

微生物에 의한 β -Galactosidase의 生産 및 利用에 관한 연구
(第2報) *Penicillium* sp.의 효소의 물리화학적 성질 및 이용

吳平洙, 徐恒源,* 梁漢喆
高麗大學校 農科大學 食品工學科
*太平洋化學(株)
(1981년 11월 2일 수리)

Studies on the Production of β -Galactosidase by
Microorganism and its Application

(Part 2) Physicochemical Properties of the Enzyme of *Penicillium* sp. and its Application

Pyong-Su O, Hang-Won Suh,* Han-Chul Yang

Department of Food Technology, College of Agriculture, Korea University

*Pacific Chemical Co., Ltd. Seoul, Korea

(Received November 2, 1981)

Abstract

The molecular weight of the purified β -galactosidase of *Penicillium* sp. was estimated to be 130000 by both Sephadex G-200 gel filtration and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The SDS-electrophoresis gave two protein bands corresponding to the two molecular weights of 130000 and 70000. These results indicated that the enzyme consisted of two probably identical subunits which had a molecular weight of 70000. The optimum pH of the enzyme activity was 4.7 and maximum activity appeared at 50°C. The stable pH range for the enzyme was from 4.5 to 7.0. The purified β -galactosidase had no metal ion requirement for its activity or stability. The enzyme activity was inhibited by Cu^{++} (1mM) and galactose (100mM). The hydrolysis of lactose in 5% lactose solution, pasteurized milk and 10% skim milk solution were 69.5%, 88.7% and 72.6% after 4 hr incubation at 50°C, when 10 units of β -glucosidase were used per ml of the substrate solutions.

서 론

乳製品중의 lactose를 가수분해시켜서 低乳糖製品을 개발하려는 試圖는 1950년 부터 시작되어 최근에는 微生物로 부터 생산되는 β -galactosidase를 정제하여 乳製品應用에 관한 研究가 많이 보고되고 있다.¹⁾

微生物을 生産起源으로 하는 β -galactosidase의 物理化學的性質에 있어서 細菌 및 酵母는 주로 菌

体内酵素로 최적 pH는 6.0~7.5이며 곰팡이 酵素는 菌体外分泌酵素로서 최적pH는 2.5~4.5로 알려져 있으며 *Escherichia coil* K12²⁾, *Kluyveromyces fragilis*³⁾, *Aspergillus niger*^{4,5)}, *Aspergillus oryzae*^{6,7)} 등에 관한 研究가 보고되어 있다.

β -Galactosidase의 利用에 있어서 Gay등⁸⁾은 lactose를 분해한 우유의 甘味度에 대해서, Holsinger등⁹⁾은 凍結濃縮製品에 대해서, O'Leary등¹⁰⁾은 yogurt 제조에 대해서 보고한 바가 있다.

本 研究에 있어서는 前報⁽¹¹⁾에 따라 *Penicillium* sp로 부터 정제된 β -galactosidase를 産業的 利用을 目的으로 酵素의 物理化學的 性質을 研究하고 그 利用에 관한 검토를 하였다.

실험재료 및 방법

시 약

β -Galactosidase 活性測定을 위한 *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG)는 Nakari Chemicals 제품을, SDS-polyacrylamide electrophoresis 및 gel filtration을 위한 標準蛋白質들은 Boehringer Mannheim GmbH 제품을 lactose分解率의 測定을 위한 Glucostat reagent는 Worthington Biochemical Corp. 제품을 각각 사용하였다.

β -Galactosidase의 活性測定法

酵素의 活性單位(unit)는 ONPG(*o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside)를 기질로 하였다. 酵素 및 5mM ONPG를 함유하는 50mM acetate buffer (pH 4.5) 2ml의 液을 40°C에서 15분동안 반응시킨 후 0.2M Na₂CO₃ 2 ml를 加하여 반응을 중지시키고 반응에 의해 생성된 *o*-nitrophenol을 410nm에서 比色 定量하였다. 이 반응조건에서 1분 동안에 1 μ mol의 *o*-nitrophenol을 생성하는 酵素量을 1單位(1u)로 하였다.

Electrophoresis

Subunit를 확인하기 위하여 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis는 Weber와 Osborn法⁽¹²⁾에 의해서 정제된 9 μ g의 β -galactosidase를 사용하여 0.1% SDS를 함유한 5% polyacrylamide gel(0.5×8.0cm)에 column 1本당 8mA로 150분동안 電氣 泳動한 후 Coomassie brilliant blue로 染色하였다.

標準蛋白質으로서 RNA-polymerase β (분자량 165,000), RNA-polymerase β (분자량 155,000), rinder serum albumin (분자량 67,000), RNAPolymerase α (분자량 39,000), trypsin-inhibitor (분자량 21,500)를 사용하였다.

Sephadex G-200 gel filtration

분자량을 결정하기 위해 gel filtration을 Andrews法^(13,14)에 따라 정제된 β -galactosidase 및 標準蛋白質들은 미리 0.1M NaCl을 함유한 0.01M acetate buffer (pH 5.6)로 緩衝된 Sephadex G-200 gel column(1.6×90cm)을 사용하여 上昇法에 의해 각 2 ml씩 分画하였다. 標準蛋白質들은 chymotrypsinogen

(분자량 25,000), rinder serum albumin(분자량 67,000), aldolase(분자량 158,000), ferritin(분자량 540,000) 등을 사용하였다.

蛋白質 定量

蛋白質은 bovine serum albumin을 標準蛋白質으로 하여 Lowry등⁽¹⁵⁾ 방법에 의해 定量하였다.

Lactose 分解率의 測定

Lactose로 부터 β -galactosidase에 의해 분해되어 생성된 glucose를 Wasuko등⁽¹⁶⁾ 방법을 응용한 Glucostat reagent 법에 따라 測定하였다.

실험결과 및 고찰

Galactosidase의 分子量 決定

前報⁽¹¹⁾에서 정제된 β -galactosidase의 分子量은 Sephadex G-200 gel filtration法에 의해서 Fig. 1과 같이 130,000으로 결정되었고 SDS-polyacrylamide

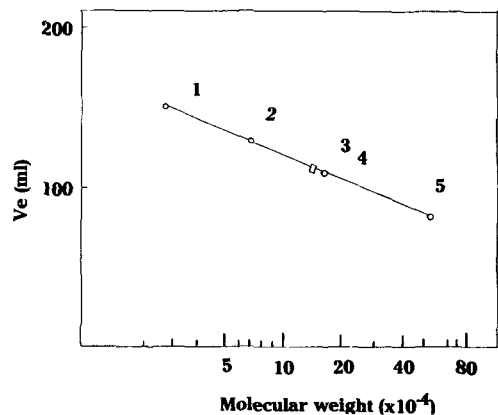


Fig. 1. Molecular Weight Estimation by Sephadex G-200 Gel Filtration.

1, chymotrypsinogen (molecular weight 25000); 2, rinder serum albumin (molecular weight 67000); 3, purified β -galactosidase; 4, aldolase (molecular weight 158000); 5, ferritin (molecular weight 540000).

de gel electrophoresis에서는 Fig. 2 및 Fig. 3과 같이 分子量 130,000의 band 외에 分子量 70,000의 band가 나타났다. 菌体内酵素들의 分子量 즉 *Escherichia coli*⁽²⁾ (분자량 518,000), *Kluyveromyces fragilis*⁽³⁾ (분자량 201,000)보다 작으며 菌体外分泌性 酵素들의 分子量 즉 *Aspergillus foetidus*⁽¹⁷⁾ (분자량 126,000), *A. oryzae*⁽⁶⁾ (분자량 105,000) 등과 비슷하였다. Mahoney등⁽⁵⁾은 *Kluyveromyces fragilis*의 β -galactosidase는 sedimentation equilibrium,

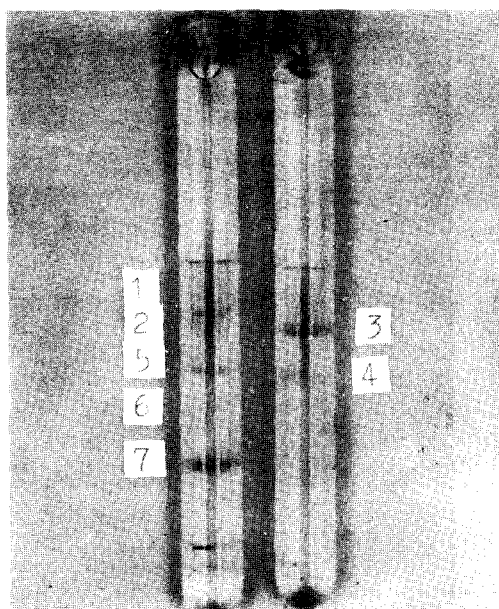


Fig. 2. SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Purified β -Galactosidase (B) and Standard Proteins (A).

Column, 5% polyacrylamide gel containing 0.1% SDS (0.5x8.0 cm); sample protein, 9 μ g; electrophoresis, 8 mA per column for 150 min; staining, Coomassie brilliant blue; 1, RNA-polymerase β' (molecular weight 165000); 2, RNA-polymerase β (molecular weight 155000); 3,4, purified β -galactosidase; 5, rinderserum albumin (molecular weight 67000); 6, RNA-polymerase α (molecular weight 39000); 7, trypsin-inhibitor (molecular weight 21500).

Sephadex G-200 gel filtration¹⁸에서 201,000인 분자량이 SDS-electrophoresis pattern 에서는 주로 2개의 subunit 즉, 90,000, 120,000으로 나타났으며 electron microscopy에서 subunit가 9~10개 존재하였다고 보고한 것과같이 이 효소도 분자량 70,000인 subunit 2개로 구성되어 있다고 판단되었다.

酵素活性에 미치는 pH 및 온도의 영향

β -Galactosidase의 活性에 미치는 pH의 영향을 검토하기 위해서 pH2.0에서 pH10.0까지 pH 별로 검토하였다. Fig. 4와 같이 최적pH는 4.7이었다. 또한 온도의 영향을 검토하기 위하여 온도 25 $^{\circ}$ C에서 70 $^{\circ}$ C까지 검토한 결과 Fig. 5와 같이 최적온도는 50 $^{\circ}$ C였다. 이 효소의 최적pH는 細菌^{18,19,20} (pH

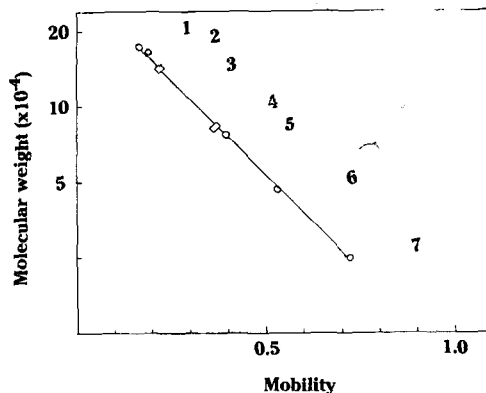


Fig. 3. Molecular Weight Estimation by SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis.

1, RNA-polymerase β' (molecular weight 165000); 2, RNA-polymerase β (molecular weight 155000); 3,4, purified β -galactosidase; 5, rinderserum albumin (molecular weight 67000); 6, RNA-polymerase α (molecular weight 39000); 7, trypsin-inhibitor (molecular weight 21500).

6.0~7.0) 및 酵母^{21,22} (pH6.5~7.2)의 β -galactosidase보다 낮으며 다른 분비성곰팡이^{4,5,6,7,8,17,23} (pH2.5~4.7) β -galactosidase보다 높거나 비슷하였다. 최적온도는 酵母²² (37 $^{\circ}$ C)보다 높으며 細菌^{18,19,20,24} (37 $^{\circ}$ C~65 $^{\circ}$ C) 및 다른 분비성곰팡이^{4,6,7,17} (45 $^{\circ}$ C~67 $^{\circ}$ C) β -galactosidase와 비슷하였다.

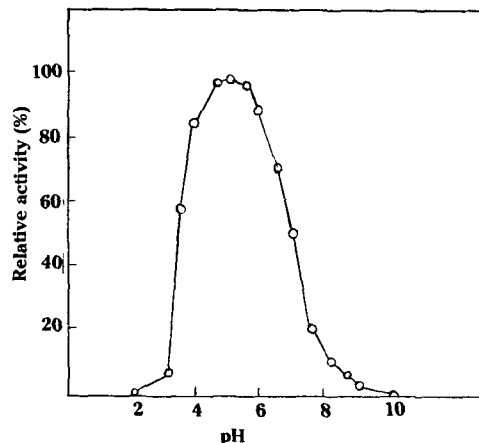


Fig. 4. Effect of pH on β -Galactosidase Activity.

The buffers used were Na-citrate-HCl buffer from pH 2.0 to pH 4.0, Na-acetate buffer from pH 4.0 to pH 5.6, phosphate buffer from pH 5.6 to 7.5, Tris-HCl buffer from pH 7.5 to 9.0 and glycine-NaOH buffer from pH 9.0 to 10.0.

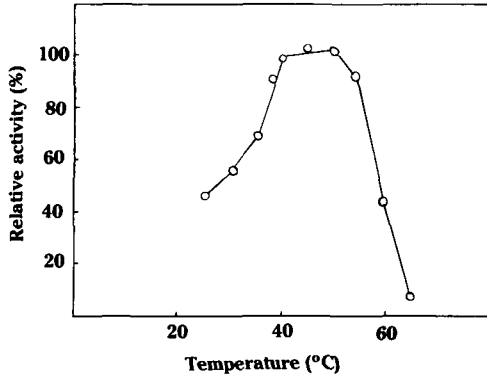


Fig. 5. Effect of Temperature on β -Galactosidase Activity.

酵素의 安定性에 미치는 pH 및 온도의 영향

酵素의 安定性에 대한 pH의 영향을 검토하기 위하여 pH2.0에서 pH10.0까지 각각 0.1M buffer 용액에서 酵素(0.06% 용액)를 40°C에서 1시간 동안 처리한 후 pH4.5로 조절하고 酵素活性를 測定하였다. Fig. 6 과 같이 pH4.5에서 pH7.0까지는 酵素安定性을 나타내었다. 酵素의 安定性에 대한 온도의

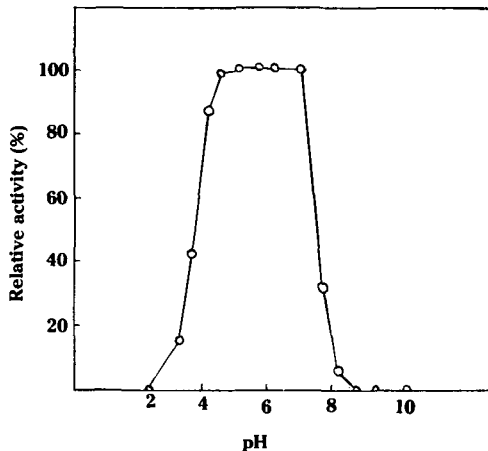


Fig. 6. Effect of pH on β -Galactosidase Stability.

영향을 검토하기 위하여 pH4.5(0.05M acetate buffer) 및 pH6.5(0.05M phosphate buffer)에서 각 온도별로 15분 동안 처리한 후 ice water에서 냉각하여 pH를 4.5로 조절하고 酵素活性를 測定하였다. Fig. 7 과같이 酵素에 대한 안정온도는 pH4.5에서는 55°C, pH6.5에서는 50°C였다. 이 酵素의 安定pH 범위는 酵母⁽²²⁾의 β -galactosidase (pH 6.0~7.0) 보다 크며 다른 곰팡이들^(6,17)의 β -galactosidase (pH4.0~9.0)와 비슷하였다.

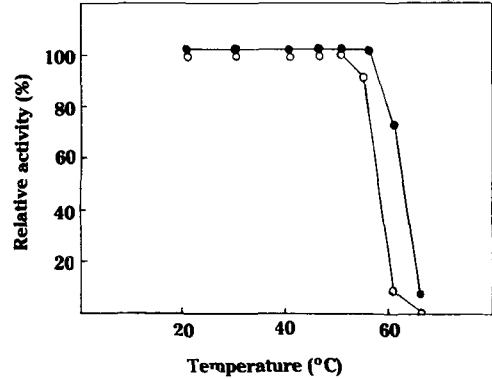


Fig. 7. Effect of Temperature on β -Galactosidase Stability.

●—●, pH 4.5; ○—○, pH 6.5.

酵素活性에 미치는 금속 ion 및 糖類의 영향

여러가지 금속이온 및 糖類들이 酵素活性에 미치는 영향을 Table 1 과 같이 검토하였다. *Saccharomyces lactis*⁽²¹⁾에서는 Mg^{++} , *Saccharomyces fragilis*⁽²²⁾에서는 K^+ , Mn^{++} , *E. coli* ML 308⁽²⁵⁾에서는 Mg^{++} , *Streptococcus cremoris* H⁽²⁰⁾에서는 Mn^{++} 등이 酵素活性 및 안정제로 작용한다고 하였으나 *Aspergillus foetidus*⁽¹⁷⁾, *Aspergillus oryzae*⁽⁶⁾에서와 같이 酵素活性 및 안정제로 이들 금속ion들을 필요로 하지 않았다. Cu^{++} (1mM)와 galactose(100 mM)는 *Aspergillus oryzae*⁽⁶⁾와 같이 阻害作用을 나타내었다.

Table 1. Effect of Inorganic Ions and Sugars on β -Galactosidase Activity

Material	Concentration (mM)	Relative activity (%)
Control	No addition	100
KCl	1.0	99
NaCl	1.0	100
BaCl ₂	1.0	99
CaCl ₂	1.0	97
CoCl ₂	1.0	100
MgCl ₂	1.0	99
MnCl ₂	1.0	99
CuSO ₄	1.0	41
FeSO ₄	1.0	96
ZnSO ₄	1.0	97
Galactose	100.0	52
Glucose	100.0	119
Lactose	100.0	93

反應速度

基質濃도에 따른 反應速度는 Lineweaver Burk plots⁽²⁶⁾에 따라 Fig. 8에서 Michaelis constant(Km)와 maximum velocity(Vmax)를 구하였다. ONPG를 基質로 하였을때 Km은 0.25mM, Vmax는 111.1 μ mole/min/mg protein이었다.

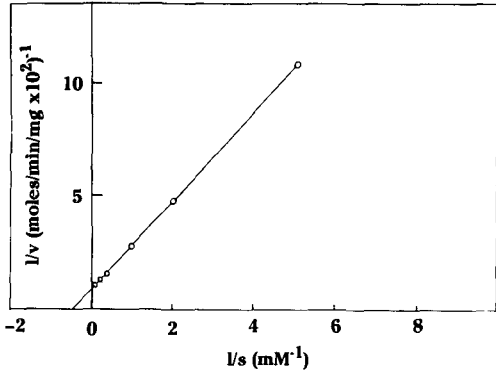


Fig. 8. Lineweaver-Burk Plot of the Purified β -Galactosidase for ONPG as Substrate.

乳製品에 應用

β -Galactosidase를 乳製品에 利用하기 위하여 乳製品중의 lactose分解에 필요한 β -galactosidase의 活性單位를 검토하였다. Fig. 9에서와 같이 40°C에

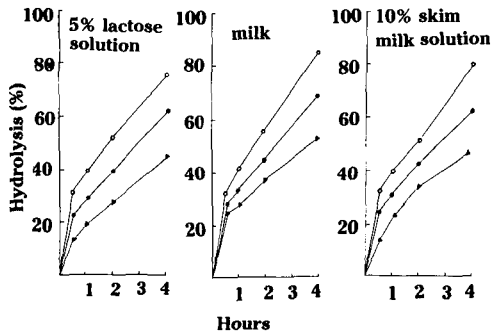


Fig. 9. Hydrolysis of Lactose in 5% Lactose Solution, Milk and 10% Skim Milk Solution by β -Galactosidase at 40°C.

▲-▲, 2.5u/ml; ●-●, 5.0u/ml; ○-○, 10u/ml.

서 β -galactosidase單位를 2.5u/ml, 5.0u/ml, 10.0u/ml로 4시간동안 反應하였을때 5% lactose 용액에서는 lactose分解率이 46.4%, 61.2%, 76.0%, 市乳에서는 47.0%, 67.3%, 87.6% 및 10% skim milk용액에서는 46.5%, 64.0%, 81.6%로 되었다. Fig. 10은 β -galactosidase單位를 10u/ml 사

용하여 40°C에서 1시간 동안 作用하였을때 lactose分解生成物의 thin-layer chromatography이다.

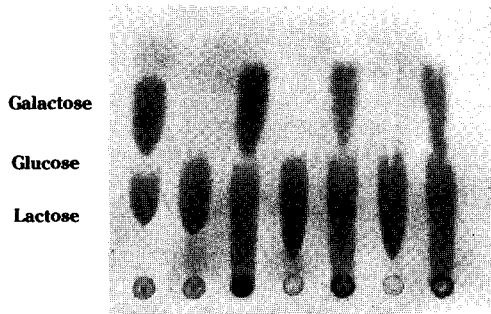


Fig. 10. Thin-layer Chromatogram of Lactose Hydrolysates by the β -Galactosidase.

(1) standard solution; (2) milk; (3) 10% skim milk solution; (4) 5% lactose solution. Lactose hydrolysis; 10 u/ml, at 40°C for 60 min.

Lactose分解와 온도와의 關係를 검토하기 위하여 β -galactosidase單位는 10u/ml로 4시간동안 50°C, 55°C 및 60°C에서 反應하였다. Fig. 11에서와 같이 5% lactose 용액에서는 lactose分解率이 각각 69.5%, 64.2%, 45.6%, 市乳에서는 88.7%, 84.8%, 70.9% 및 10% skim milk 용액에서는 72.6%, 72.6%, 52.6%로 되었다.

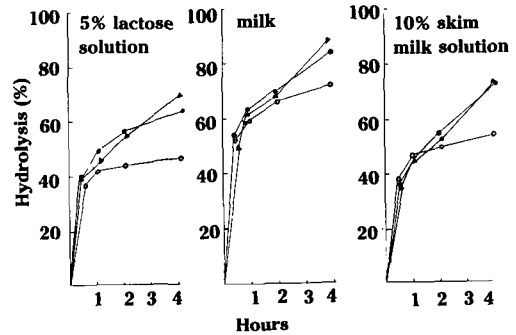


Fig. 11. Hydrolysis of Lactose in 5% Lactose Solution, Milk and 10% Skim Milk Solution by β -Galactosidase,

10u/ml. ▲-▲ 50°C; ●-●, 55°C; ○-○, 60°C.

乳製品貯藏溫度(4°C)에서 β -galactosidase單位를 2.5u/ml, 5.0u/ml, 10.0u/ml로 각각 72시간 동안까지 反應하였을 때 Fig. 12에서와 같이 5% lactose 용액에서는 lactose分解率이 60.2%, 64.0%, 70.0%, 市乳에서는 63.0%, 66.0%, 72.0% 및 10% skim milk에서는 60.4%, 64.0%, 70.0%로 되었다.

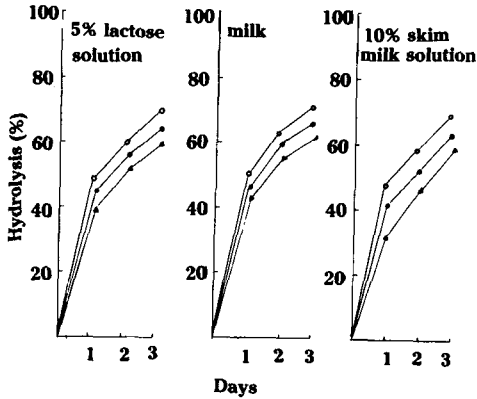


Fig. 12. Hydrolysis of Lactose in 5% Lactose Solution, Milk and 10% Skim Milk Solution by β -Galactosidase at 4°C.

▲-▲, 2.5 u/ml; ●-●, 5.0 u/ml; ○-○, 10 u/ml.

β -galactosidase의 乳製品應用에서 Dahlqvist등⁽²⁷⁾ 및 Mahoney등⁽²⁸⁾이 蛋白質은 β -galactosidase의 安定劑 혹은 活性劑로 보고한 바와 같이 純粹 lactose보다 乳蛋白質이 함유된 市乳 및 skim milk용액에서 lactose 分解率이 높았다.

요 약

純粹分離精製된 β -galactosidase의 分子量은 Sephadex G-200 gel filtration法에서 130,000이며 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis에서 130,000 외에 70,000이 확인되어 이 酵素는 70,000인 2개의 subunit로 構成되어 있다고 판단되었다.

酵素的 安定pH는 4.5~7.0이며 효소활성의 최적 pH는 4.7, 최적온도는 50°C 였다.

酵素活性 및 安定劑로 1가, 2가 금속 ion을 필요로 하지 않았으며 Cu^{++} 1mM에서 59%, galactose 100mM에서 48% 阻害되었다.

5% lactose 용액, 市乳 및 10% skim milk 용액에 이 정제된 β -galactosidase 10units/ml를 사용하여 50°C에서 4시간 동안 반응시켰을때 lactose가 각각 69.5%, 88.7% 및 72.6%가 glucose와 galactose로 轉換된 결과를 얻었다.

참 고 문 헌

- 1) Holsinger, V.H. : *Food Technol.*, **3**, 35 (1978)
- 2) Craven, G.R., E. Steers Jr. and C.B. Anfinsen : *J. Biol. Chem.*, **240**, 2468 (1965)
- 3) Mahoney, R.R. and J.R. Whitaker : *J. Food Sci.*, **43**, 584 (1978)

- 4) Lee, Y.C. and V. Wacek : *Arch. Biochem. Biophys.*, **138**, 264 (1970)
- 5) Widmer, F. and J.L. Leuba : *Eur. J. Biochem.*, **100**, 559 (1979)
- 6) Tanaka, Y., Kagamiishi A. Kiuchi and T. Horiuchi : *J. Biochem.*, **77**, 241 (1975)
- 7) Ogushi, S., T. Yoshimoto and D. Tsuru : *J. Ferment. Technol.*, **58**, 115 (1980)
- 8) Guy E. J., A. Tamsma, A. Kontson and V.H. Holsinger : *Food, Prod. Develop.* **8**(8), 50 (1974)
- 9) Holsinger, V.H. and N.E. Roberts : *Dairy and Ice cream Field*, **159**(3), 30 (1976)
- 10) O'Leary, V.S. and J.H. Woychik : *J. Food Science*, **41**, 791 (1976)
- 11) 吳平洙, 梁漢岳 : 産業微生物學會誌, **9**, 207 (1981)
- 12) Weber, K. and M. Osborn : *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406 (1969)
- 13) Andrews, P. : *Biochem. J.*, **91**, 222 (1964)
- 14) Andrews, P. : *ibid.*, **96**, 595 (1965)
- 15) Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall : *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
- 16) Wasko, M.E., and E.W. Rice : *Clin. Chem.*, **7**, 542 (1961)
- 17) Borglum, G.B. and M.Z. Sternberg : *J. Food Sci.*, **37**, 619 (1972)
- 18) Anema, P.J. : *Biochim. Biophys. Acta.*, **89**, 495 (1964)
- 19) Goodman, R.E. and D.M. Pederson : *Can. J. Bacteriol.*, **22**, 817 (1976)
- 20) Jagota, S.K., M.V. Ramana Rao and S.M. Dutta : *J. Food Sci.*, **46**, 161 (1981)
- 21) Biermann, L. and M.D. Glantz : *Biochim. Biophys. Acta.*, **167**, 373 (1968)
- 22) Wendorff, W.L. and C.H. Amundson : *J. Milk Food Technol.*, **34**, 300 (1971)
- 23) Comp, P.C. and G. Lester : *J. Bacteriol.*, **107**, 162 (1971)
- 24) Citti, T.E., W.E. Sandine and P.R. Elliker : *J. Bacteriol.*, **89**, 937 (1965)
- 25) Hu, A.S.L., R.G. Wolfe and F.J. Reithel : *Arch. Biochem. Biophys.*, **81**, 500 (1959)
- 26) Lineweaver, H. and D. Burk : *J. Am. Chem. Soc.*, **56**, 658 (1934)
- 27) Dahlqvist, A., N.G. Asp, A. Burvall and H. Rausing : *J. Dairy Res.*, **44**, 541 (1977)
- 28) Mahoney, R.R. and C. Adamchuk : *J. Food Sci.*, **45**, 962 (1980)