

고온성세균의 β -Galactosidase에 관한 연구 (II)

— 효소의 생산, 정제 및 정제효소의 성질 —

吳萬鎭, 李鍾秀, *金海中, 金燦祚

(忠南大學校 農科大學, *(株) 一和)

(1982년 10월 25일 수리)

Studies on the β -Galactosidase from Thermophilic Bacterium

— On the Production, Purification of Enzyme and the
Properties of the Purified Enzyme —

Man Jin Oh, Jong Soo Lee, *Hai Jung Kim and Chan Jo Kim

(College of Agriculture, Chungnam National University)

(*Laboratory of I ℓ Hwa Co.)

(Received October 25, 1982)

This experiment was carried out to optimize the condition for the enzyme production by selected strain in the basal medium, to purify the enzyme and to characterize the purified enzyme.

The results obtained were as follows.

1. The optimal conditions for the β -galactosidase production were initial pH 7.0 and temperature 65°C.
2. Enzyme was induced by the addition of lactose and galactose, and it was intracellular enzyme.
3. The purified enzyme was obtained with the increased level of activity approximately 28.5 folds as compared with crude enzyme and the yield of 15.2% by means of DEAE-Cellulose column chromatography, Sephadex G-150 gel filtration.
4. β -galactosidase from final step of purification showed a single protein band on polyacrylamide gel disc electrophoresis.
5. The optimal temperature and pH of the purified enzyme were 65°C, pH 6.5 for the hydrolysis of lactose.

前報¹⁾에서는 유당분해능이 높은 고온균을 토양으로부터 분리하여 동정함과 동시에 분리균주의 생리적 특성을 조사하여 보고한 바 있다.

우유 및 유제품가공에 있어서 실용성이 높은 β -galactosidase를 분비하는 균주로서는 *Sac. lactis*²⁾, *Sac. fragilis*³⁾ 등의 효모와 *Asp. oryzae*^{4,5,6)} 등의 사상균이 널리 이용되고 있으며 그밖에 많은 중온균에 의하여 생산된 효소에 대한 효소적 성질 등이 조사, 보고되어 왔다. Pastore⁷⁾ 등은 *Scopulariopsis* sp.을 밀기울 배지에 배양하여 조효소액을 얻어 (NH₄)₂SO₄, DEAE-Cellulose, CM-Cellulose를 이용하여 효소를 정제한 후 정제효소의 특성을 조사한 결과, 분자량은 95,000 이었으며 최적작용 pH는 3.5~5.0이었고 최적온도는 65°C이었다고 보고 하였다. Watanabe⁸⁾ 등은 *Pen. citrinum*을 밀기울 배지에 배양한 후 효소를 추출하여 정제한 결과 정제효소는 ONPG를 기질로

하였을 때 比活性은 약 100Unit이었으며 분자량은 100,000 정도이었다. 또한 Ogushi⁹⁾ 등은 *Asp. oryzae*를 배양하여 두 종류의 내산성효소를 분리 정제하여 특성을 조사한 결과, 한 효소의 최적작용조건은 pH4.5, 온도 50°C 이었고 또 다른 효소는 pH4.5, 온도 45°C 이었다고 보고하였다. 고온성 세균의 효소에 관한 연구로서는 *Bac. acidocaldarius*¹⁰⁾의 내열성 효소를 고정화하기 위하여 정제한 후 특성을 조사한 결과 최적작용 pH는 6.0, 온도는 65°C이었다. 또한 Ulrich¹¹⁾ 등은 고도호열균인 *Ther. aquaticus*의 효소는 lactose, galactose, melibiose에 의하여 유도되어졌고 최적작용온도는 80°C, pH는 5.0이었으며 내열성 이외의 효소적 성질은 중온균과 비슷하였다고 보고 하였다.

이와같이 미생물 기원의 효소는 각기 다른 성질을 가지고 있는바 유당이 적게 함유된 유제품

을 제조하는데 있어서 효소를 고정화하여 실용화하기 위해서는 효소의 열안정성, 우유 자체의 pH와 최적작용 pH와의 관계, 고정화 방법등이 고려되어야 할 것이다.

필자들은 β -galactosidase를 이용하여 우유 및 유제품 가공에 실용화하기 위한 기초자료를 얻고자 前報¹¹⁾에 이어 분리균주를 이용한 효소생산 조건과 정제방법을 검토하였으며 정제효소의 특성에 대한 실험을 수행한바 다음과 같은 결과를 얻었으므로 이에 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

공시균주

前報¹¹⁾에서 분리선정한 고온성 세균인 *Thermus* sp. Y-33을 공시균주로 하였다.

균의 배양 및 효소의 역가측정

前報¹¹⁾에서와 같은 방법으로 실시하였다.

효소의 생산조건

초발 pH와 배양온도: 분리배지를 기본배지로 하여 초발 pH를 4.5~8.0으로 조절한 다음 상기와 같은 방법으로 효소역가를 측정하고 최적 pH로 조절한 배지를 사용하여 50~75°C에서 각각 배양하여 효소역가를 측정, 비교하였다.

탄소원의 영향: 기본배지에 유당을 포함한 6종의 각종 탄소원을 2%씩 첨가하여 배양한 후 배양액의 효소역가를 측정, 비교하고 가장 효과적인 lactose와 galactose를 0.5~3.0%의 수준으로 첨가한 배지를 사용하여 효소생산을 위한 탄소원의 최적농도를 검토하였다.

배양시간에 따른 효소생산: 30ℓ용량의 jar fermentor로 배양하면서 균체의 생육도와 효소의 활성을 경시적으로 측정하였으며 균체의 생육도는 660nm에서 O.D를 측정하여 표시하였다.

반응생성물의 Thin layer chromatography

탈지분유와 lactose의 0.5% 수용액과 조효소액을 동량 혼합하여 65°C에서 3시간 반응시킨 후, 제단백하여 silicagel의 TLC plate에 spotting하였다. 다음, 전개제로 isopropyl alcohol-H₂O(4:1)를 이용하여 전개시킨 후, 건조시켜 aniline-diphenylamine phosphate, reagent¹²⁾로서 검출하였다.

효소의 정제

조효소액의 조제: 효소생산 최적배지에 선정균주를 접종하고 65°C에서 3일간 30ℓ용량의 jar

fermentor에 의하여 배양한 후 10,000g에서 연속원심분리기(Sorvall RC 2-B)를 이용하여 균체를 회수한 후 0.1M sodium phosphate buffer(pH 7.0)에 현탁시켜 초음파 균체파쇄기(Nihon

Seiki, Mdl-GT 170)로 10분간 파쇄한 후 다시 원심분리하고 상정액을 조효소액으로 하여 효소의 역가를 상기와 같은 방법으로 측정, 비교하였다.

효소정제과정: 조효소액을 0.1M KCl이 함유된 DEAE-cellulose의 column(0.1-M sodium phosphate buffer, pH 7.0)에 통과시켜 dialyzing tube에 넣어 탈염한 후 농축하여 다시 DEAE-cellulose를 이용하여 단백질을 흡착시킨 후 1.0M KCl로서 linear gradient method로서 유출시켜 분획한 후 효소활성이 강한 분획을 다시 농축하였다. 농축물을 Sephadex G-150으로 gel filtration하여 5ml씩 분취한 후 분석하였다. 위 정제방법을 요약하면 그림 1과 같다.

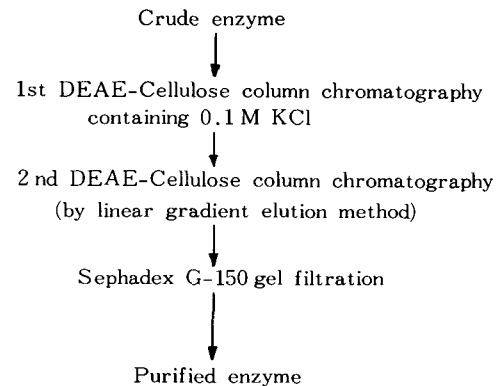


Fig. 1. Procedure for the purification of the β -galactosidase from the selected thermophile.

유출액의 분석: 분취된 각 분획물의 단백질을 Lowry법과¹³⁾ 280nm에서 O.D를 측정하여 표시하였다. 정제효소의 순도를 검정하기 위하여 Davis 법¹⁴⁾에 준하여 전기영동하였다. 즉, 7.5% polyacrylamide gel(0.5×6cm, pH 8.3)로서 column 당 2mA의 전류를 통하여 2시간 전개한 후 amido black 10B로 염색하여 7% acetic acid로서 탈색, 검정하였다.

효소학적 성질: Sephadex G-150에 의하여 β -galactosidase 활성을 가진 fraction을 모아 최적 작용온도와 pH 및 열안정성을 조사하여 활성이

가장 강한 부분을 100으로 한 상대적 활성으로 표시하였다.

결과 및 고찰

효소생산조건

효소생산을 위한 기본조건중 크게 영향을 미칠 것으로 생각되는 최적온도, pH 및 탄소원의 종류와 농도의 영향을 검토하였다.

배양온도와 초발 pH의 영향: 효소생산을 위한 최적온도를 검토하기 위하여 기본배지에 선성균주를 접종하고 균의 생리적 실험을 통하여 얻어진 결과로서 55~70°C에서 5°C 간격으로 2일간 진탕배양하였을 때 배양액의 효소역가는 그림 2와 같다.

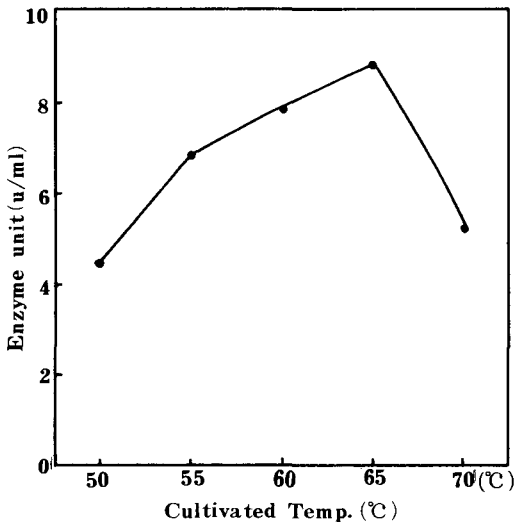


Fig. 2. Effect of cultural temperature on the β -galactosidase formation of *Thermus* sp.

Basal medium was composed of 3% of lactose, 0.5% poly peptone, 0.1% yeast extract, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , 0.025% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05% NaCl, 0.2% NH_4Cl .

The strain was cultured at various temperature 40hrs in shaking incubator.

그림 2에서와 같이 효소생산적온은 균주의 생육최적온도인 65~70°C보다 약간 낮은 편이었다. 또한 기본배지의 pH를 5.0~8.0까지 0.5 간격으로 조정하여 65°C에서 2일간 배양한 결과 *Thermus* sp.의 효소생성에 가장 알맞는 배지의 초발 pH는 6.5~7.0이었다. 본 균주는 pH에 대하여 대단히 예민하므로 효소생산에 있어 pH의 정확함

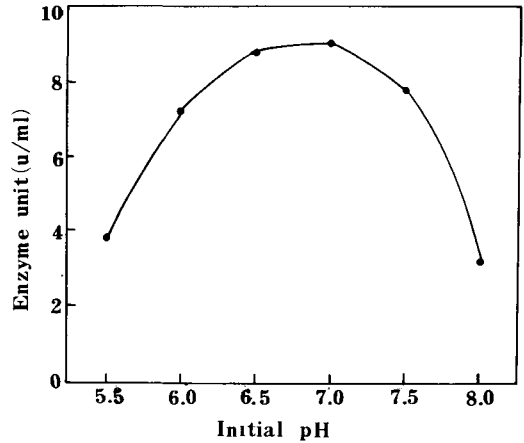


Fig. 3. Effect of initial pH of medium on the β -galactosidase formation of *Thermus* sp.

Basal medium was composed of as Fig.1 and the strain was cultured at 65°C for 48hrs in the shaking incubator.

관리와 조절이 중요한 것이라 하겠다.

탄소원의 영향: 기본배지에 2% 수준으로 탄소원의 종류를 달리하여 첨가한 후 배양하여 효소생성에 미치는 영향을 검토한 결과 그림 4에서

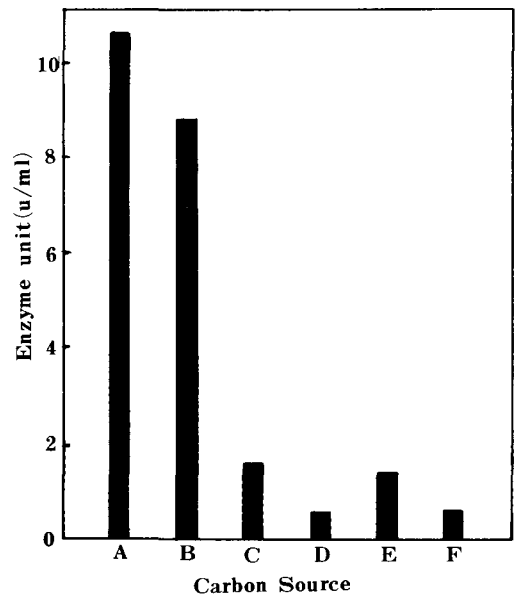


Fig. 4. Effect of carbon source on the β -galactosidase formation of *Thermus* sp.

- A : galactose B : lactose
- C : raffinose D : glucose
- E : melibiose F : soluble starch

보는 바와 같이 galactose와 lactose가 가장 효과적이었으며 melibiose와 starch는 균체의 생육은 되었으나 효소 생성량은 적었다. 또한 glucose는 균체의 생육은 왕성하였으나 효소 생성량은 검출되지 않을 정도로 낮은 결과를 나타내었다.

위 결과로부터 *Thermus* sp. Y-33 균주의 β -galactosidase는 lactose와 galactose에 의하여 유도되어지는 것을 알 수 있었다. Ulrich¹¹ 등의 연구에서는 고온균인 *Thermus aquaticus*의 β -galactosidase 생성은 lactose, galactose, melibiose에 의하여 유도되어졌고 glucose의 첨가는 효소합성에 있어 repression 효과를 나타내었다는 보고와 비교하여 볼 때 본 실험에서도 melibiose를 제외한 여타의 탄소원간에는 유사한 경향을 나타내었다.

본 실험에서 가장 효과적인 galactose와 lactose의 유효첨가농도를 검토한 결과는 그림 5와 같으며 lactose 첨가율은 1~2%, galactose 첨가율은 0.5~1.0%의 수준에서 효소생산이 가장 양호하였으며 그 이상에서는 오히려 저하하는 경향을 보였다.

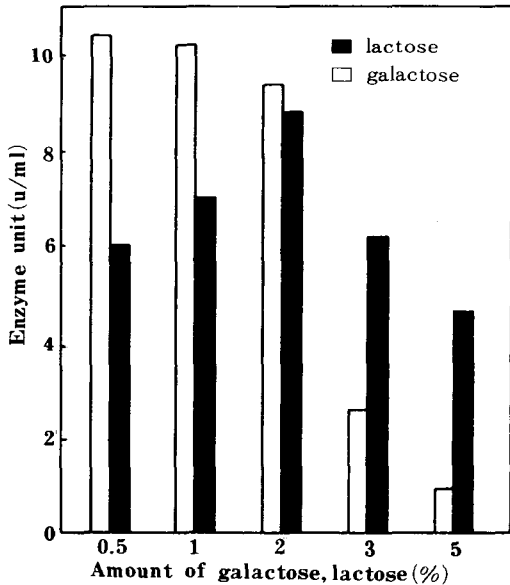


Fig. 5. Effect of the amount of lactose, galactose added to basal medium on the β -galactosidase formation of *Thermus* sp.

배양시간과 효소생산 : 이상의 실험 결과로부터 얻어진 자료를 기초로 효소생산에 적당하다고 인정된 조건에서 jar fermentor (cap : 30ℓ)를 이용하여 배양하면서 경시적으로 균체의 생육도와 배양

액중의 효소활성을 측정한 결과 그림 6과 같은 결과를 얻었다.

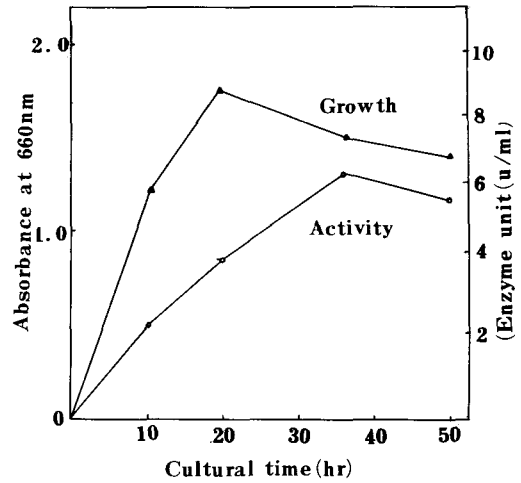


Fig. 6. Time course on the β -galactosidase formation and cell growth of *Thermus* sp. The strain was cultured in the optimum medium with jar fermentor (Cap. : 30ℓ)

그림 6에서와 같이 균체의 생육은 배양 18시간에서 가장 높았으며 효소활성은 배양 36시간에서 최고에 달한 후 점차 감소하는 경향을 보였는데 이는 고온에 의한 효소활성의 저하라 하겠다. 또한 배양액을 遠沈시켜 균체를 제거한 후 상정

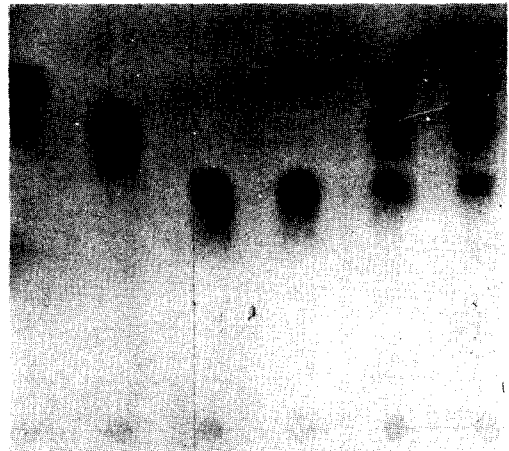


Fig. 7. Thin layer chromatography of reaction mixture.

- A : glucose
- B : galactose
- C : skim milk
- D : lactose
- E : lactose treated with crude enzyme
- F : skim milk treated with crude enzyme

액에 대한 효소활성을 동시에 측정하였던 바 상등액도 1/3 정도의 활성을 나타내었는데 이는 세포의 효소에 의한 것이 아니고 고온에 의해서 세포가 자기분해된 것으로 생각되었다.

반응생성물의 Thin layer chromatograph: 조효소액과 기질과의 반응생성물에 대한 당의 T. L. C 결과는 그림 7 과 같다.

그림 7에서와 같이 표준물질인 glucose와 galactose의 Rf 치는 각각 0.53, 0.47이고 lactose 는 0.36으로서 본 실험에 의하여 생산된 조효소액의 반응생성물의 Rf 치와 비교할 때 lactose를 잘 분해하여 glucose와 galactose로 하였다.

효소의 정제

Jar fermentor에 의하여 얻어진 배양액을 遠沈하여 균체를 회수한 다음, 0.1-M sodium phosphate buffer (pH 7.0)에 현탁시켜 균체를 파쇄하고 遠沈하여 얻어진 조효소액을 column chromatography와 gel-filtration하여 단백질과 효소역가를 측정한 결과는 그림 8, 9, 10과 같다.

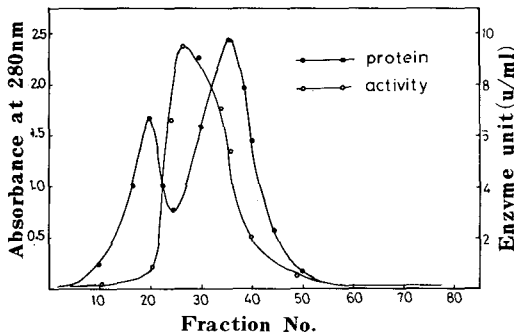


Fig. 8. Column chromatography of the β -galactosidase on DEAE-Cellulose containing 0.1M-KCl.

The column (3.0×5.0cm) was loaded with 100ml of crude enzyme and eluted with 0.1M sodium phosphate buffer (pH 7.0) at flow rate of 50ml per hr and the fraction of 10ml were collected.

이상의 정제과정에 따른 비활성도 및 효소정제 수율을 요약하면 표 1 과 같다.

정제효소의 Specific activity는 20.0 μ /mg, 단백질수율은 15.2%이었다. 상기 정제효소의 순도를 검정하기 위한 전기영동 결과는 그림 11과 같으며 상기 정제방법에 의해서 높은 순도의 효소가 얻어질 수 있었다.

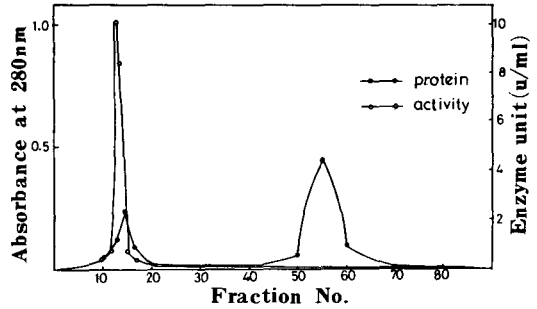


Fig. 9. Column chromatography of the β -galactosidase on DEAE-Cellulose.

The column was loaded with 50ml of the active fraction on DEAE-Cellulose column and washed with 0.1M sodium phosphate buffer (pH 7.0) at a flow rate of 100ml/hr. The absorbed enzyme was elute with a linear gradient of KCl from 0.1M to 1M and fraction of 10ml were collected.

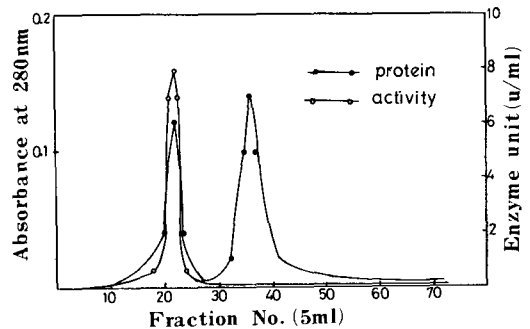


Fig. 10. Gel filtration of the β -galactosidase on Sephadex G-150.

3ml of enzyme solution were charged to gel filtration on a column (2.0×7.0cm) of sephadex G-150 at a flow rate of 10 ml per hr.

Table 1. Specific activity and yield on purification procedure of the β -galactosidase of *Thermus* sp.

Purified step	Total Protein(mg)	Total activity (unit)	Specific activity (u/mg protein)	Recovery (%)
Crude enzyme	2732.8	1992	0.71	100
1st DEAE-Cellulose	396.0	1272	3.2	63.8
2nd DEAE-Cellulose	43.2	638	14.8	32.0
Sephadex G-150	15.6	307	20.0	15.2

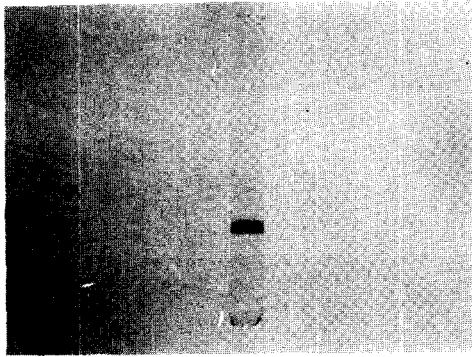


Fig. 11. Polyacrylamide gel electrophoresis of the purified enzyme.

Electrophoresis was carried out pH 8.3 with 7.5% polyacrylamide gel. gel was currented 2mA per each gel and stained with amido black 10B and destained with 7% acetic acid.

정제효소의 성질

효소활성에 미치는 온도의 영향: 효소작용의 최적온도를 조사하기 위하여 50~75°C 까지 5°C 간격으로 효소활성을 측정하여 결과는 그림 12와 같으며 작용 최적온도는 65°C 이었고 75°C 이상에

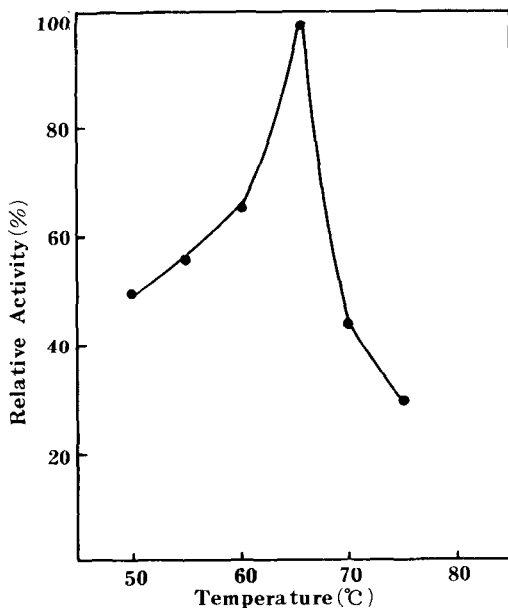


Fig. 12. Effect of temperature on activity of the β -galactosidase.

Reaction mixture was kept at various temperature for 60 min with gentle shaking. The buffer was 0.1M sodium phosphate buffer (pH 7.0)

서는 적은 효소활성을 나타내었으며 80°C 이상과 50°C 이하에서는 거의 작용하지 못하였다

다른 미생물 기원의 β -galactosidase의 최적작용온도를 보면 lactobacillus bulgaricus의 효소⁽¹⁵⁾는 55°C, E. coli의 효소는 50°C, Kluyveromyces sp.의 효소는 37°C, Bacillus sp.의 효소⁽¹⁶⁾는 45°C, 중등도호열균인 Bacillus acidocaldarius의 효소⁽¹⁰⁾는 65°C 이었으며 Thermus aquaticus의 효소는 80°C 이었고 Thermus thermophilus의 효소⁽¹⁷⁾는 85°C 이었다. 본 균의 β -galactosidase의 최적작용온도는 중온균의 효소보다는 15°C 정도 높았으며 중등도 호열균의 효소와 비슷하였고, 고도호열균의 효소보다는 15°C 정도 낮은 온도에서 잘 작용하였다.

효소의 안정도에 미치는 온도의 영향: 정제효소액을 0.1-M sodium phosphate buffer (pH 7.0)에서 50~80°C의 온도로 처리하면서 시간에 따른 잔존활성을 측정하여 결과는 그림 13과 같다.

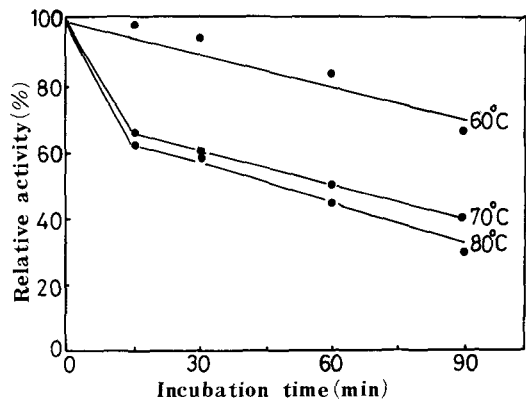


Fig. 13. Heat stability of the β -galactosidase of Thermus sp.

그림에서와 같이 90분간 처리하였을 때 60°C 이하의 온도에서는 잔존활성이 75%이었고 70°C에서 잔존활성은 38%이었고 80°C에서는 20% 정도이었다. 또한 비등수에서 20분간 처리하였을 때 잔존활성은 거의 없었다. 상기 결과를 볼 때 본 효소는 중온균효소의 것과 비교하여 볼 때 열안정성이 높은 것이라 할 수 있겠다.

효소활성에 미치는 pH의 영향: 0.1-M sodium phosphate buffer를 이용하여 효소활성에 미치는 pH의 영향을 조사한 결과는 그림 14와 같으며 본 균이 생산하는 β -galactosidase의 최적작용 pH는 6.5 이었다.

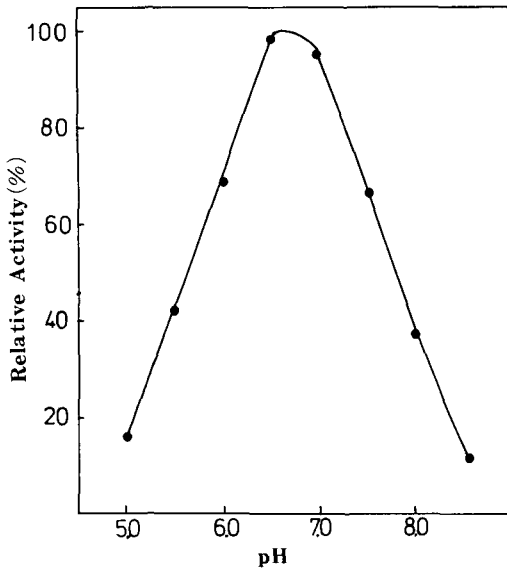


Fig. 14. Effect of pH on activity of the β -galactosidase.

Reaction mixture was kept at 60°C for 30 min with gentle shaking. The buffer was adjusted to each pH indicated.

한편 β -galactosidase의 최적 pH는 *Thermus aquaticus*의 효소⁽¹¹⁾는 pH 5.0, *Bacillus* sp.의 효소는 pH 6.5, *Lactobacillus*의 효소⁽¹⁵⁾는 pH 5.5, *E. coli*의 효소는 pH 7.5, *Kluyvermyces lactis*의 효소⁽¹⁵⁾는 pH 6.3이라고 각각 보고하였으며 최적 pH는 Bac. sp.의 효소 pH 6.5와 비슷하였다.

요 약

전보에서 분리 동정한 Y-33 균주의 β -galactosidase 효소생산조건을 검토하고 효소를 정제하여 정제효소의 성질을 조사한 결과는 다음과 같다.

1. 효소생산을 위한 최적초발 pH는 7.0이었고 최적온도는 65°C 이었다.
2. 효소는 lactose와 galactose에 의하여 유도되어졌으며 세포내효소 이었다.
3. 조효소액을 1차 DEAE-cellulose, 2차 DEAE-cellulose column chromatography 및 Sephadex G-150 로 gel filtration 하여 정제도가 28.3 배, 수율이 15.2%의 정제효소를 얻었다.

4. 정제효소는 polyacrylamide gel 전기영동에 의하여 순도가 검정되었다.

5. 정제효소의 유당가수분해를 위한 최적작용 온도는 65°C, pH는 6.5이었다.

參 考 文 獻

1. 前報 李鍾秀, 吳萬鎭, 李錫健, 金燦祚, 한국 산업미생물학회지 **11**, (1983)
2. 野本正雄, 化學と生物, **20**, 317 (1982)
3. Uwajima, T. H. Yagi and O. Terada. *Agric. Biol. Chem.* **36**, 570 (1972)
4. Tanaka, Y. A. Kaganishima, A. Kiuchi and T. Horiuchi. *J. Biochem.* **77**, 241 (1975)
5. Akashi, M. M. Suzuki, I. Funakoshi and I. Yamashina. *J. Biochem.* **80**, 1195 (1976)
6. Mega, T. Matsushima, Y. *J. Biochem.* **85**, 335 (1979)
7. Pastore G. M. and Y. K. Park. *J. Ferment. Technol.* **58**, 79 (1980)
8. Watanabe, Y. Y. Kibesaki, S. Takenshi, K. Sakai and Y. Tsujisaka. *Agric. Biol. Chem.* **43**, 943 (1979)
9. Ogushi, S. T. Yoshimato, and D. Tsuru. *J. Ferment. Technol.* **58**, 115 (1980)
10. Kobayashi, T. Y. Hirose, K. Ohmiya, S. Shimizu, F. Uchino, *J. Ferment. Technol.* **56**, 309 (1978)
11. Ulrich, J. L. Mcfeters G. A. and K. L. Temple. *J. Bacteriol* **110**, 691 (1972)
12. Zweig, C, and J. Sherma, *Handbook of Chromatography*, **463**, CRC Press Cleveland (1972)
13. Lowry D. H, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. *J. Biol. Chem.* **265**, 193 (1951)
14. Davis B. J. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**, 404 (1964)
15. Ohmiya, K. Ohashi, H. Kobayashi, T. S. Shimiji, *Applied and environmental microbiology.* **33**, 137 (1977)
16. Ikura, Y. and K. Horikoshi. *Agric. Biol. C. em.* **43**, 85 (1979)
17. 山口勝成, 犬官邦雄, 山林孟清水祥一, 日本農藝化學會講演要旨集, 昭和 54年度, 酵素 **337** (1979)