

## 누룩 Yeast 에서 유당분해효소의 분리 및 특성

강미영 · 박상교\* · 김동신\*

경북대학교 가정교육과, \*경북대학교 낙농학과

### Purification and Characterization of $\beta$ -galactosidase from *Nuruk* Yeast

Mi-Young Kang, Sang-Kyo Park\* and Dong-Shin Kim\*

Department of Home Economics, Kyungpook National University

\*Department of Dairy Science, Kyungpook National University

#### Abstract

A strain of Nuruk yeast No. 15 (NY-15) which produced high activity of  $\beta$ -galactosidase was isolated from *Nuruk*, and the crude enzyme was prepared by whey permeate culture of the microorganism. The crude enzyme was purified 40-fold with a 7.7% yield by acetone and ammonium sulfate fractionation precipitation, and chromatography on DEAE-cellulose, DEAE-Sephadex A-50 and Agarose-PAPT. Purified  $\beta$ -galactosidase from *Nuruk* yeast showed two types of subunit patterns; a slow moving band and a fast moving deeply stained band, both anode-migrating at pH 7.5. The molecular weight of the former was estimated to be about 130,000 and that of the latter was 96,000 by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The optimum pH of the enzyme activity was 7.5 and maximum activity appeared at 40°C.

Key words: nuruk yeast,  $\beta$ -galactosidase

## 서 론

$\beta$ -galactosidase( $\beta$ -D-galactoside galactohydrolase, EC 3.2.1.23)는 유당의  $\beta$ -1,4 galactosidic linkage 를 분해하여 glucose 와 galactose 를 생산하는 효소이다. 유제품 공업에 있어서  $\beta$ -galactosidase 를 이용하여 유당을 가수분해하는 대상으로서는 영양학상 이른바 유당불내증을 위한 제품, 제품품질의 개량, cheese 의 숙성촉진 등을 들 수 있다<sup>(1)</sup>. 여러 미생물기원의  $\beta$ -galactosidase 정제에 관한 연구는 상당히 많이 수행되었으며, 결정화(crystallization)도 이루어졌다<sup>(2,3)</sup>. 특히 *Escherichia coli* K-12의  $\beta$ -galactosidase 경우는 이미노산의 배열도 밝혀져 있다<sup>(4)</sup>. 유제품에의 이용을 위한 연구로는 *Aspergillus niger*<sup>(5)</sup>, *Saccharomyces lactis*<sup>(6)</sup>, *Saccharomyces fragilis*<sup>(7)</sup> 기원의  $\beta$ -galactosidase 의 성질이 연구되어 있다. 한편,  $\beta$ -galactosidase 는 효소의 생산원에 따라 그 구조적 특성, 반응양상, 물리화학적 성질 등이 다르고<sup>(8)</sup> 우유에 존재하는 미량 무기질에 의한 영향도  $\beta$ -galactosidase 생산원에 따라 다르다는 연구보고도 있

다<sup>(9)</sup>. 前報에 제시하는 바와 같이<sup>(10)</sup> 누룩을 이용한 산-알코올 발효유 제조를 위한 연구의 일환으로 누룩으로부터 lactose 분해효소를 가지는 균주를 분리하여 crude  $\beta$ -galactosidase 의 활성을 측정하였던 바 *Saccharomyces fragilis* 의 crude  $\beta$ -galactosidase 와 거의 비슷한 정도의 활성을 나타내었다. 이에 누룩으로부터 분리한 NY-15 균주로부터  $\beta$ -galactosidase 를 정제하고 정제한 효소의 몇 가지 성질에 관하여 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 미생물과 배지

$\beta$ -galactosidase 의 생산원으로, 누룩으로부터 분리한 NY-15 균주를 사용하였으며, 배지는 액상배지(유당 5% : yeast extract 0.25% : yeast nitrogen base 1% : peptone 0.25%)를 121°C에서 15분간 가압살균한 후 사용하였다. 다량의 세포를 얻기 위하여 종균액 50 ml 2l 의 액상배지에 접종하여 28°C에서 28시간 배양하였다.

### $\beta$ -galactosidase 의 추출

Corresponding author: Mi-Young Kang, Dept. of Home Economics, Kyungpook National University

배양액을 3,000×g로 10분간 원심분리하여 세포를 침전시킨 후 0.02 M phosphate buffer (pH 7.0)으로 3회 세척하여 20% (w/v)의 세포현탁액을 만든다. 이것을 8% toluene (v/v) 처리에 의해서 조효소액을 얻는다.

**β-galactosidase 활성 측정**

β-galactosidase의 활성은 50 mM Tris-HCl 완충액 (pH 7.5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 M NaCl, 0.1 M 2-mercaptoethanol, 2 mM O-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside를 포함하는 혼합액 2 ml에 0.5 ml의 β-galactosidase의 작용에 의해서 생성되는 O-nitrophenol을 420 nm에 있어서의 흡광도의 변화로부터 효소활성을 측정하였다. O-nitrophenol의 molar extinction coefficient는 3,100 M<sup>-1</sup>, cm<sup>-1</sup>로써 계산하였다. 위의 측정조건에서 1분간에 1 μmole의 O-nitrophenol을 생성시키는 β-galactosidase의 양을 1 unit로 하였다.

**단백질 함량 측정**

표준단백질 용액으로는 BSA를 이용하여 Lowry<sup>(11)</sup>의 방법에 의하여 정량하였다.

**분자량 측정**

SDS-polyacrylamide gel slab 전기영동은 Laemmli<sup>(10)</sup>의 방법에 따라 분리용 gel로서 12.5% polyacrylamide gel (pH 8.8), 농축용 gel로서 4% polyacrylamide gel (pH 6.8)을 이용하였다. 시료를 SDS와 mercaptoethanol을 포함하는 용액 중에서 변성시킨 후 실온에서 25-30 mA의 전류로 3-4시간 전기영동하였다. 0.25% coomassie brilliant blue R-250으로 염색하여 7.5% acetic acid-5% methanol로 탈색하였다. 분자량 표준단백으로는 cytochrome c (Mw. 12,384), myoglobin (Mw. 17,200), chymotrypsinogen A (Mw. 25,741), ovalbumin (Mw. 43,000), BSA (Mw. 68,000)을 이용하였다.

**pH와 열안정성**

β-galactosidase 용액을 0.01 M mercaptoethanol을 포함하는 각 완충용액 (McIlvaine, pH 4.5-8.0, glycine-NaOH, pH 8.5-10.5)에 넣어서 4°C에서 16시간 정치시킨 후 잔존활성을 측정하였다. 열안정성은 β-galactosidase 용액을 0.02 M potassium phosphate

-0.01 M mercaptoethanol (pH 7.5)의 완충액 넣어 20°C에서 50°C까지 5°C 간격으로 나누어 각 온도에서 10시간 반응시킨 후 잔존활성을 측정하였다.

**β-galactosidase의 정제**

**Acetone precipitation**

조효소액에 -20°C로 냉각시킨 acetone을 1:2 (v/v)의 비율로 첨가하여 acetone 침전분획을 얻어 실온에서 감압건조하였다.

**Ammonium sulfate fractionation**

Acetone 침전분획 후의 효소액에 40% 포화도가 되도록 ammonium sulfate 243g/l를 서서히 가한 후 30분간 교반시켜 10,000×g로 15분간 원심분리하여 상등액을 취한다. 이 상등액을 위와 같은 방법으로 다시 60% 포화용액이 되도록 ammonium sulfate 132g/l를 가한 후 원심분리하여 침전물을 얻는다. 이 침전물을 0.02 M phosphate buffer (pH 7.0)에 현탁시켜 효소액을 만들어 같은 완충액으로 충분히 투석하였다.

**DEAE-cellulose chromatography**

투석한 시료를 0.02 M phosphate buffer (pH 7.0)으로 평형화시킨 DEAE-cellulose column (1.5×50 cm)에 올린 후 충분히 씻어 흡착되지 않은 단백질을 제거시켰다. 흡착된 단백질은 0.02 M에서 0.2 M의 phosphate buffer (pH 7.0)의 농도군배에 의해 용출시켰다. 용출은 40 ml/hr의 속도로 실시하였고, 20 ml씩 분획하여 280 nm에서 흡광도를 측정하였으며 각 분획의 β-galactosidase 효소활성을 측정하여 β-galactosidase의 분획을 모아 ammonium sulfate (0-70%)를 이용한 염색에 의해서 30 ml까지 농축시켰다. 이 농축효소액을 0.02 M phosphate buffer (pH 7.0)로 충분히 투석하였다.

**DEAE-Sephadex A-50 chromatography**

투석한 시료를 0.02 M phosphate buffer (pH 7.0)로 평형화시킨 DEAE-Sephadex A-50 column (1.5×40 cm)에 올린 후 충분히 씻어 흡착되지 않은 단백질을 제거시키고 흡착된 단백질은 0.02 M에서 0.2 M의 phosphate buffer (pH 7.0)의 농도군배에 의해서 용출시켰다. 용출은 30 ml/hr의 속도로 실시하였고, 각 tube 당 5 ml씩 분획하여 280 nm에서 흡광도와 각 분획의 β-galactosidase 활성을 측정하였다. β-galactosidase의 분획을 농축시켜 0.02 M phosphate buffer (pH 7.0)으로 충분히 투석시켰다.

**Agarose-PAPT chromatography**

투석한 시료를 0.02 M phosphate buffer (pH 7.0)로 평형화시킨 Agarose-PAPT column (1.5×20 cm)에 올린 후 원충액으로 충분히 씻어 흡착되지 않은 단백질을 제거하고 흡착된 단백질은 0.02 M에서 0.2 M의 NaCl의 농도군배를 가지는 0.02 M phosphate buffer (pH 7.0)로 용출시켰다. 용출속도는 30 ml/hr로 하였고, 각 tube 당 5 ml씩 분획하여 280 nm에서 흡광도와 각 분획의  $\beta$ -galactosidase 활성을 측정하였다.  $\beta$ -galactosidase의 활성을 가지는 분획을 모아 정제  $\beta$ -galactosidase 용액으로 하였다.

**결과 및 고찰**

**$\beta$ -galactosidase의 정제**

누룩으로부터 분리한  $\beta$ -galactosidase의 활성을 가지는 균주를 발효조 (Fermenter, Bioengineering Co. Switzerland)로 다량 배양하여 toluene 처리에 의해서 crude  $\beta$ -galactosidase 용액을 만들었다. 이것을 acetone 침전에 의해서 탈지처리를 한 후 40-60% 포화용액이 되도록 ammonium sulfate로 포화염석시킨 최종 침전물은 crude 상태보다 약 4배 정제되었다 (Table 1). 이 침전물은 DEAE-cellulose chromatography (Fig. 1)에 의해서 다량의 단백질이 제거되고, crude 상태로부터 약 20배 정제되었다. 그리고 DEAE-Sephadex A-50 chromatography를 실시한 결과 Fig. 2에 보이는 바와 같이 단백질의 peak는 1개 나타났으나 전기영동상에서는 불순물의 band가 여러 개 검출되었다. 이들  $\beta$ -galactosidase 활성의 분획을 모아 Agarose-p-aminophenyl- $\beta$ -D-thiogalactoside의 affinity chromatography를 실시한 결과 (Fig. 3) 단백질의 peak와 효소활성의 peak가 일치하는 거의 순수한  $\beta$ -galactosidase가 정제되었다. 정제된  $\beta$ -galactosidase 용액을 미변성시킨 조건에 polyacrylamide gel electrophoresis를 행한 결과

Table 1. Purification of  $\beta$ -galactosidase from Nuruk yeast

	Protein (mg)	Total activity activity (units)	Specific activity (units/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Crude extract	2490	1670	0.668	1	100
Acetone precipitate	1360	1600	1.18	1.76	96.3
Ammoniumsulfate fractionation (40%-60%)	348	925	2.66	3.98	55.6
DEAE-cellulose chromatography	63.3	850	13.4	20.1	51.0
DEAE-Sephadex A-50 "	30.0	585	19.2	28.7	35.1
Agarose-PAPT chromatography	4.75	129	27.1	40.5	7.72

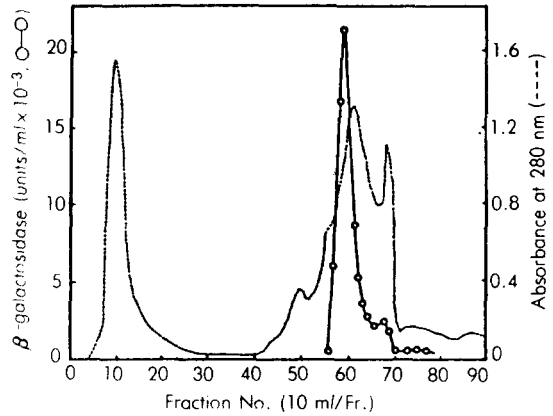


Fig. 1. Elution pattern of  $\beta$ -galactosidase on DEAE-cellulose chromatography

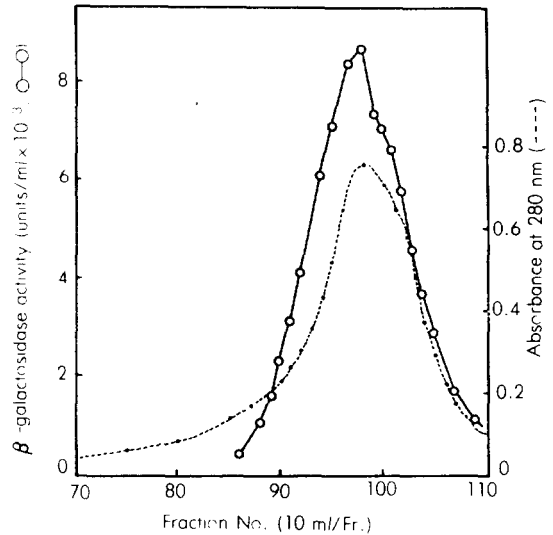


Fig. 2. Elution pattern of  $\beta$ -galactosidase on DEAE-Sephadex X-50 chromatography

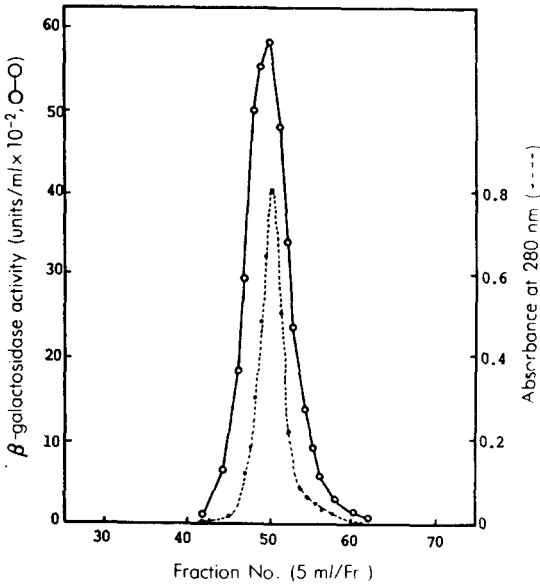


Fig. 3. Elution pattern of  $\beta$ -galactosidase on Agarose-PAPT chromatography

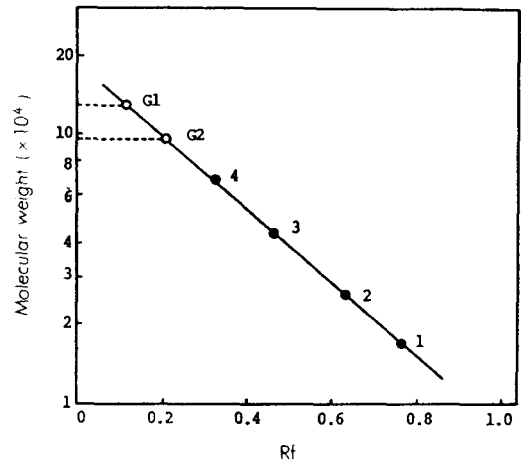


Fig. 5. Estimation of the subunit molecular weight of the purified  $\beta$ -galactosidase by SDS-PAGE  
1. myoglobin, 2. chymotrypsinogen, 3. ovalbumin, . bovine serum albumin, G1. purified  $\beta$ -galactosidase (Mw; 130,000), G2. purified  $\beta$ -galactosidase (Mw; 96,000).

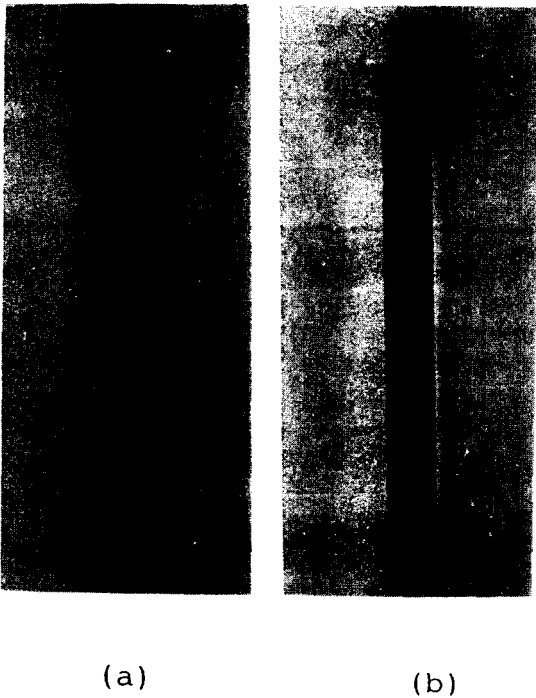


Fig. 4. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the purified  $\beta$ -galactosidase from NY-15  
a. Native protein stain, b. Denatured protein stain

Fig.4-a 와 같이 단일 band 가 관찰되었다. 한편 mercaptoethanol 을 첨가하고 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis 를 행하였더니 Fig.4-b 에서 보는 바와 같이 2개의 band 가 검출되었다. 각 band 의 분자량을 표준곡선(Fig.5)으로부터 산출하면 각각 96,000 과 130,000 이었다. 이러한 Fig.4 의 pattern 으로 보아 누룩으로부터 분리한 NY-15 는 분자량 96,000 과 130,000 의 2개의 subunit 를 포함하는 효소임을 알 수 있다. Mahoney<sup>(7)</sup> 등의 보고에 의하면 *S. fragilis* 의 경우 2개의 major subunit 분자량이 각각 90,000 과 120,000 이라고 보고하고 있다. 이러한 결과나, 前報에서 검토했던 유당 발효능의 비교 등으로 미루어보아 누룩으로부터 분리한 yeast NY-15 와 *S. fragilis* 는 유제품에의 이용에 있어서 그 성질이 참으로 유사하다 하겠다. 정제된  $\beta$ -galactosidase 의 구조적 특성에 관해서는 chemical modification<sup>(12)</sup>, 초원심분리<sup>(3,7)</sup>, 전자현미경관찰<sup>(13)</sup> 등의 여러 방법으로 연구되고 있으며, 이러한 구조적 특성은  $\beta$ -galactosidase 의 생성원에 따라 차이가 있다. 이에 今後の 연구에는 누룩 yeast  $\beta$ -galactosidase 의 자세한 구조적 특성 및 효소학적 검토를 실시하고자 한다.

pH 및 열안정성

누룩 yeast 로부터 정제한  $\beta$ -galactosidase 의 최적

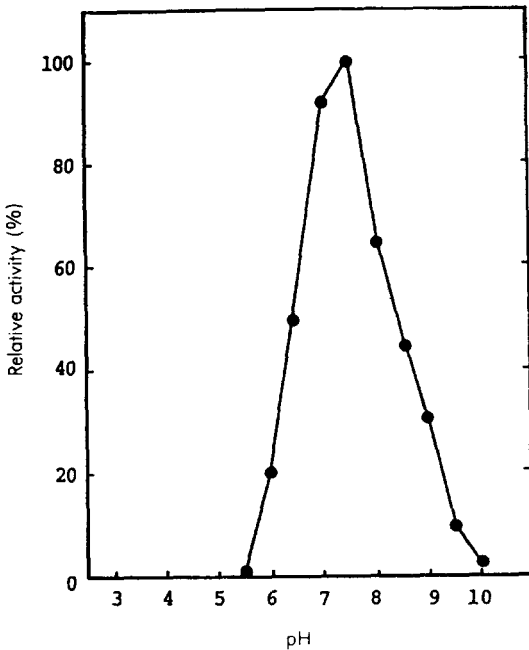


Fig. 6. Effect of pH on enzyme activity

pH는 Fig.6에서 보이는 바와 같이 pH 7.5 부근이며, 최적 pH의 범위가 상당히 좁다. 이러한 결과로부터 순후에 정제된 효소의 구조적 특성 및 효소학적 검토를 행하고자 다량의 효소를 정제할 때에는 buffer의 종류에 대한 검토가 필요하다고 생각한다. 한편 효소활성에 있어서 온도의 영향은 Fig.7에 보이는 바와 같이 40°C까지는 온도가 상승함에 따라 효소의 활성은 증가하는데 45°C 이상의 온도에서는 급격히 감소하는 결과를 얻었다.

요 약

누룩으로부터  $\beta$ -galactosidase 활성을 가지는 균주를 순수분리하여 분리된 균주(NY-15)의  $\beta$ -galactosidase를 정제하였다. 다량배양하여 모은 균체를 8% (v/v) toluene 처리에 의한 추출액을 정제의 출발물질로 하여 acetone 침전에 의해서 탈지처리를 한 후 40-60% 포화의 ammonium sulfate 분획을 하고 DEAE-cellulose, DEAE-Sephadex A-50의 이온교환 chromatography를 한 후 Agarose-PAPT를 이용한 affinity chromatography에 의해서 정제하였다. 이 정제법에 의해서  $\beta$ -galactosidase는 조효소 추출액으로부터 40배 정제되었으며 회수율은 7.7%였

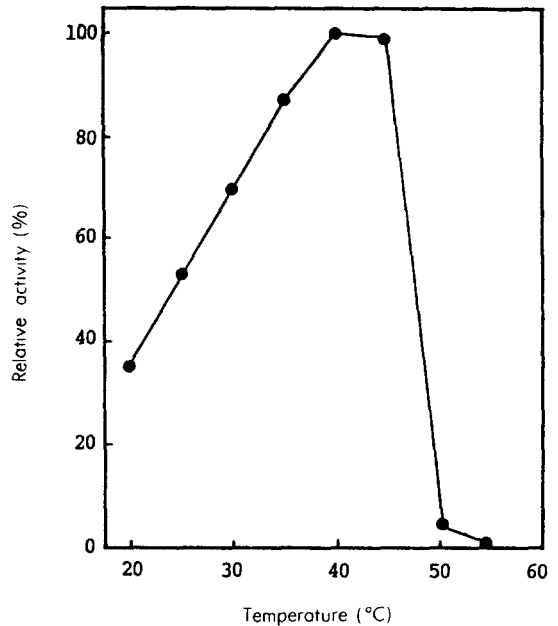


Fig. 7. Effect of temperature on enzyme activity

다. 누룩 yeast의  $\beta$ -galactosidase는 2개의 subunit로 되어 있으며, 각 subunit 분자량은 각각 96,000과 130,000이었다. 효소활성의 최적 pH는 7.5이었고, 최적온도는 40°C이었다.

감사의 말

본 연구는 한국과학재단 신진연구비 지원(1987-1988)으로 수행되었으며, 이를 깊이 감사드립니다.

문 헌

1. 一島英治編 : 食品工業と酵素, 朝倉書店, 東京, p.145 (1985)
2. Craven, G.R., Steers, E. and Anfinsen, C.B. : Purification, composition and molecular weight of the  $\beta$ -galactosidase of *E.coli* K-12, *J. Biol. Chem.*, **240**, 246(1965)
3. Uwajima, T., Yagi, H. and Terada, O. : Purification, crystalization and some properties of  $\beta$ -galactosidase from *S. fragilis*, *Agric. Biol. Chem.*, **36**, 570(1972)
4. Fowler, A.V. and Zabin, I. : Amino acid sequence of

- $\beta$ -galactosidase, *J. Biol. Chem.*, **253**, 5521(1978)
5. Wierzbicki, L.E. and Koshikowski, F.V. : Kinetics of lactose hydrolysis in acid whey by  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus niger*, *J. Dairy Sci.*, **56**, 1396(1973)
  6. Guy, E.J. and Bingham, E.W. : Properties of  $\beta$ -galactosidase of *Saccharomyces lactis* in milk product, *J. Dairy Sci.*, **61**, 147(1978)
  7. Mahoney, R.R. and Whitaker, J.R. : Purification and physicochemical properties of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*, *J. Food Sci.*, **43**, 584 (1978)
  8. 안종건, 김현욱 :  $\beta$ -galactosidase 의 구조와 물리화학적 성질, **1**, 24(1981)
  9. Dahlqvist, A., Burvall, A. and Rausing, H. : Hydrilysis of lactose in milk and whey minute amount of lactase, *J. Dairy Res.*, **44**, 541(1977)
  10. 박상교, 강미영, 김동신 : 누룩 yeast 에 의한  $\beta$ -galactosidase 의 생산 및 효소적 특성, 한국식품과학회지에 투고 중
  11. Lowry, O.H., Rosovroygh, N.Z., Farr, A.L. and Randall, R.J. : Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265(1951)
  12. Fowler, A.V., Brake, A.J. and Zabin, I. : Amino acid sequence of  $\beta$ -galactosidase. VI. Limited tryptic digestion of the citraconylated protein and sequence of tryptic peptides., *J. Biol. Chem.*, **253**, 5490(1978)
  13. Celada, Fo., Fowler, A.V. and Zabin, I. : Probes of  $\beta$ -galactosidase structure with antibodies, *Biol. Chem.*, **17**, 5166(1978)
- 
- (1989년 11월 7일 접수)