

Poly(ethylene glycol)/인산염 용액 2상계를 이용한 *Lactobacillus sporogenes* 가 생산하는 균체내 β -Galactosidase 의 추출 분리에 관한 연구

이삼빈¹ · 김영만² · 이철호^{1*}

¹고려대학교 농과대학 식품공학과 ²일동제약(주)

Purification of Intracellular β -Galactosidase from *Lactobacillus sporogenes* in an Aqueous Poly(ethylene glycol)- Potassium Phosphate Two-Phase System

Lee, Sam-Pin,¹ Young-Man Kim² and Cherl-Ho Lee^{1*}

¹Department of Food Technology, College of Agriculture, Korea University, Seoul 132, Korea
²Il-dong Pharmaceutical Co., Ltd.

Poly(ethylene glycol) -PPB two phase system was used for the purification of β -galactosidase from *Lactobacillus sporogenes*. The smaller the molecular weight of concentration of PEG phase increased, proteins as well as β -galactosidase was partitioned into the top phase. All cell debris were confined to the potassium phosphate phase (bottom phase), approached to the binodial line. The purification ratio increased by changing the polymer-salt composition of the tie line towards higher salt concentrations. It was also possible to obtain higher purification of the enzyme after two-step extraction using PEG 1000 and PEG 300. The top phase contained 74% of the total β -galactosidase with a purification factor of 2.1.

β -Galactosidase(lactose, β -D-galactoside galactohydrolase, EC 3, 2, 1, 23)는 lactose 의 β -galactoside 결합을 가수분해하여 glucose 와 galactose 를 생산하는 반응을 촉매하는 효소로 동물, 식물, 미생물 등 자연에 널리 분포되어 있다. 이 β -galactosidase 를 생산하는 미생물중 곰팡이는 효소를 균체외로 constitutive 하게 합성하나 대부분의 세균과 효모는 균체내로 inducible 하게 합성한다. 그러나 유포자 유산균인 *Lactobacillus sporogenes* 는 다른 β -galactosidase 생산 세균과는 달리 배양시간에 따라 균체내에서 균체외로 β -galactosidase 를 다량 생산하는 것이 보고되고 있다(1). 저자들은 poly(ethylene glycol)/salt 액상 2상계에서 표면 소수성이 다른 기준 단백질들의 분획을 관찰한 바 있으며(2), Veide(3, 4) 등은 *E. coli* 로부터 생산하는 균체내 효소인 β -galactosidase 의 분리에서 PEG/salt 액상 2상계

를 이용한 1 단계 추출로 세포벽 파쇄물의 제거와 효소의 효과적인 분리를 보고한 바 있다.

본 실험에서는 균체내 효소들의 분리시 문제가 되는 cell debris 제거와 연속적인 분리공정을 할 수 있는 PEG/salt 액상 2상계를 이용하여 *Lactobacillus sporogenes* 로부터 생산되는 균체내 효소인 β -galactosidase 를 추출 분리하고 이들의 정제 효과를 관찰하였다.

실험재료 및 방법

재 료

폴리에틸렌 글라이콜(PEG) 6000, 1000, 300은 Fluka Chemical(CH-9470 Buchs, Switzerland)에서 구입했으며, potassium phosphate 는 Kanto Chemical(Japan)에서, 탄백질 염색시약과 o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside 및 albumin

Key words: β -Galactosidase, *Lactobacillus sporogenes*, two-phase system

*Corresponding author

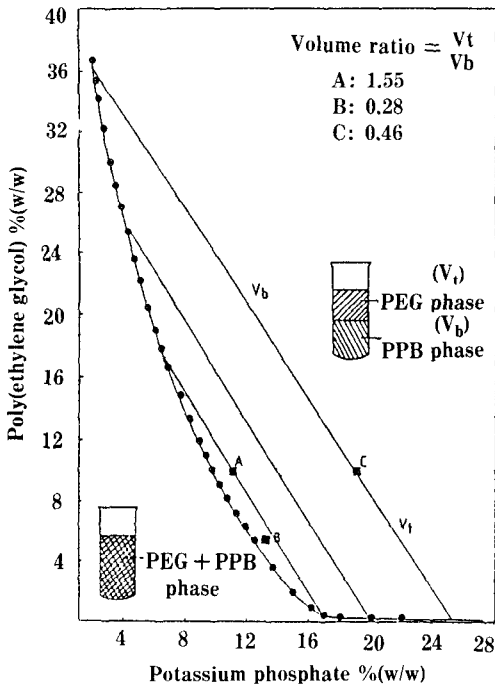


Fig. 1. Phase diagram showing the volume ratios and tie lines obtained near and far away from the binodial line.

(PEG 6000, Fluka; $K_2HPO_4/KH_2PO_4 = 1.43$ molar ratio, 32.8%, pH 7.4) at 20°C.

bovine, β -lactoglobulin, lysozyme, ovalbumin 들은 Sigma Chemical (St. Louis, Mo USA)에서 구입했다.

세포 파쇄물 제조

진탕 flask 배양으로 pH 6.8, 배양온도 45°C 조건에서 24시간 배양된 *Lactobacillus sporogenes* 의 균

체들을 10,000 rpm에서 20분간 원심분리하면서 0.1 M 인산염 완충용액 (pH 7.0)으로 5회 세척한 후 -10°C 냉동고에서 15 ml cap tube 에 나누어 보관시켰다. 실험시에 이것을 해동한 후 20%(w/w) 세포 분산액을 만들어 초음파 파쇄기에서 30분간 0-4°C를 유지시키면서 균체를 파쇄시켰다.

PEG/salt 액상 2상계에서 균체 내용물들의 분획

Phase 형성 중합체 용액 (5 ml) 과 균체파쇄물 (0.1 ml) 을 눈금이 있는 15 ml 원심분리 cap tube 에 넣고 20회 혼합한 후 2400 rpm 에서 5 분간 원심분리하였다. 이때 형성된 상층부와 하층부 상에서 각각 1.0g씩을 취하여 5 배 희석한 후 280 nm 에서 측정된 흡광도로부터 분획 계수를 정했으며, 균체 파편 (cell debris) 들의 분획은 상·하층부의 혼탁도 (turbidity) 로부터 결정하였다.

효소 역가 및 단백질 농도 측정

효소활성은 Veide(3) 방법에 의해서 기질(o-NPG)의 분해 속도로서 결정했다. 10 mM L-cysteine 를 포함하는 0.1 M 인산염 완충용액 (pH 7.0) 속 에 있는 5 mM o-NPG 가 가수분해되어 생기는 노란색의 흡광도를 420 nm 에서 측정하였다. 효소 역가 단위 1 unit 는 60°C 에서 1 분 동안에 기질(o-NPG) 1.0 mmole 이 가수분해되는 것으로 결정했다(1). 단백질 농도는 Bradford(5,6)의 dye-binding 방법에 따라 측정했으며, 이때 사용한 염색물질은 Coomassie brilliant blue G-250 0.01% (w/w), 에탄올 4.7% (w/w) 및 인산 8.5% (w/w)였다.

핵산 측정

세포벽이 제거된 crude extract 와 2 상계에서 상층부와 하층부의 핵산(RNA) 농도를 260 nm 에서의

Table 1. Effects of changed phase composition on the recovery of β -galactosidase from *Lactobacillus sporogenes* extract in the PEG-PPB two-phase system.

phase composition		potassium phosphate % (W/W)	Volume ratio	Activity (top)	Activity (bottom)	Partition coefficient
PEG 6000 Fluka % (W/W)						
A	10	11.5	1.55	0.01	3.16	0.004
B	5	14.0	0.28	0.17	1.42	0.121
C	10	20.0	0.46	1.14	1.32	0.864

To each composition, 0.1 ml of crude extract (β -galactosidase was 65 unit/ml and protein was 9 mg/ml) was added. The total volume = 5.0 ml, A,B,C.; Refer to Fig. 1.

Table 2. Partition of cell debris at different phase system composition.

	PEG 6000 Fluka % (W/W)	potassium phosphate % (W/W)	phase	Before addition of crude extract	After addition of crude extract
A	10	11.5	top	C'	C'
			bottom	C'	T+
B	5	14.0	top	C'	C'
			bottom	C'	T
C	10	20.0	top	C'	T++
			bottom	T+	T+

C': clear phase with no cell debris

T : turbid phase with cell debris

A,B,C,: Refer to Fig. 1.

Table 3. Partition coefficient (K) and activity obtained near and far away from the binodial line with various proteins in the PEG-PPB two phase system at 18-20°C. (PEG 1000, Fluka; K₂HPO₄/KH₂PO₄ = 1.43 molar ratio)

phase position	A'	B'	C'	D'
PEG(%)	13	10	7	9
Protein PPB(%)	16	19	21.5	28.5
BSA	0.83	0.71	0.75	63.2
O A	1.12	1.77	1.64	43.4
β -lactoglobulin	0.55	0.56	1.09	1.0
Lysozyme	1.20	1.58	1.55	23.4
β -galactosidase	0.10	0.06	0.10	197.0
vol. ratio (V _t /V _b)	1.70	0.54	0.20	0.36

0.1 ml of protein solution was added. total volume: 5.0 ml

β -galactosidase (52 units/ml)

A',B',C',D'; Refer to Fig. 2.

흡광도로부터 측정하였다(7).

결과 및 고찰

Poly(ethylene glycol)-salt 액상 2 상계에서 *Lactobacillus sporogenes* 로 부터 생산된 β -galactosidase 의 분리

Table 1과 Fig.1은 PEG-salt 액상 이상계에서 PEG 6000을 이용한 균체내 효소 β -galactosidase 의 분획실험으로, 조성이 binodial line 에 접근하는

Table 4. Partition of cell debris at different phase system composition

phase position	A'	B'	C'	D'
PEG(%)	13	10	7	9
Protein PPB(%)	16	19	21.5	28.5
top phase	C	C	C	T
bottom phase	T	T	T	C

C: clear phase with no cell debris

T: turbid phase with cell debris

A',B',C',D'; Refer to Fig. 2.

A, B 에서 분획계수가 0.004, 0.121로 가장 낮았고, 멀어지는 조성 C에서는 비교적 높은 분획계수 0.864를 나타냈다. 반면에 세포벽 잔사(cell debris)들은 binodial line 에 접근하는 조성에서 하층부(PPB-rich phase)로 이동하였으며, 멀어지는 조성에서는 일부 세포벽 잔사들이 단백질들과 함께 이동되어 균체내 효소들의 분리시에 문제가 되는 세포벽 잔사들의 효과적인 분리를 할 수 없었다(Table 2). Table 3,4와 Fig.2는 PEG 1000을 이용한 PEG/salt 액상 이상계에서 기준 단백질과 β -galactosidase 의 분획을 나타내는 것으로, 이때는 조성이 binodial line 근처(A', B', C')에서도 PEG 6000 사용시 보다는 비교적 높은 분획계수를 보여 주며, 멀어지는 조성(D')에서는 매우 높은 분획계수를 보이면서 BSA 63.2, ovalbumin 43.4, β -lactoglobulin 1.0, lysozyme 23.4, β -galactosidase 197을 나타내었다. 이때 세포벽잔사들은 D' 조성을 제외하고는 하

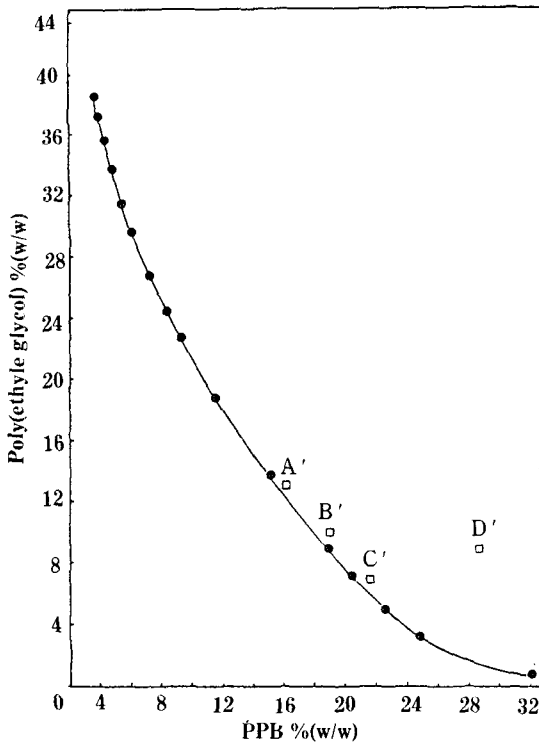


Fig. 2. Phase diagram of the PEG-PPB two-phase system with PEG 1000, (Fluka) and PPB ($K_2HPO_4/KH_2PO_4 = 1.43$ molar ratio, pH 7.15) at 20°C.

층부로 이동되었다. Fig.3과 Table 5에서 보면 PEG 300을 이용한 β -galactosidase 분리에서는 PEG 6000, 1000 사용때와 달리 조성이 binodal line에 접근하여도 상층부가 높은 효소역가를 보이면서 90% 이상의 회수율을 보였으며, 균체내 단백질들도 거의 상층부로 이동되었다. 그러나 binodal line에 접근하면서 상층부의 부피가 줄어드는 조성(D)에서

Table 5. Purification of β -galactosidase obtained in the PEG-PPB two phase system.

Experimental point	volume (ml)	specific activity	enzyme recovery	purification fold	
A	top	1.25	37.5	89	1.5
	bottom	3.82	0.6		
B	top	4.45	31.2	99	1.3
	bottom	0.7	0.1		
C	top	3.9	34.8	96	1.4
	bottom	1.25	0.02		
D	top	0.95	51.4	89	2.1
	bottom	4.1	0.89		

enzyme extract: 0.1 ml, 769 U/ml, 30 mg/ml, S.A = 25 (U/mg) A,B,C,D; Refer to Fig. 3.

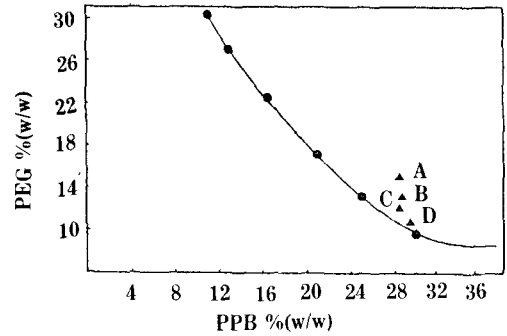


Fig. 3. Phase diagram of the PEG-PPB two-phase system with PEG 300 at 20°C.

는 효소이외의 일부 단백질들이 하층부로 이동되면서 정제도 2.1을 나타내었다.

PEG/salt 액상 2 단계에서 이단계 추출(two-step extraction)에 의한 β -galactosidase 분리

위의 결과로 PEG-salt 액상 이상계에서 L.

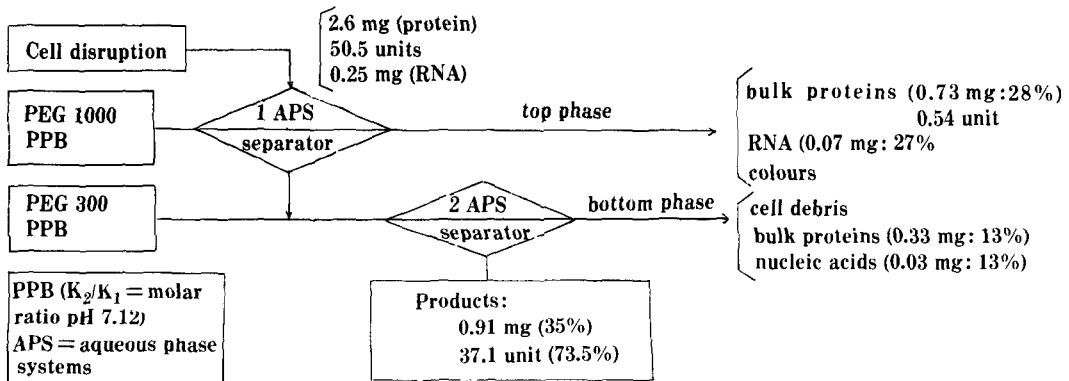


Fig. 4. The scheme of enzyme purification by two-step liquid extraction with PEG and PPB

*sporogenes*로부터 β -galactosidase 는 분리시 사용되는 PEG 분자량에 의해서 분획계수가 크게 변하는 것을 알 수 있었다. Fig.4는 PEG의 평균 분자량이 다른 PEG 1000, 300을 사용한 이단계 추출로 균체내 불순물(핵산, 색소물질) 및 세포벽 잔사를 효과적으로 제거시키는 것을 보여준다. 먼저 PEG-1000/salt 2상계에서 β -galactosidase 를 제외한 일부 단백질과 미색을 띠는 색소 불순물들이 상층부로 이동되어 제거되면, 다음에 PEG-300을 첨가해서 PEG-300/salt 2상계에서 상층부로 효소를 이동시킨다. 이때 하층부(PPB-rich phase)는 세포벽 잔사 및 핵산, 일부의 단백질들을 포함한다. 얻어진 상층부의 최종 산물은 전체 효소의 74% 회수율과 정제도 2.1을 나타냈다.

*Lactobacillus sporogenes*로부터 생성된 β -galactosidase 는 PEG/salt 액상 2상계에서 분획시 친수성에 의한 효과가 큰 것으로 생각된다. Veide(3)들이 *E. coli*에서 얻은 결과와는 약간의 차이는 있지만 액상 2상계 분리를 이용한 효소들의 분리에는 분리하려는 물질들의 표면 성질을 이해하고 상(phase)의 상태를 조절한다면 보다 높은 정제 효과를 얻을 수 있다고 생각된다.

요 약

Poly(ethylene glycol)/salt 가 형성하는 액상 2상계에서 균체내 효소인 β -galactosidase 분리를 최적화하는 실험을 수행하였다. *L. sporogenes*에 의해 생산된 β -galactosidase 의 분획은 2상계를 형성하는 PEG 분자량이 작을수록 상층부로 이동하였으며, 상층부 PEG 농도가 증가할 때 salting-out 현상이

나타나서 단백질 뿐아니라 β -galactosidase 는 상층부로 크게 이동하였다. 또한 균체내 효소 정제에서 문제가 되는 세포벽잔사(cell debris)들은 조성이 binodial line 에 접근할수록 효소 fraction 과 반대 방향으로 이동되었다. PEG-salt 를 이용한 β -galactosidase 분리는 조성을 binodial line 에 접근시키면서 동시에 상층부의 부피를 줄이는 것이 효과적이었다. PEG 1000, 300을 각각 단계적으로 이용한 2단계 추출(two-step extraction)로써 세포벽 잔사, bulk protein, 색소물질 및 핵산 등을 제거할 수 있었으며, 이때 효소의 회수율은 74%, 단백질 회수율 35%로서 정제도는 2 배 이상의 효과를 보였다.

사 사

본 연구는 한국 과학재단 일반 연구 조성비의 보조로 수행 되었으며, 이 자리를 빌어 감사 드립니다.

참고문헌

1. 김영만 : 고려대학교 박사학위 논문(1984)
2. 이삼빈, 이철호 : 식품과학회지, 18, 인쇄중(1987)
3. Veide, A., A.L. Smeds and S.O. Enfors: *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 1787 (1983)
4. Veide, A., T. Lindback and S.O. Enfors: *Enzyme Microb. Technol.*, **6**, 325, (1984)
5. Bradford, M.M.: *Anal. Biochem.*, **72**, 248, (1976)
6. Spector, T.: *Anal. Biochem.*, **86**, 142, (1978)
7. Higgins, J.J., D.J. Lewis and W.H. Daly: *Biotechnol. Bioeng.*, **20**, 159, (1978)

(Received January 28, 1987)