

*Lactobacillus sporogenes*에 의한 β -Galactosidase 생산에 관한 연구 — β -Galactosidase의 효소학적 성질 및 응용 —

김영만 · 이정치 · 최용진* · 양한철*

일동제약(주) 중앙연구소

*고려대학교 유전공학과

(1985년 9월 3일 수리)

Studies on the Production of β -Galactosidase by *Lactobacillus sporogenes* — Properties and Application of β -Galactosidase —

Young Man Kim, Jung Chi Lee, Yong Jin Choi* and Han Chul Yang*

Research Laboratories, Il Dong Pharm. Co., Ltd.

*Dept. of Genetic Engineering, Korea University

(Received September 3, 1985)

The purified β -galactosidase from *L. sporogenes* was most active at pH 7.0 and 60°C with O-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG) in 0.05 M phosphate buffer. It was stable over a pH range from 5.0 to 9.0 and lost less than 10% of its activity after heating for 30 minutes at 60°C and pH 7.0. All the mineral ions examined in this work showed no significant activating effect, whereas L-cysteine exerted a great stimulatory effect on the enzyme activity at the concentration of 10 mM. The Km values were 1.2 mM for ONPG and 33.3 mM for lactose. Approximately 85% of lactose in cow's milk, in 10% skim milk and in 5% lactose solution was hydrolyzed after 4 hours incubation at 60°C with 2 units of the purified β -galactosidase per ml of the substrate solutions. The β -galactosidase from *L. sporogenes*, therefore, is considered to be suitable for hydrolysis of lactose in milk and other dairy products.

β -Galactosidase는 낙농공업에서 우유나 기타 유가공품 특히 whey에서 lactose 함량을 낮추기 위하여 주로 이용되는 가수분해효소⁽¹⁾이다. 이와같이 β -galactosidase를 유가공에 이용할 때에는 우선 중성의 pH에서 최적활성을 나타내야하고 또한 용이하게 효소제품을 만들 수 있어야만 한다⁽²⁾. 그런데 대부분의 곰팡이 β -galactosidase는 약산성에서 최적활성을 나타내고, 세균과 효모는 중성 pH에서 최적활성을 나타내나 대부분의 경우 균체내 효소를 생산하므로 별도로 효소를 추출해야한다.

그러나 본 연구에 사용한 유포자 유산균인 *L. sporogenes*는 특이하게 균체의 β -galactosidase를 다량 생산하므로⁽³⁾ 이 효소의 기본적인 성질을 이해하여 식품과 의약품등에 보다 효과적으로 응용하기 위한 기초자료로서 효소학적 성질과 실제 유당분해율을 조사하였다.

재료 및 방법

Lactose를 기질로 한 효소활성의 측정

Lactose를 기질로 사용한 β -galactosidase활성은

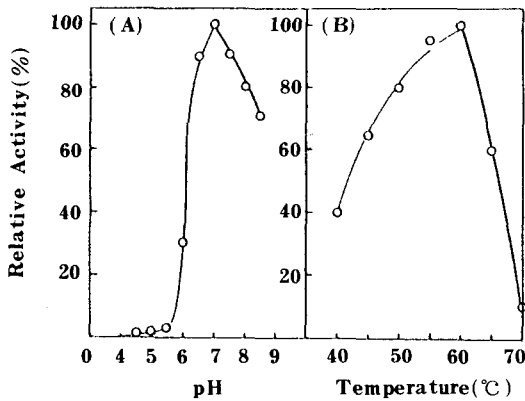


Fig. 1. Effect of pH(A) and temperature (B) on the activity of β -galactosidase.

(A) : The reaction was carried out at various pH under the assay conditions. The buffers used were: pH 4.0-5.5, 0.05 M McIlvaine buffer; pH 6.0-7.5, 0.05 M phosphate buffer; pH 8.0-8.5, 0.05 M Tris-acetate buffer.

(B) : The reaction was carried out at various temperature under the assay conditions.

Jasewicz와 Wasserman의 방법⁽⁴⁾을 개량하여 측정 하였으며, 효소활성의 단위는 최적 조건에서 1분 동안에 1 μ mole의 glucose를 유리시키는데 필요한 효소 활성량을 1단위로 표시하였다.

유당 분해율의 측정

시유 (pH 6.6, lactose 농도 4.5%) 100ml, 0.05 M 인산염 완충용액 (pH 7.0)에 lactose와 skim milk를 용해한 5% lactose-용액 100ml 및 10% skim milk-용액 (lactose 5.2% 용액) 100ml에 L-cysteine을 각각 2mM과 정제된 β -galactosidase를 ml당 1, 2, 5, 10 units가 되도록 첨가, 잘 혼합하고 60°C에서 반응시키면서 일정시간 간격으로 시료를 채취하여 glucose를 정량, 유당으로 환산한 유당 감소율 즉 유당 분해율을 측정하였다. 기타 본 실험에서 사용한 재료 및 방법은 전보⁽³⁾에서 자세히 기술하였다.

결과 및 고찰

1) 효소학적 성질

최적 pH와 온도

O-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (이하 ONPG로 생략)를 기질로 사용하여 β -galactosidase 활성에 미치는 pH와 온도의 효과를 조사한 결과, Fig. 1과 Table 1에 표시한 바와 같이 0.05M

Table 1. Effect of various buffers on the activity of β -galactosidase.

Assay buffers (pH 7.0)	Concentration (M)	Purified enzyme	
		Activity (units/ml)	Relative activity (%)
Sodium phosphate buffer	0.05	520.05	100
Tris-acetate buffer	0.05	239.43	46
McIlvaine buffer	0.05	494.48	95
Potassium phosphate	0.05	520.50	100
Sodium phosphate buffer	0.01	260.53	50
Sodium phosphate buffer	0.02	483.01	92.7
Sodium phosphate buffer	0.05	521.05	100
Sodium phosphate buffer	0.1	484.79	94
Sodium phosphate buffer	0.2	474.16	91

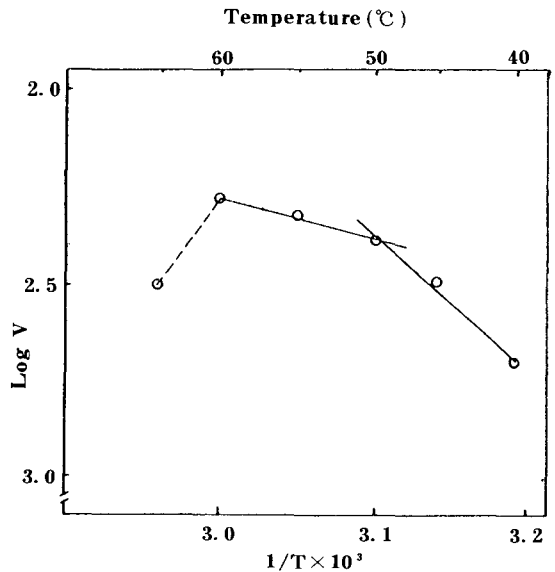


Fig. 2. Arrhenius plot of enzyme activity against temperature.

Activity was measured using ONPG as a substrate over the temperature range of 40°C to 65°C under the conditions as stated in the assay.

인산염 완충용액으로 pH 7.0과 60°C에서 최고의 효소활성을 나타내었다.

Table 2. Effect of sulfhydryl compounds on the activity of β -galactosidase.

SH-containing compounds	Concentration (mM)	Purified enzyme	
		Activity (units/ml)	Relative activity (%)
None	—	77.9	100
L-Cysteine	1	299.4	384.3
L-Cysteine	5	412.7	529.8
L-Cysteine	10	524.6	673.4
L-Cysteine	20	501.8	644.2
L-Cysteine	50	37.4	48.01
β -Mercaptoethanol	1	206.1	264.6
β -Mercaptoethanol	5	245.1	314.6
β -Mercaptoethanol	10	288.2	370.0
β -Mercaptoethanol	20	339.6	436.0
β -Mercaptoethanol	50	386.0	495.5
β -Mercaptoethanol	70	376.7	483.6

또한 pH 6.6(보통 시유의 pH)과 pH 6.3 (whey의 pH)에서도 최고활성의 90% 이상을 나타내므로 이 효소는 낙농공업 응용⁽⁵⁾에 적합할 것으로 판단된다.

한편 반응온도에 따른 기질(ONPG)의 가수분해 속도에 대한 실험결과(Fig. 1)를 이용하여 Arrhenius plot에 의하여 activation energy를 구한 결과 Fig. 2와 같이 50~60°C 사이에서는 5,800 cal/mole, 40~50°C 사이에서는 13,300 cal/mole의 값을 나타냈다. 이 값은 *B. stearothermophilus*⁽⁶⁾의 β -galactosidase가 16,000 cal/mole (47°C 이상)과 24,000 cal/mole (47°C 이하)보다는 현저히 작은 값이고, *Str. thermophilus*⁽⁷⁾의 7,200 cal/mole (45~55°C)와 8,800 cal/mole (25°C~45°C)와는 거의 비슷한 activation energy를 나타냄으로서 실제 응용시 energy공급면에서도 타균주에서 얻은 β -galactosidase보다 결코 불리하다고 생각되지 않는다.

Sulfhydryl compounds의 효과

L-Cysteine과 β -mercaptoethanol의 첨가는 Table 2와 같이 효소활성을 크게 촉진하고 특히 L-cysteine을 10mM 첨가했을 때 효소활성이 약 6.7배의 증가를 나타냄으로 이 효소는 효소활성 중심에 sulfhydryl group을 가지고 있다고 생각할 수 있다.

Greenberg와 Mahoney⁽⁷⁾가 *Str. thermophilus*의 β -galactosidase에 관한 연구에서 효소활성에 cys-

Table 3. Effect of various sugars on the β -galactosidase activity.

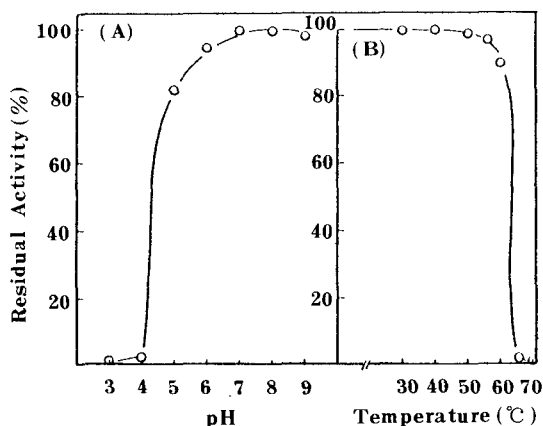
Sugars	Concentration (mM)	Purified enzyme	
		Activity (units/ml)	Relative activity (%)
None	—	524.4	100
Lactose	5	436.9	83
Lactose	10	391.1	74.3
Galactose	5	492.7	93.6
Galactose	10	469.0	89.1
Glucose	5	461.7	87.7
Glucose	10	410.6	78.0

The reactions were performed for 10 minutes at 60°C in the standard reaction mixture described in the enzyme assay.

teine, dithioerythritol, glutathione 등의 환원제가 필요하다는 보고와 일치한다.

당류의 효과

효소활성에 미치는 lactose, galactose, glucose 등의 당류 첨가효과는 Table 3에 표시되어 있는 바

**Fig. 3. Influence of pH (A) and temperature (B) on stability of β -galactosidase.**

(A) : The enzyme was preincubated at various pH and 37°C for 3 hr, and then the solution was adjusted to pH 7.0 with 0.05 M phosphate standard assay conditions. The buffer used were: pH 3-5, 0.05 M Mcllvaine buffer; pH 6.0-7.0, 0.05 M phosphate buffer; pH 8.0-9.0, 0.05 M Tris-acetate buffer.

(B) : The enzyme was heated at various temperatures and pH 7.0 (0.05 M phosphate buffer) for 30 min, and then the solution was diluted 10-fold with cold 0.05 M phosphate buffer (pH 7.0) and the remaining activity was determined under standard assay conditions.

와 같이 세가지 당류 모두 효소활성을 저해하였으며 높은 농도에서 더 큰 저해효과를 나타냈다.

Goodman⁽⁶⁾등도 *B. stearothermophilus*의 β -galactosidase활성에 미치는 각종 당류의 저해효과에 대한 연구에서 이와 비슷한 결과를 보고하였다.

효소의 안정성

pH별 안정성 시험에서는 Fig. 3과 같이 pH 5~9 범위에서는 상당히 안정하였다. 그러나 pH 5 이하에서는 급격히 불활성화되는 경향을 보임으로서 본 효소는 산에 대해 약한 것으로 나타났으며, 한편 내열성은 60℃에서 30분동안 열처리하여도 90% 정도의 잔존활성을 나타냄으로서 상당히 안정한 효소임이 판명되었다. 따라서 Taba⁽⁸⁾등이 보고한 다른 유산균 β -galactosidase와 *B. megaterium*⁽⁹⁾, *Str. thermophilus*⁽⁷⁾, *B. subtilis*⁽¹⁰⁾등의 β -galactosidase 보다 본 효소의 내열성이 우수하므로 산업적인 고온처리 응용에 더욱 적합할 것으로 생각된다.

효소의 기질특이성

ONPG와 lactose를 기질로 사용하여 pH 7.0 과 60℃에서 Lineweaver-Burk plot⁽¹¹⁾에 의해 Michaelis constant(Km)를 구한 결과는 Fig. 4와 같이 ONPG에서는 1.2mM, lactose에서는 33.3 mM

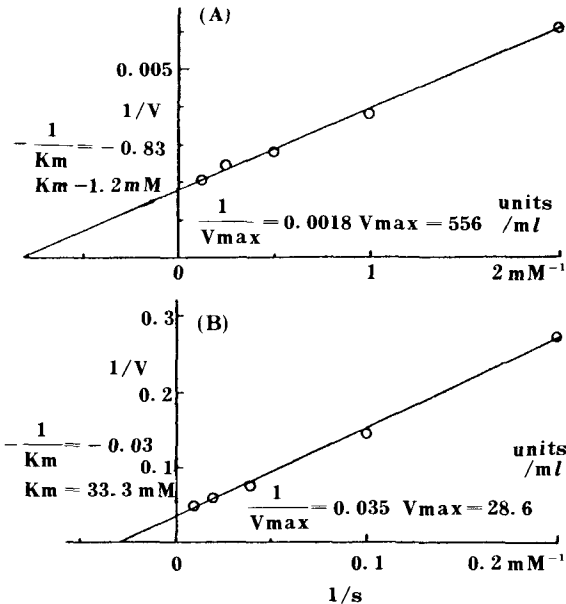


Fig. 4. Lineweaver-Burk double reciprocal plot for the determination of the Michaelis constant for the hydrolysis of ONPG (A) and lactose (B) as substrate.

Table 4. Substrate specificity of β -galactosidase from *L. sporogenes*.

Galactosides	Km ^a (mM)	Vmax ^{a,b} (units/ml)	Relative ^c activity
Lactose	33.3	28.6	1
O-Nitrophenyl- β -D-galactopyranoside	1.2	556	19.4

- a, Km and Vmax were obtain from Lineweaver -Burk plots.
- b, Vmax is expressed as μ moles of hydrolyzed substrate per min per ml of purified enzyme solution.
- c, Relative activity is expressed as ONPG/lactose ratio of β -galactosidase activity.

이고, Vmax 값은 ONPG에서는 556units/min/ml, lactose에서는 28.6units/min/ml 이었다. 즉, ONPG 기질에 대한 효소활성이 lactose 기질에 대한 효소활성보다 약 19배 (Table 4) 높고, 또한 ONPG의 Km 값이 lactose의 Km 값보다 작은 것으로 보아 본 효소는 ONPG에 대한 친화력이 더 큰 것을 알 수 있다. 이 결과는 Toba⁽⁸⁾이 보고한 다른 유산균 β -galactosidase의 lactose에 대한 ONPG 분해비율이 4.7~62.56으로 보고한 결과와 비교할 때 중간 정도의 값을 나타내고 있다.

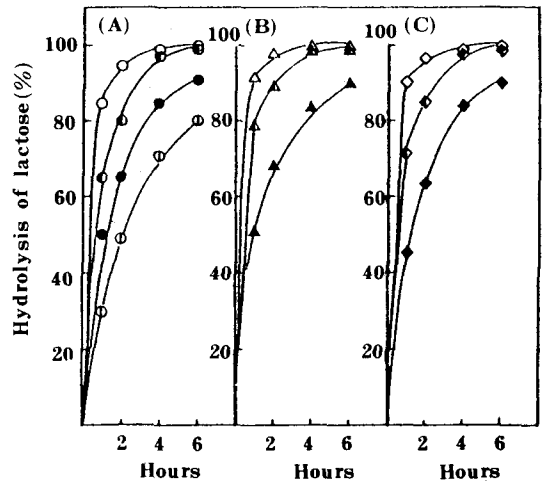


Fig. 5. Hydrolysis of lactose in 5% lactose solution (A), in cow's milk (B) and in 10% skim milk solution (C) by β -galactosidase from *L. sporogenes*.

Symbols used: (□), 1 units/ml; (●), 2 units/ml; (○), 5 units/ml; (○), 10 units/ml; (▲), 2 units/ml; (▲), 5 units/ml; (△), 10 units/ml; (◆), 2 units/ml; (◆), 5 units/ml; (◇), 10 units/ml.

2) 유제품의 유당분해

정제한 β -galactosidase를 시유나 기타 낙농제품 가공에 응용하기 위하여 pH 7.0의 0.05M 인산염 완충용액에 5% lactose 용액을 만들어 효소를 1, 2, 5, 10 units/ml의 농도로 첨가하고 60°C에서 6시간 까지 반응시킨 결과, Fig. 5와 같이 10 units/ml 첨가에서는 1시간동안에 유당 분해율이 85% 이상, 2 units/ml 첨가에서는 4시간에 유당 분해율이 85% 이상으로 나타났다. 다음에 시유와 10% skim milk 용액에 응용한 결과, lactose 용액의 경우와 마찬가지로 10 units/ml 첨가에서 1시간동안에 유당 분해율이 90%, 2 units/ml 첨가했을 때에는 4시간동안에 유당 분해율이 85%로 나타났다.

이와같은 결과는 *Asp. oryzae*¹²⁾의 β -galactosidase를 whey (pH 4.5)와 시유 (pH 6.5)에 0.1 units/ml 첨가하고 55°C에서 반응시킨 결과, 유당 분해율이 whey에서는 72시간 후에 83%이고 시유에서는 pH가 6.5로 중성이기 때문에 유당이 거의 분해되지 않았다는 보고와 Blankenship와 Wells¹³⁾가 보고한 상품화된 β -galactosidase 10가지를 skim milk (pH는 중성)에 각각 3 units/ml 첨가하고 35°C에서 3시간 처리한 후 유당 분해율이 38.2~51.4%로 보고한 자료와는 비록 반응조건은 다르나 본 효소가 유당 분해율이 우수한 것으로 나타났다.

요 약

*L. sporogenes*가 생산하는 β -galactosidase의 효소학적 성질을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

ONPG를 기질로 하였을때 0.05M 인산염 완충용액을 사용하여 pH 7.0과 반응온도 60°C에서 가장 높은 효소활성을 나타냈으며 또한 본 효소반응의 activation energy는 50~60°C에서 5,800cal/mole 이었다. 효소활성에 미치는 무기염류의 효과는 어느 것도 뚜렷한 첨가효과를 나타내지 않았으나 L-cysteine 10mM 첨가했을때 효소활성이 약 6.7배정도 증가됨으로써 본 효소는 sulfhydryl enzyme 특성을 보였다.

한편 lactose와 ONPG에 대한 Michaelis constant는 각각 33.3mM, 1.2mM을 나타냈다.

특히 본 효소는 중성 범위의 pH와 60°C에서 30분간 열처리 후에도 약 90% 정도의 잔존활성을 나타낼 뿐만아니라 시유와 10% skim milk 용액에 10 units/ml의 효소를 첨가, 60°C에서 1시간 처리후에 유당 분해율이 90%, 2 units/ml 첨가하여 4시간 반응 후에 유당 분해율이 85% 정도 가수분해 시킴과 동시에 균체의 효소라는 장점도 아울러 가지고 있어 식품공업에의 그 이용 가능성이 매우 높다고 하겠다.

참고문헌

1. Mahoney, R.R. and J.R. Whitaker: *J. Food Sci.*, **43**, 584 (1978)
2. Watanabe, Y., Y. Kibesaki, S. Takenishi, K. Sakai and Y. Tsujisaka: *Agr. Biol. Chem.*, **43**, 943 (1979)
3. Kim, Y.M., J.C. Lee, P.K. Chung, Y.J. Choi and H.C. Yang: *Kore. J. Appl. Microbiol., Bioeng.*, **11**, 59 (1983)
4. Jasewicz, L. and A.E. Wasserman: *J. Dairy Sci.*, **44**, 393 (1961)
5. Blankenship, L.C. and P.A. Wells: *J. Milk Food Technol.*, **37**, 199 (1974)
6. Goodman, R.E. and D.M. Pederson: *Can. J. Microbiol.*, **22**, 817 (1976)
7. Greenberg, N.A. and R.R. Mahoney: *J. Food Sci.*, **47**, 1824 (1982)
8. Toba, T., Y. Tomita, T. Itoh and S. Adach: *J. Dairy Sci.*, **64**, 185 (1981)
9. Landman, O.E.: *Biochem. Biophys. Acta*, **23**, 558 (1957)
10. Anema, P.J.: *Biochem. Biophys. Acta*, **89**, 495 (1964)
11. Lineweaver, H. and D. Burk: *J. Am. Chem. Soc.*, **56**, 658 (1934)
12. Park, Y.K., M.S.S. DeSanti and G.M. Pastore: *J. Food Sci.*, **44**, 100 (1979)
13. Blankenship, L.C. and P.A. Wells: *J. Milk Food Technol.*, **37**, 199 (1974)