

## 호알카리성 *Bacillus* sp. YS-309로부터 $\beta$ -Galactosidase의 정제

유주현 · 윤성식<sup>1\*</sup>

연세대학교 공과대학 식품공학과

### Purification of $\beta$ -Galactosidase from Alkalophilic *Bacillus* sp. YS-309

Yu, Ju-Hyun and Sung-Sik Yoon<sup>1\*</sup>

Department of Food Engineering, Yonsei University, Seoul, Korea

**A strain of alkalophilic *Bacillus* sp. YS-309 capable of producing large amount of  $\beta$ -galactosidase has been isolated from soil sample. Intracellular  $\beta$ -galactosidase was purified 6.9 folds by procedures including ammonium sulfate precipitation, DEAE-cellulose chromatography, gel-filtration, DEAE-Sephadex A-50 chromatography with over-all yield of 17.8%. The molecular weight of native enzyme was 205,000 by HPLC, and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis showed that the enzyme consisted of 4 identical subunits with a molecular weight of 56,000.**

우유 중에 존재하는 lactose는 우유나 유제품의 풍미나 조직에 영향을 미칠 뿐만 아니라 중요한 영양성분으로 작용하는 반면 whey 처리(1), 동결 유제품 제조시 결정형성(2), 유당불내증을 가진 인종에게 소화장애 유발(3) 등 성가신 성분으로 작용하기도 한다. 따라서 lactose를 분해시키는  $\beta$ -galactosidase에 관한 연구가 대단히 많이 이루어졌으며, 주로 미생물이 생산하는 효소에 관심이 집중되어왔다(4-6).

$\beta$ -galactosidase의 정제에 관한 연구로 Park 등(7)이 CM-Cellulose column chromatography법을 사용하고 Craven 등(8)은 DEAE-Sephadex A-50을, Greenberg와 Mahoney(9)는 *p*-aminophenyl-1-thio- $\beta$ -D-galactoside(PAPTG)를 Sepharose-4B에 coupling시킨 affinity chromatography법을 이용한 예들이 보고되어 있다. Uwajima 등(10)은 *Saccharomyces fragilis*  $\beta$ -galactosidase를 hydroxylapatite column chromatography법을 이용하여 정제한 다음 crystallization에 성공하였으며 12면체의 판상 결정을 보고한 바 있다. 최근에 Miyazaki(11)는 *Bacillus macerans*의  $\beta$ -galactosidase를 DEAE-Sephadex A-50 column을 이용, 정제하여 6면체의 판상 crystal을 얻은 바 있다.

본 연구는 저자들이 전보(12, 13)에서 기술한 바와

같이  $\beta$ -galactosidase 생성능이 우수한 호알카리성 세균 *Bacillus* sp. YS-309로부터 ammonium sulfate 침전, DEAE-Cellulose column chromatography, Sephacryl S-200 gel filtration, DEAE-Sephadex A-50 column chromatography를 이용하여 정제하였기에 그 과정과 결과를 기술한다.

#### 재료 및 방법

##### 균주 및 배양

본 실험에 사용된  $\beta$ -galactosidase 생산용 균주와 배지의 조성은 전보(12)에 보고한 바와 동일하며 lactose 용액은 별도로 멸균하여 배지에 최종 농도가 0.5%가 되도록 첨가하였다. 기본배지에서 하룻밤 배양시킨 종배양액을 0.2-0.5% 되게 접종한 다음 37°C에서 230 rpm으로 회전진탕배양하였으며 균체의 생육은 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

##### 효소의 활성측정

효소활성은 Ito 등의 방법(14)을 변형하여 전보(13)에 준하여 실시하였다.

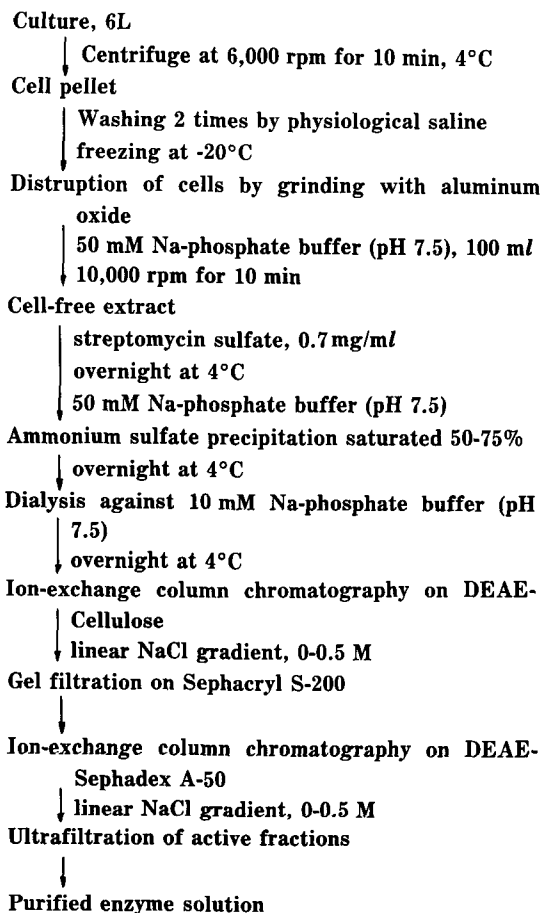
##### 효소의 정제

$\beta$ -Galactosidase의 효소학적 성질을 연구하기 위

**Key words:**  $\beta$ -Galactosidase purification, chromatography, molecular weight, alkalophilic *Bacillus* sp.

\*Corresponding author

1)현재 부천공업전문대학 식품영양과



**Fig. 1. Purification procedure of  $\beta$ -galactosidase from *Bacillus* sp. YS-309.**

하여 Sakai 등(15), Ikura와 Horikoshi(16), Tanaka 등(17)의 방법을 참조하여 정제하였다.

총 6l의 배양액을 6,000 rpm (Hitachi rotor PRP 12)에서 10분간 원심분리하고 회수된 균체를 0.85% 생리적 식염수로 2회 세척하였다. 균체는 -20°C에서 완전히 동결시킨 다음 동결 균체와 aluminum oxide의 비율이 1:1.5가 되도록 막자사발에 넣고 약 2시간 동안 잘 마쇄하였다. 여기에 50 mM의 인산염 완충액(pH 7.5)을 100 ml 가하여 효소를 추출하여 원심분리하고 그 상등액을 조효소액으로 하였다. 핵산은 조효소액 ml당 0.7 mg의 농도가 되도록 streptomycin sulfate를 첨가한 후 저온실에서 방치하여 제거한 다음 ammonium sulfate 침전법, DEAE-cellulose ion exchange column chromatography, Sephacryl S-200 gel filtration, DEAE-Sephadex A-50 column chromatography를 단계별로 실시하여

정제를 하였으며 정제 중 효소활성의 감소를 가급적 방지하기 위해 4°C에서 실시하였으며 필요에 따라 소량의 sodium azide를 사용하였다(Fig.1).

#### 전기영동과 분자량 측정

효소 정제과정 중 효소단백질의 전기영동은 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 Laemmli 방법(18)에 따라 실시하였으며 20 mA로 4-5시간 전기영동 후 0.05% Coomassie Brilliant Blue R-250으로 염색한 다음 Fairbanks 등의 방법(19)에 따라 탈색하였다. 효소단백질의 분자량을 측정하기 위해 HPLC용 Protein-Pak I-250 column을 사용하였다. 표준단백질 marker로는  $\beta$ -amylase(Mw. 200,000), alcohol dehydrogenase(Mw. 150,000), BSA(Mw. 66,000), carbonic anhydrase(Mw. 29,000)를, SDS-PAGE로 분자량을 구하기 위해 사용된 marker protein의 분자량은 BSA(Mw. 66,000), egg albumin(Mw. 45,000), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(Mw. 36,000), carbonic anhydrase(Mw. 29,000)이었으며 이동도(Rf치)와 분자량의 관계로부터 분자량을 산출하였다.

#### 활성염색(20)

정제한 효소단백질의 gel 상의 위치가 정확한지 여부를 확인하기 위하여 SDS가 함유되지 않은 PAGE 전기영동을 실시한 다음 gel의 반쪽은 절단하여 Coomassie Brilliant Blue R-250으로 염색 및 탈색을 하고 다른 반쪽은 PNPG가 함유된 인산염 완충액(pH 7.5)에 넣고 37°C, 30분간 반응시킨 다음 발색된 노란색 band와 서로 비교하였다.

#### 단백질 정량

효소액의 농도는 Lowry 등의 방법(21)에 따라 측정하였으며 Bovine serum albumin(Sigma)사를 표준단백질로서 사용하였다. 정제과정 중에는 편의상 280 nm의 흡광도로 표시하였다.

#### 시 약

*p*-Nitrophenyl  $\beta$ -D-galactopyranoside (PNPG), *o*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (ONPG), PNPX 등의 chromogen substrates는 Fluka AG 제품을, isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG), Glucostat reagent kit, bovine serum albumin(BSA), protein molecular weight marker, acrylamide, N,N'-methylene-bis-acrylamide, DEAE-cellulose pow-

der, DEAE Sephadex A-50 powder 는 모두 Sigma 사 제품을, Sephacryl S-200 은 Pharmacia 제품을, lactose 등의 당류는 Zunsei 제품을 각각 사용하였으며 기타 시약은 제조원별로 특급 내지 일급시약을 사용하였다.

**결과 및 고찰**

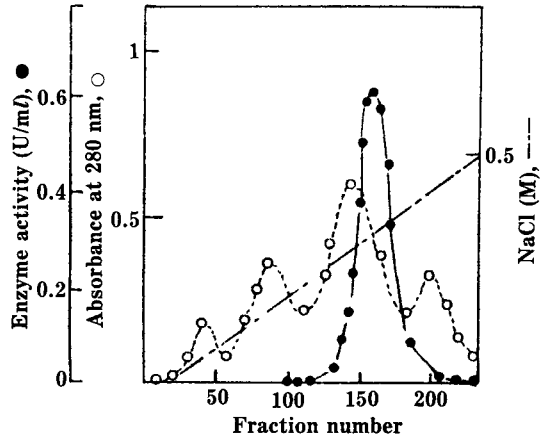
**효소의 정제**

분리균주 *Bacillus* sp. YS-309 의 배양액 6l 를 6,000 rpm (Hitachi rotor PRP 12)에서 10 분간 원심 분리하여 균체를 회수한 다음 0.85% 멸균 생리적 식염수로 2회 세척하여 -20°C에서 완전 동결시켰다. 동결된 균체 pellet 과 aluminum oxide 를 1 : 1.5 의 비율로 섞은 다음 막자 사발에 넣어 2시간 가량 충분히 갈아서 균체를 파괴하고 50 mM 인산염 완충액을 100 ml 첨가하여 10,000 rpm 으로 10 분간 2회 원심분리하여 상등액을 취하여 조효소액으로 하였다. 이 때 총 867 mg 의 단백질을 얻었으며 효소활성은 6,000 units 였다.

조효소액 중에 함유되어 있는 핵산은 streptomycin sulfate 를 0.7 mg/ml 의 농도가 되도록 첨가하여 4°C에서 하룻밤 정지하여 10,000 rpm 에서 20 분간 원심분리하여 제거하였다. 핵산을 제거한 조효소액에 미세한 ammonium sulfate (Tedia)를 50-75% 포화되도록 천천히 첨가하여 4°C에서 하룻밤 정지한 다음 원심분리하여 효소단백질을 회수하였으며 83.4%의 수율을 얻었다.

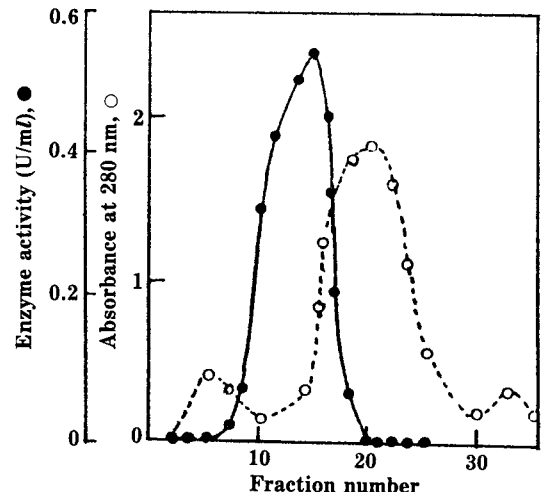
원심분리하여 회수한 효소단백질을 소량의 10 mM 인산염 완충액 (pH 7.5)에 용해하고 동일조성의 완충액에 대하여 하룻밤 동안 투석시켰다. 10 mM 인산염 완충액 (pH 7.5)으로 미리 평형화시킨 DEAE-Cellulose column 에 흡착시킨 다음 동일 조성의 완충액으로 충분히 세척하면서 효소의 흡착여부를 확인하였다. 완전히 흡착된 효소는 0-0.5 M NaCl gradient 로 용출시키면서, tube 당 5 ml 씩 분획하였으며 효소활성이 있는 # 130-160 fractions 을 모아 부분 정제된 효소액을 얻었다 (Fig.2).

DEAE-cellulose column 으로부터 얻은 효소액을 Ultrafiltration kit (Avantec model UHP-43, Toyo)를 사용하여 5 ml 로 농축하고 미리 10 mM 인산염 완충액으로 평형화시킨 Sephacryl S-200 column (1.8×60 cm, Pharmacia)에 주입하여 동일 buffer 로 gel filtration 을 행하였다. 이 때 유속은 15 ml/hr 로 tube 당 3 ml 씩 분획하였다. 활성분획 24 ml 에는 45.3 mg 의 단백질이 함유되었으며 총 효소활성은



**Fig. 2. Ion-exchange chromatography of  $\beta$ -galactosidase on DEAE-cellulose.**

DEAE-cellulose column was hydrated, packed in a 2.5-by 25 cm column, and equilibrated with 10 mM phosphate buffer, pH 7.5, and eluted with NaCl gradient in the same buffer. Fractions of 5 ml were collected at the flow rate of 20 ml/hr and aliquots were taken for the determination of enzyme activity.

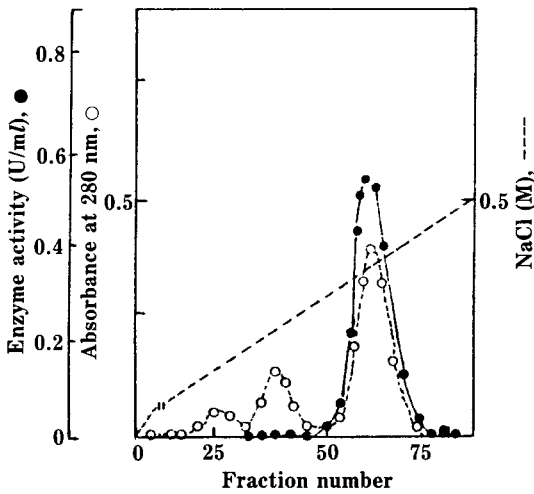


**Fig. 3. Gel-filtration of  $\beta$ -galactosidase on Sephacryl S-200.**

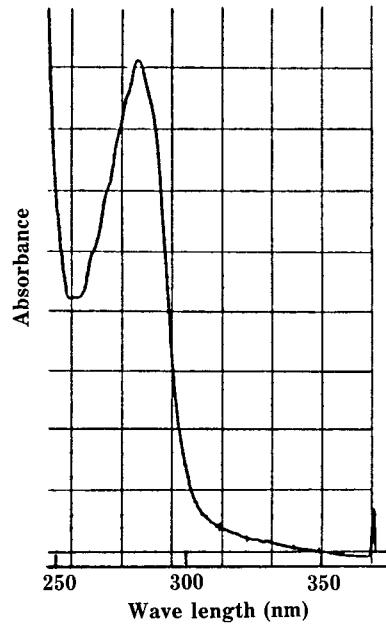
Sephacryl S-200 column (1.8×60 cm) was equilibrated with 10 mM phosphate buffer, pH 7.5, and eluted with same buffer. Fractions of 3 ml were collected at a flow rate of 15 ml/hr, and void volume was 25 ml.

1451 unit 그리고 수율은 24.2% 였다 (Fig.3).

Gel filtration 으로부터 얻어진 효소액을 SDS-PAGE 전기영동 결과 다소의 불순물이 확인되어 좀 더 고순도로 정제하고자 DEAE-Sephadex A-50 (Sigma) ion exchange column chromatography 를



**Fig. 4. Ion-exchange chromatography of  $\beta$ -galactosidase on DEAE-Sephadex A-50.** DEAE-Sephadex A-50 was hydrated, packed in a 2.5-by 20 cm column, and equilibrated 25 mM phosphate buffer, pH 6.5. Fractions of 3 ml were collected at a flow rate of 20 ml/hr and aliquots were taken for determination of enzyme activity.

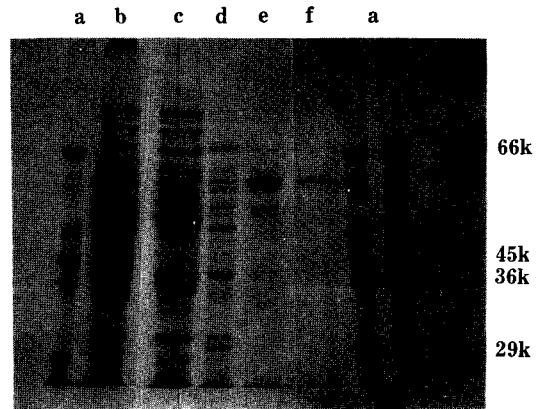


**Fig. 5. UV-Scanning of purified  $\beta$ -galactosidase.** Enzyme concentration, 50 U/ml; Scan speed, 60 nm/min

**Table 1. Summary of purification of  $\beta$ -galactosidase from *Bacillus* sp. YS-309.**

Purification Step	Total protein (mg)	Total activity (Units)	Specific activity (Unit/mg)	Yield (%)	Fold
Crude enzyme	867	6,000	6.92	100	1
Ammonium sulfate	465	5,007	10.76	83.4	1.55
DEAE-cellulose	138	2,070	15.0	34.5	2.17
Sephacryl S-200	45.3	1,451	32.03	24.2	4.62
DEAE-Sephadex A-50	22.4	1,068	47.67	17.8	6.9

실시하였다. Gel filtration을 통과한 활성분획을 미리 10 mM 인산염 완충액으로 평형화시킨 column (2.5×20 cm)에 완전히 흡착시킨 다음 0-0.5 M NaCl gradient로 용출시켜 tube 당 3 ml씩 분획하고, # 50-65의 활성분획을 얻었다(Fig.4). 이 활성분획을 증류수에 대하여 투석한 다음 PEG 6,000이나 Ultrafiltration으로 농축하여 최종 6.9배 정제된 효소 단백질을 얻을 수 있다. 정제효소액의 specific activity가 낮은 이유는 정제과정 중의 효소의 실활이 그 원인이었다고 생각되었다(Table 1).

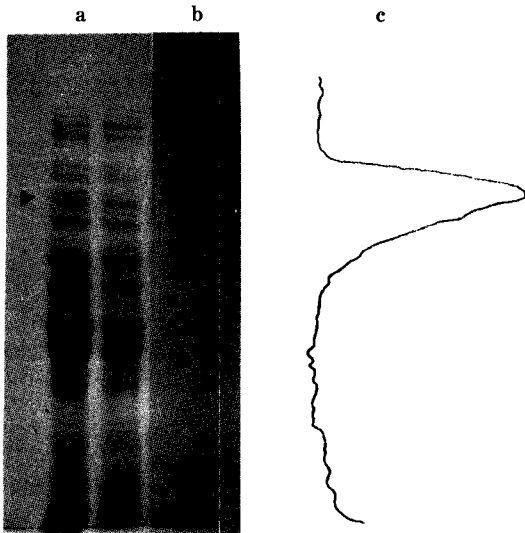


**Fig. 6. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of purified  $\beta$ -galactosidase.**

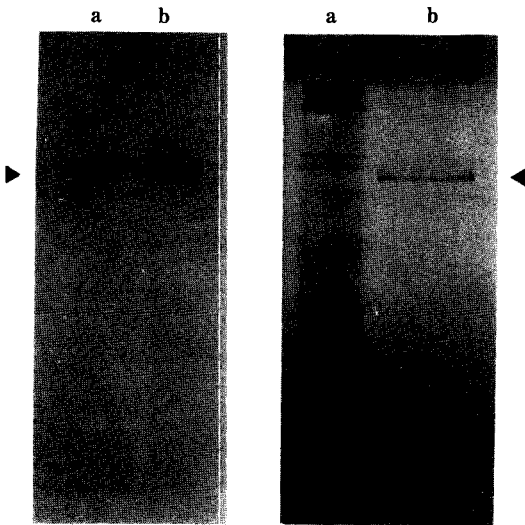
- a: Size marker
- b: Crude enzyme
- c: Ammonium sulfate precipitation fraction
- d: Active fraction from DEAE-cellulose
- e: Active fraction from Sephacryl S-200
- f: Active fraction from DEAE-Sephadex A-50

**전기영동**

정제된 효소용액의 순도를 확인하고자 우선 효소 용액을 UV-scanning을 실시하였다. 실험결과 효소 용액은 280 nm에서 최대의 흡광도를 가지는 전형적인 단백질 spectrum을 나타내었다(Fig.5). 또 0.1%

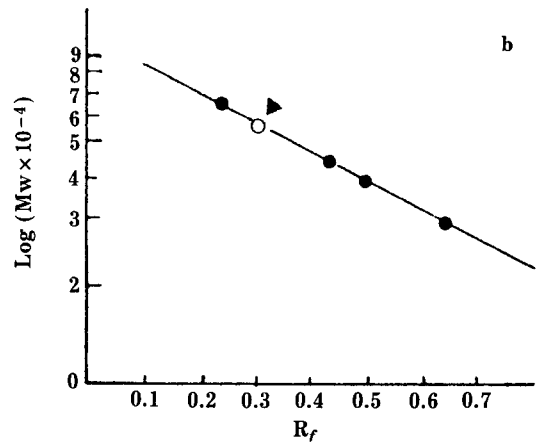
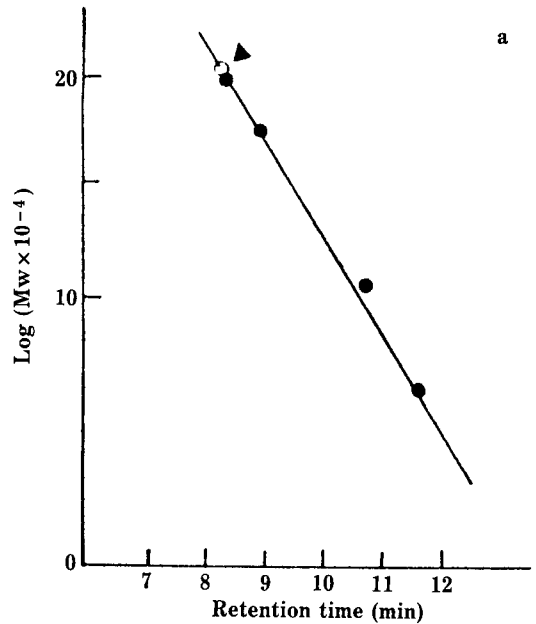


**Fig. 7. Purity determination of purified  $\beta$ -galactosidase by gel scanning.**  
 a: Crude enzyme  
 b: Purified  $\beta$ -galactosidase  
 c: Gel scanning of purified  $\beta$ -galactosidase



**Fig. 8. Activity staining of purified  $\beta$ -galactosidase on 10% polyacrylamide gel electrophoresis**  
 a: Crude enzyme  
 b: Purified  $\beta$ -galactosidase

SDS 가 함유된 10% polyacrylamide gel 전기영동을 정제단계별로 실시한 결과 단일 band 얻었다(Fig. 6). 이것을 Densitometer(Pharmacia)로 gel scanning 하므로써 면적 비율로 계산하여 최종 98%의 순수 정제도를 확인하였다(Fig.7). 한편 전기영동상



**Fig. 9. Molecular weight determination of  $\beta$ -galactosidase by gel filtration (a), and on 10% PAGE (b).**

의 단일 band 가  $\beta$ -galactosidase 의 활성과 일치하는지 여부를 확인하기 위하여 활성염색을 실시하였다. 10% polyacrylamide gel 전기영동 후 gel 의 한 쪽은 잘라내어 Coomassie Brilliant Blue 염색 위치와 노란색 활성염색 band 가 정확히 일치하여 정제한 효소단백질은  $\beta$ -galactosidase 임이 확인되었다(Fig.8).

**효소의 분자량**

본 정제효소의 분자량을 결정하기 위해 HPLC 용 Protein Pak I-250 gel filtration column 을 이용하였

다. 분자량을 알고 있는 표준시료의 용출시간과 분효소의 용출시간을 비교하여 산출한 결과 native  $\beta$ -galactosidase의 분자량은 205,000 dalton 정도로 추정되었다. 또 SDS와 mercaptoethanol에 의해 효소를 완전히 변성시켜 SDS-PAGE 상의 이동도와 표준단백질과의 이동도를 상호 비교하여 약 56,000 dalton의 subunit 분자량을 확인하였다(Fig.9). 이상의 두 결과로부터 native  $\beta$ -galactosidase는 동일한 크기의 4 subunit로 구성된 tetramer로 추정되었다. 한편 Ikura와 Horikoshi(16)는 호알칼리성 *Bacillus* sp. C-125의  $\beta$ -galactosidase 분자량이 185,000이라 하였으며, Mahoney와 Whitaker(22)는 *K. fragilis* 유래의 효소연구에서 분자량이 201,000으로, Uwajima 등(10)은 *Sacch. fragilis* 연구에서 이 효소의 분자량이 203,000이라고 보고하였다. 일반적으로  $\beta$ -galactosidase는 2개(23, 24) 혹은 4개(25, 26)의 subunit로 구성되어 있으며 분자량은 그 크기가 일정하지 않은 것으로 알려져 있다. 세균효소의 분자량은 비교적 커서 200,000 dalton 이상이 주로 보고되었으며(27), 곰팡이의 효소는 비교적 작아서 10,000-150,000 dalton이라고 보고되었다(28). 따라서 본 효소의 분자량은 세균 유래의  $\beta$ -galactosidase로서는 비교적 그 크기가 작은 것으로 생각되었다.

## 요 약

토양으로부터 분리한 호알칼리성 *Bacillus* sp. YS-309의 조효소액을 조제하고 제핵산, ammonium sulfate 침전, DEAE-cellulose column chromatography, Sephacryl S-200 gel-filtration, DEAE-Sephadex A-50 chromatography 등을 단계적으로 수행하여 6.9배 정제된 순도 98%의 정제효소를 얻었으며, 활성염색을 실시하여 정제한 효소단백질이  $\beta$ -galactosidase임을 확인하였다. 정제효소의 분자량은 205,000으로 monomer의 분자량이 56,000인 동일크기의 tetramer로 구성되어 있다고 판단되었다.

## 참고문헌

- Ramana Rao, M.V. and S.M. Dutta: *Appl. Environ. Microbiol.*, **34**, 185 (1977).
- Tumerman, L., H. Fram and K.W. Corneley: *J. Dairy Sci.*, **37**, 830 (1954).
- Kern, F. Jr. and J.E. Struthers, Jr.: *J. Am. Med. Assoc.*, **195**, 143 (1966).
- Goodman, R.E. and D.M. Pederson: *Can. J. Microbiol.*, **22**, 817 (1976).
- Marchesi, S.L., E. Steers, Jr. and S. Shifrin: *Biochem. Biophys. Acta.*, **181**, 20 (1969).
- Citti, J.E., W.E. Sandine and P.R. Elliker: *J. Bacteriol.*, **89**, 937 (1965).
- Park, Y.K., M.S.S. DeSanti and G.M. Pastore: *J. Food Sci.*, **47**, 1824 (1979).
- Craven, G.R., E. Steers, Jr. and C.B. Anfinsen: *J. Biol. Chem.*, **240**, 2468 (1965).
- Greenberg, N.V. and S.M. Dutta: *Appl. Environ. Microbiol.*, **34**, 185 (1977).
- Uwajima, T., H. Yagi and O. Terada: *Agric. Biol. Chem.*, **36**, 570 (1972).
- Miyazaki, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 624 (1988).
- Yoon, S.S., D.S. Min and J.H. Yu: *Kor. J. Food and Nutrition.*, **1**, 68 (1988).
- Yoon, S.S. and J.H. Yu: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **17**, 524 (1989).
- Itoh, T., M. Suzuki and S. Adchi: *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 899 (1982).
- Sakai, K., T. Tachiki, A. Kiuchi and T. Horiuchi: *J. Biochem.*, **51**, 315 (1987).
- Ikura, Y. and K. Horikoshi: *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 85 (1979).
- Tanaka, Y.A., Kagamishi, A. Kiuchi and T. Horiuchi: *J. Biochem.*, **77**, 241 (1975).
- Laemli, L.K. and M. Frave: *J. Mol. Biol.*, **80**, 575 (1973).
- Fairbanks, G., T.L. Stetck and D.F.H. Wallach: *Biochem.*, **10**, 2606 (1971).
- Lee, Y.J., J.B. Hansen, E.K. Jangusztyrn-Krynicka and B.M. Chassy: *J. Bacteriol.*, **152**, 1138 (1982).
- Lowry, O.H., N.S. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall: *J. Biol. Chem.*, **192**, 265 (1951).
- Mahoney, R.R., T.A. Nickerson and J.R. Whitaker: *J. Dairy Sci.*, **58**, 1620 (1975).
- Watanabe, Y., Y. Kibesaki, S. Takenishi, K. Sakai and Y. Tsujisaka: *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 9433 (1979).
- Obtakara, A., N. Hayashi and M. Mitsutomi: *J. Ferment. Technol.*, **59**, 325 (1981).
- Zipser, D.: *J. Mol. Biol.*, **7**, 113 (1963).
- Wallenfels, K., H. Sund and K. Weber: *Biochem. Z.*, **338**, 714 (1963).
- Wallenfels, K. and R. Weil: *Beta-galactosidase, The Enzymes*, Vol.7, Academic Press, pp.616-663 (1972).
- Macris, B.J.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**, 1035 (1982).

(Received September 26, 1989)