $\beta$ -gactosidase, 생산에 미치는 배양온도의 영향을 검토하기 위해 Fig. 7

에 표시되어 있는 바와 같이 30°C에서 55°C 사이의 각 온도에서 40시간 배양한 결과 균체증식과 특히 효소생산은 온도에 따라 극히 예민한 반응을 나타냄을 알 수 있었다.

균체증식은 45°C에서 가장 좋았으나, 반면 효소생산은 37°C에서 가장 높은 값을 보임으로서 이후의 효소생산실험에서는 37°C에서 배양하였다.

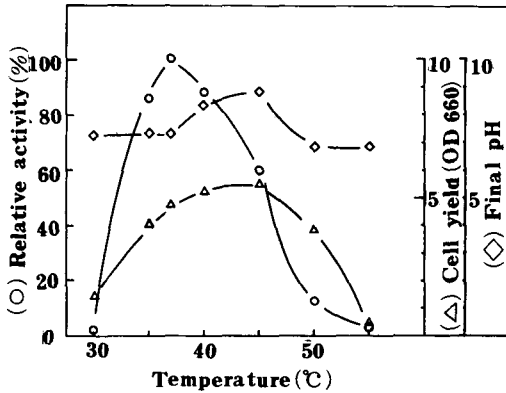


Fig. 7. Temperature profile for cell growth and  $\beta$ -galactosidase formation.

#### Aeration 효과

Fig. 8은 500ml용 진탕flask에 배지의 양을 50ml에서 400ml까지 각각 다르게 주입, 같은 조건에서 진탕배양하여 aeration 효과를 조사한 결과로서 200ml의 배지량까지는 거의 비슷한 균증식 및 효소활성을 나타내고 있으나 그 이상의 배지량에서는 배지의 최종 pH가 떨어짐과 동시에 효소생

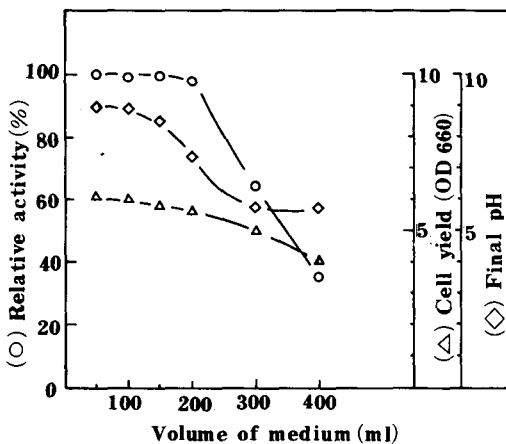


Fig. 8. Effect of aeration on the production of the extracellular  $\beta$ -galactosidase.

산 역시 급격히 저하됨과 동시에 균체증식도 서서히 떨어짐을 보였다.

따라서 본 시험균주에 의한  $\beta$ -galactosidase 생산에 있어서는 어느 정도의 aeration은 필수적인 것으로 사료되었다.

#### Flask culture에 의한 효소생산

Table 7.에 표시한 최적 효소 생산용 배지 150 ml를 500ml용 진탕 flask에 주입, *L. sporogenes*의 seed culture 3%를 접종하고 배양온도 37°C, 7 cm의 진폭으로 140 strokes/min의 진탕배양 조건에서 72시간 배양하여 배양시간에 따른 균증식, 세포내외의  $\beta$ -galactosidase 생산량 및 배양액의 pH 변화 등을 추적하여 Fig. 9와 같은 결과를 얻었다.

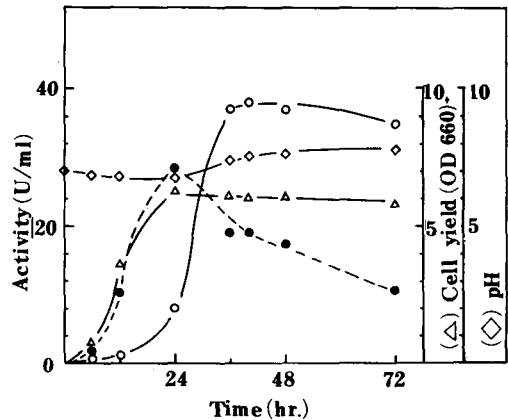


Fig. 9. Time course of  $\beta$ -galactosidase formation by *L. sporogenes* in shaken flask culture.

○—○, Extracellular  $\beta$ -galactosidase,  
●---●, Intracellular  $\beta$ -galactosidase.

끝날 무렵부터 초기 정지기 사이에서 효소생산 속도가 급격히 증가되어 배양 40시간 전후 즉 균증식의 후기 정지기에서 가장 높은 효소생산량 (38U/ml)을 보였다.

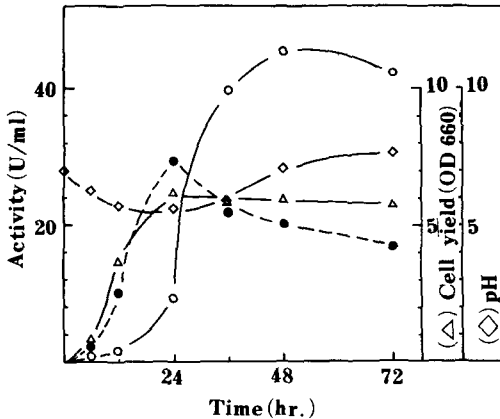
균체증식은 배양 24시간 전후에서 균증식의 정지기에 들어감으로서 최고값을 나타내고 있으나, 효소생산은 균체내 효소생산의 경우 균체증식 속도와 비례적으로 증가하여 배양 24시간 전후에서 최고치 (30U/ml)를 나타내고 그 이후부터는 급격히 감소되었으나, 균체의 효소는 균증식 대수기기와 관련하여 본 연구에 사용한 *L. sporogenes*에 의한  $\beta$ -galactosidase의 세포외로, 분비 기작

내지는 분비 최적 조건 등도 중요한 연구과제라고 생각된다.

한편 배양액의 pH는 배양이 시작되면서부터 약간 떨어지는 경향을 보이다가 균증식의 초기 정지기 이후부터는 점차적으로 다시 높아져 배양 종료시에는 pH 8.0 부근을 나타내었다. 따라서 본 효소생산에 미치는 배지의 pH 영향 (Fig. 6)을 참작하여 배양중 배지의 pH를 적절히 조절한다면 보다 높은 효소생산을 기대할 수 있다고 생각된다.

**Jar-fermentor에 의한 효소생산**

30l 용 jar-fermentor에 15l의 배지를 주입하고 배양방법에서 설명한 배양조건하에서 72시간 통기배양하여 배양시간에 따른 효소 생산량 등의 발효동향을 살펴본 결과 Fig. 10과 같은 결과를 얻었다.



**Fig. 10. Kinetics of  $\beta$ -galactosidase production by *L. sporogenes* in a 30 liter fermentor culture.**

○—○, Extracellular  $\beta$ -galactosidase,  
●---●, Intracellular  $\beta$ -galactosidase.

균체증식과 배양액의 pH 변화등 전반적인 발효양상은 진탕 flask 배양과 거의 유사한 경향을 나타내고 있으나 flask 배양에 비교해서 균체의 효소생산이 다소 지연되어 배양 48시간 전후에서 최고 효소생산량을 나타내었다. 균체의 효소활성이 45U/ml로서 flask 배양에 비해 다소 높은 값을 보였다. 이는 fermentor 배양이 flask배양에 비해 보다 양호한 배양조건 때문이 아닌가 생각된다.

결과적으로 본 연구에 사용한 *L. sporogenes*에

의한  $\beta$ -galactosidase 생산은 일반  $\beta$ -galactosidase 생산 세균과는 달리 특이하게 균체외로 다량의 효소를 분비하므로서 효소생산에 큰 이점을 보이고 있을 뿐만 아니라 또한 다른 세균보다 예를들면 Ramana Rao와 Dutta<sup>6)</sup>가 연구한 *Streptococcus thermophilus*에 의한  $\beta$ -galactosidase 생산  $\beta$ -galactosidase

(1.8U/ml·배양액)에 비해 훨씬 높은 효소생산량을 보임으로서 앞으로의 연구에 기대가 크다고 하겠다.

**요 약**

유포자 유산균인 *Lactobacillus sporogenes* 가 특이하게 균체외  $\beta$ -galactosidase를 다량 생산하는 것을 발견하여 효소생산을 위한 영양요구성과 배양조건을 조사하였다.

영양요구성으로는 탄소원으로서 lactose 1%, 유기질소원으로서 peptone 1.5%, 무기질소원으로서 ammonium sulfate 0.2%, phosphorus 원으로서 ammonium phosphate, dibasic을 0.8%, mineral은 potassium chloride 0.05%, ferric chloride 0.001% 첨가했을 때 최대의 효소생산을 나타내었다.

배지의 최적 initial pH는 7.0, 최적배양온도는 37°C, aeration 효과는 500ml용 진탕 flask에 배지량을 50~200ml 주입, 140 strokes/min (진폭 7cm)으로 진탕 배양하였을 때 최고의 효소생산을 나타냈다.

상기의 최적조건에서 균체증식은 24시간 배양에 최고에 달하는 반면  $\beta$ -galactosidase 생산은 균체내 효소생산의 경우 균체증식 속도와 비례적으로 증가하여 배양 24시간 전후에서 30U/ml로 최고치를 나타내고 균체의 효소는 배양 40시간 전후 즉 균증식의 후기 정지기에서 38U/ml로 가장 높은 효소생산량을 보였다.

또한 fermentor 실험역시 flask 배양과 거의 비슷한 배양 양상을 보였으며 균체의 효소역가는 45U/ml로 진탕 flask 배양 결과보다 다소 양호하였다.

**참 고 문 헌**

1. Pardee, A. B., F. Jacob, and J. Monod: *J. Mol. Biol.*, **1**, 165 (1959)
2. Alpers, D. H. : *J. Biol. Chem.*, **244**, 1238 (1969)

3. Gatt, S., and E. A. Baker : *Biochem. Biophys. Acta.*, **206**, 125 (1970)
4. Winder, F., and J. L. Leuba : *European J. Biochem.*, **100**, 559 (1979)
5. Wendorff, W. L., C. H. Amundson, and N. F. Olson : *J. Milk Food Technol.*, **33**, 451 (1970)
6. Ramana Rao, M. V., and S. M. Dutta : *Appl. Environ. Microbiol.*, **34**, 185 (1977)
7. Guy, E. J., A. Tamsma, A. Kontson, and V. H. Holsinger : *Food Product Devel.*, **8**, 50 (1974)
8. Tumerman, L., H. Fram, and K. W. Cornely : *J. Dairy Sci.*, **37**, 830 (1954)
9. Bouvy, F. A. M. : *Food Product Dev.*, **9**, 10 (1975)
10. O'leary, V. S., and J. H. Woychick : *J. Food Sci.*, **41**, 791 (1976)
11. Sugiura, M., M. Suzuki, T. Shimomura, and M. Sasaki : *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **26**, 1 (1978)
12. Watanabe, Y., Y. Kibesaki, S. Takenishi, K. Sakai, and Y. Tsujisaka : *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 943 (1979)
13. Landman, O. E. : *Biochem. Biophys. Acta.*, **23**, 558 (1957)
14. Anema, P. J. : *Biochem. Biophys. Acta.*, **89**, 495 (1964)
15. Citti, J. E., W. E. Sandine, and P. R. Elliker : *J. Bacteriol.*, **89**, 937 (1965)
16. Ikura, Y., and K. Horikoshi : *Agr. Biol. Chem.*, **43**, 85 (1979)
17. Iwasaki, T., Y. Yoshioka, and T. Kanauchi : *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, **45**, 207 (1971)
18. Goodman, R. E., and D. M. Pederson : *Can. J. Microbiol.*, **22**, 817 (1976)
19. Craven, G. R., E. Steers, Jr., and C. B. Anfinsen : *J. Biol. Chem.*, **240**, 2468 (1965)
20. Blankenship, L. C., and P. A. Wells : *J. Milk Food Technol.*, **37**, 199 (1974)
21. Toba, T., Y. Tomita, T. Itoh, and S. Adachi : *J. Dairy Sci.*, **64**, 185 (1981)
22. American Society for Microbiology : *Manual of Methods for General Bacteriology*, 369 (1981)
23. Joshua Lederberg : *J. Bacteriol.*, **60**, 381 (1950)