J. Korean Soc. Food Nutr.
21(1), 54~59 (1992)

한국영양식량학회지

*Lactobacillus acidophilus*가 생성하는 β-Galactosidase의 성질

김순동† · 장경숙* · 오영애 · 김미정 · 강명수 · 이명숙 · 김미향

효성여자대학교 식품가공학과
*경산대학교 식품과학과

Characteristics of β-Galactosidase Produced from *Lactobacillus acidophilus*

Soon-Dong Kim†, Kyung-Sook Jang*, Young-Ae Oh, Mee-Jung Kim, Meung-Su Kang, Meung-Sook Lee and Mee-Hyang Kim

Dept. of Food Science and Technology, Hyosung Women's University, Kyungsan 713-702, Korea
**Dept. of Food Science, Kyungsan University, Kyungsan 713-715, Korea*

Abstract

The characteristics of endogenous and exogenous β-galactosidase (β-Galase) produced from *L. acidophilus* were investigated as one of the serial studies on the fermentation of Chinese cabbage kimchi using *L. acidophilus*. Apparent molecular weight of endogenous and exogenous of the β-Galase were investigated to be 550,000 and 740,000 daltons by the method of gel filtration and Km values of the both enzymes were 1.67mg/ml, 1.33mg/ml and V_{max} were 8.5 μ mol/mg/30min., 2.65 μ mol/ml/30min., respectively. The optimum pH of the enzymes were 7 and 8, respectively. The optimum temperatures and salt concentrations of the both enzyme were the same and appeared to 30°C and 4~5%, respectively. The activities of the endogenous and exogenous β-Galase were decreased by increasing of temperature from 60°C to 90°C and the decreasing rate of the enzyme activities on the processing of the heating times showed high at first 2 minutes of heating.

Key words : *Lactobacillus acidophilus,* characteristics, endogenous and exogenous β-galactosidase

서 론

β-Galactosidase는 β-1, 4 galactoside 결합을 가수분해하는 효소로서 일반 과채류에는 물론 미생물에도 널리 분포되어 있으며[1,2], 식물의 세포벽을 구성하는 pectin질의 측쇄인 galactan이나 arabinogalactan에 작용하여 arabinose와 galactose를 유리하여 조직을 연화시키며 polygalacturonase와 함께 과채류 및 그 가공품의 품질에 지대한 영향을 준다[3~5]. Hobson[6], Bartly[7], Gross[8], Wallner[9] 및 Gross와 Wallner[10]는 과실이 연화됨에 따라 β-galactosidase의 활성이 현저하게 증가하는 한편 세포벽 구성다당류의 galactose는 현저히 감소한다고 하였으며 김 등[5]은 김치의 숙성중에 hemicellulose의 저분자화를 관찰하여 숙성 중 원 부

† To whom all correspondence should be addressed

재료 또는 숙성미생물로 부터 유래하는 β-galactosidase의 작용가능성을 시사하고 있다.

*Lactobacillus acidophilus*는 김치에서 발견되고 있는 젖산균들과는 달리 장내에서 서식 가능한 인체에 유용한 젖산균으로서 이를 이용한 김치의 제조가 절실히 요구되고 있으며, 이 균이 생성하는 β-galactosidase 특성에 관한 연구는 김치의 품질을 향상시키는데 중요한 정보가 될 것으로 판단되므로 본 연구에서는 이에 촛점을 두어 균체내와 균체외 효소로 나누어 그 성질을 조사하였다.

재료 및 방법

균주와 배지

본 실험에 사용된 균주는 종균학회에서 분양받은 *Lactobacillus acidophilus* KCTC 3140이었으며 pH 6.4의 살균 MRS배지에 접종하여 37℃에서 배양하였다.

효소의 추출

β-Galactosidase(β-Galase)의 추출은 Moshrefi와 Luh의 방법[11]을 기본으로 하여 다음과 같이 행하였다. 즉 MRS배지 1L에 균을 접종, 37℃에서 48시간 배양한 배양액을 20,000rpm에서 냉동원심분리하여 균체와 상징액으로 나누고, 균체내 효소는 0.1M의 NaCl를 함유하는 50mM의 pH 7.5 tris-HCl buffer (buffer A)로써 2회 세척한 후 50mM의 2-mercaptoethanol을 함유하는 buffer A(buffer B)에 현탁하여 0~2℃에서 sonication하였다. 다음에 균체와 효소는 상징액을 80% 황산 암모늄 염석, 원심분리하여 얻은 침전을 buffer B용액에 녹여 0~4℃에서 24시간 동안 동일 buffer로써 분자량 3,000~6,000을 제거하는 membrane tubing을 사용하여 투석한 후 buffer B액으로 정용하여 조효소액으로 하였다.

효소반응과 활성도 측정

β-Galase의 활성도 측정[12]은 *p*-nitrophenyl-β-galactoside를 가수분해하여 생성된 β-nitrophenol함량을 측정하여 효소활성도로 나타내었다. 즉 *p*-nitrophenyl-β-galactoside 100mg%의 100mM 2-mercaptoethanol을 함유하는 tris-HCl buffer(pH 7.0)에 $MgCl_2$ 10mM, NaCl 100mM 되게 한 용액 2ml에 효소액 0.5ml을 가하여 30℃에서 30분간 반응시키고 즉시 vortex상에서 200mM의 Na_2CO_3 1ml을 가하여 반응을 정지시킨 후 420nm에서의 흡광도를 측정하였다. 활성도는 표준품 *p*-nitrophenol(Sigma제)의 검량선 *p*-nitrophenol mg% = $4.76 \times OD_{420} - 0.22$, r=0.9500에 의하여 분해되어 생성된 함량을 구하고, 균체내 효소는 배지 1L에서 얻어진 균체 g당, 30분당 생성된 *p*-nitrophenol의 μmol을, 그리고 균체외 효소의 경우는 배지 1ml 당, 30분당 생성된 *p*-nitrophenol μmol을 1 unit로 하였다.

효소의 분리 및 정제

상기의 조효소액을 Diaflo PM-10 membrane(MW cutoff ; 10,000)을 부착한 Amicon Diaflo system을 사용하여 4℃, N_2 gas하에서 가압농축하였으며 효소 농축액 10ml를 10mM의 sodium acetate buffer(pH 4.6)로 평형화시킨 Sephacryl S-500 column(2.80×46cm)에 주입하여 동일 buffer로써 유속 0.25ml/min, 20분 간격으로 분획하였다. 분리된 효소 peak은 다시 Amicon Diaflo system에 의하여 농축하여 효소의 성질을 조사하는데 사용하였다.

Gel여과에 의한 분자량 측정

전보[13]의 polygalacturonase의 성질에서와 동일한 방법으로 분리농축한 효소용액을 Sephacryl S-200 column에 걸어 분획하고, 표준단백으로 부터 구한 검량선 $MW \times 10^5 = -0.774\ Ve/Vo + 2.065$, r=−0.9779에 의하여 개략적인 평균분자량을 구하였다.

생화학적 성질

균체내 및 균체외 β-Galase의 기질 *p*-nitrophenyl-β-galactoside의 농도에 따른 활성변화를 측정하여 K_m값과 V_{max}값을 구하였다. 최적온도는 0~60℃ 범위에서 10℃ 간격으로 측정하여 구하였으며 최적 pH는 3~10 범위에서 조사하였다. 또 소금의 농도에 대한 영향을 보기 위하여 김치의 소금농도를 고려하여 0~10%범위에서 조사하였으며, 열에 대한 내성의 조사는 60~90℃ 범위에서 10분간 가열한 후 최적온도 및 pH조건에서 활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

β-Galactosidase의 분리

β-Galase는 식물의 세포벽을 구성하는 galactan과 arabinogalactan 등 β-1,4 galactoside 결합을 하고 있는 hemicellulose를 절단하여 가용화시키는 효소로써 과실과 침채류의 연화와 밀접한 관련이 있는 효소이다[2,14]. Fig. 1과 2는 *L. acidophilus*를 김치제조에 이용할 경우 김치의 연화에 미치는 영향을 조사하기 위하여 이 균이 생성하는 β-Galase를 균체내 및 균체외 효소로 구분하여 Sephacryl S-200 column으로 분획한 결과이다. MRS배지 1L에 균을 접종하여 48시간 배양

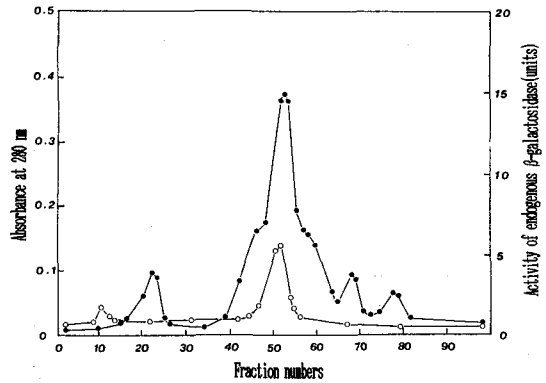

Fig. 1. Elution profile of endogenous β-galactosidase extracted from *L. acidophilus* on Sephacryl S-500 column. Column size; 2.80×46.0cm, flow rate ; 0.25ml/min., ● ; absor-bance at 280nm, ○ ; β-galactosidase activity

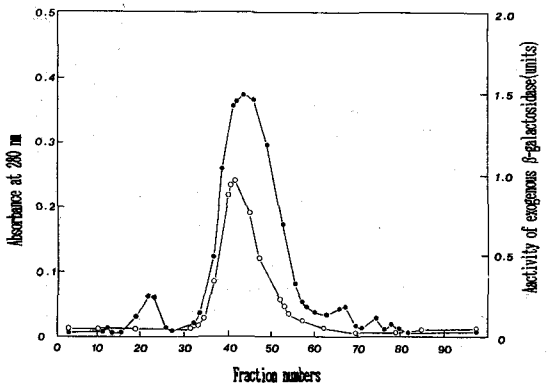

Fig. 2. Elution profile of exogenous β-galactosidase extracted from *L. acidophilus* on Sephacryl S-500 column. Column size ; 2.80×46.0, flow rate ; 0.25ml/min., ● ; absorbance at 280nm, ○ ; β-galactosidase activity

하여 얻은 균체는 20g정도였으며 추출한 효소를 20ml로 농축한 액 5ml을 column에 걸었을 때 chromatogram(Fig. 1)상의 최대 활성 unit가 6인데 비하여 균체외 효소의 경우(Fig. 2)는 상징액 1L 중 150ml를 20ml로 농축하고 그 중 5ml을 column에 걸었을 때 얻은 결과로써 균체외 효소의 활성도가 현저하게 높음을 알 수 있다. 그리고 균체내 효소는 fraction No. 47~56에, 균체외 효소는 fraction No. 35~50에 peak가 분리되었으며 개략적인 평균분자량은 각각 550,000 및 740,000 daltons이었다. β-Galase의 분자량은 출처에 따라서 상이한 결과를 보이고 있는데 신 등[1]은 감의 경우 115,000으로 보고하였고, Pressey[15]는 토마토에서 144,000, 620,000, 710,000 daltons의 3종의 isoenzyme을 분리하였다. 또 Ohtani와 Misaki[16]는 papaya에서 156,000 daltons의 β-Galase를 분리하였고, Takonishi 등[17]은 *Pen. multicolor*에서 126,000 dalton의 β-Galase를 분리하였다.

생화학적 특성

Sephacryl S-200 column에 의하여 분리된 균체내외 효소를 이용하여 기질의 농도와 pH, 온도, 반응시간에 따른 활성변화와 열에 대한 안정성을 조사하였다. Fig. 3과 4의 결과는 기질에 대한 특이성을 조사한 결과로서 100mg%의 *p*-nitrophenyl-β-galactoside를 기질로 하였을 때 균체내 β-Galase의 K_m값은 1.67mg/ml, 균체외 효소는 1.33mg/ml이었고, V_{max}는 각각 8.5μmol/mg/30min., 2.65 μmol/ml/30min이었다. 또 반응시간에 따른 활성변화를 측정한 결과(Fig. 5) 균체내외 효소 다같이 반응 30분에 최대값을 나타내었고 그 이후 반응시간이 경과됨에 따라 점진적인 감소현상을 나타내었다. Fig. 6은 pH에 따른 활성변화를 측정한 결과로써 균체내외 효소 다같이 pH 3~6 범위에서는 매우 낮은 활성치를 보이다가 균체내 효소는 pH 6.5~8.0사이에서 그리고 균체외 효소는 pH 6.5~9.5범위에서 높은 활성도를 나타내었으며 최적 pH는 각각 7.0과 8.0임을 볼 수 있다.

따라서 *L. acidophilus*가 생성하는 β-Galase는 김치의 담금초기, pH 6.5~6.0 일 때 어느 정도 작용할 것으로 보이나 그 후 숙성이 진행되어 pH가 떨어지면 활성이 크게 떨어질 것으로 판단된다. β-Galase의 최적 pH는 출처에 따라서 크게 다른 것으로 알려져 있는데 감의 경우[1]는 pH 4.2이며 pH 6.0 이상에

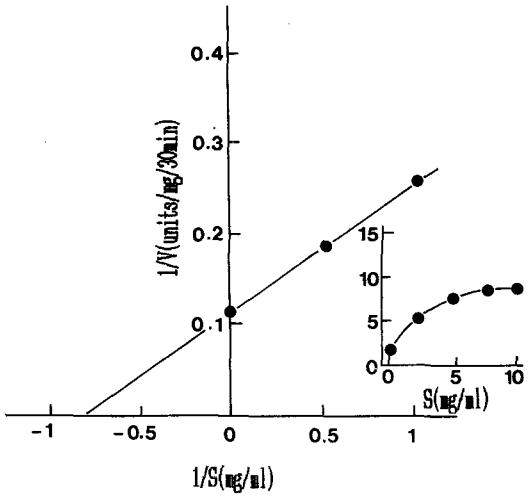

Fig. 3. Lineweaver-Burk plots of endogenous β-galactosidase extracted from *L. acidophilus*.

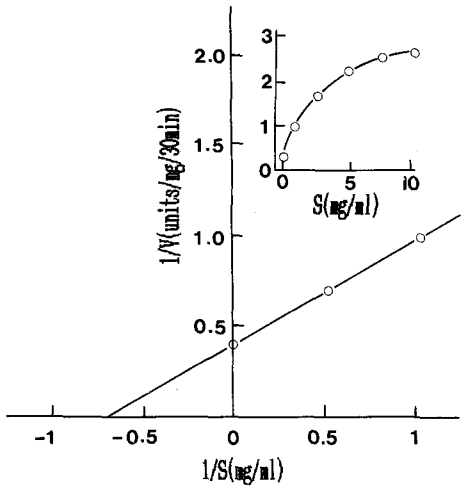

Fig. 4. Lineweaver-Burk plots of exogenous β-galactosidase extracted from *L. acidophilus*.

서는 활성을 거의 나타내지 않으며 Gatt와 Baker[18]는 상추잎의 β-Galase의 최적 pH가 4.2라고 보고하였고, Pressey[15]는 토마토의 경우 isoenzyme간에 다소 차이를 보이나 4.0~5.5범위라 보고하였다. 또 papaya 과실의 경우[16] pH 3.5~4.5, *Penicillium multicolor*[17]의 경우 pH 4.0으로 보고되어 있다. 따라서 *L. acidophilus*의 β-Galase는 지금까지 보고된 β-Galase의 최적 pH가 4~5사이로 보고된 것과는 상당한 차이가 있음을 볼 수 있다. 온도별에 따른 활성변화를 조사한 결과 (Fig. 7), 10℃의 저온에서도 비교적 높은 활성을 띠었으며 균체내외 효소 다같이 30℃에서 최대활성을 나타내었다. 그리고 소금농도별에 따른 활성 (Fig. 8)

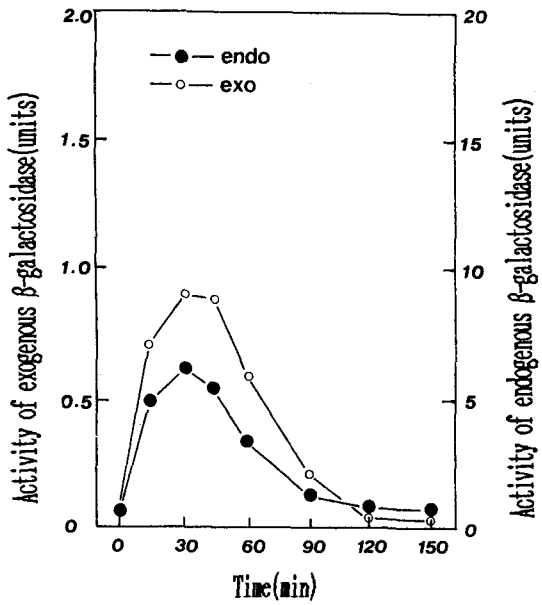

Fig. 5. Time course on the activities of endogenous and exogenous β-galactosidase extracted from *L. acidophilus*.

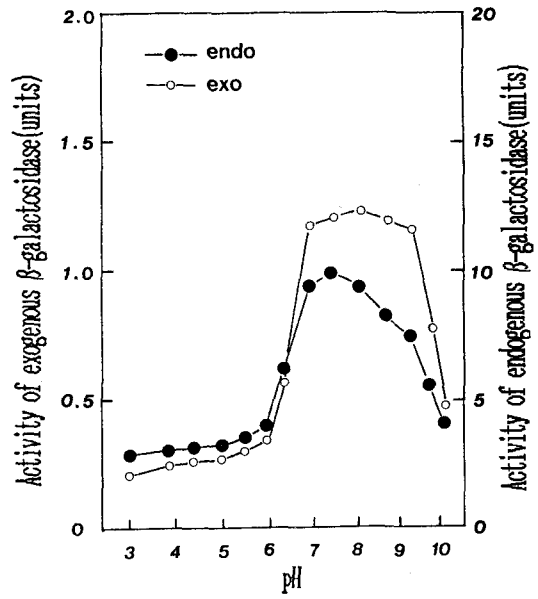

Fig. 6. Effect of pH on the endogenous and exogenous β-galactosidase activities extracted from *L. acidophilus*.

은 김치의 소금농도 범위인 4~5%에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 이와 같은 결과들에서 보면 *L. acidophilus*가 생성하는 균체내외 β-Galase는 10℃의 저온에서도 특히 김치의 담금초기에 작용하여 세포

벽 구성 hemicellulose를 상당히 손상시킬 것으로 생각되며 이어서 polygalacturonase가 더욱 쉽게 작용하여 연화에 관여할 것으로 추측[13]되나 더욱 숙성되어 pH가 떨어지면 김치의 원 부재료들에서 부터 유래하는 최적 pH 4.0~5.0를 지니는 식물성 β-Galase에 의하여 연화가 주도될 것으로 평가된다. 균체내 및 균체외 β-Galase의 열에 대한 안정성을 조사하기 위하여 60~90℃ 범위에서 0~10분간 시간별로 열처리

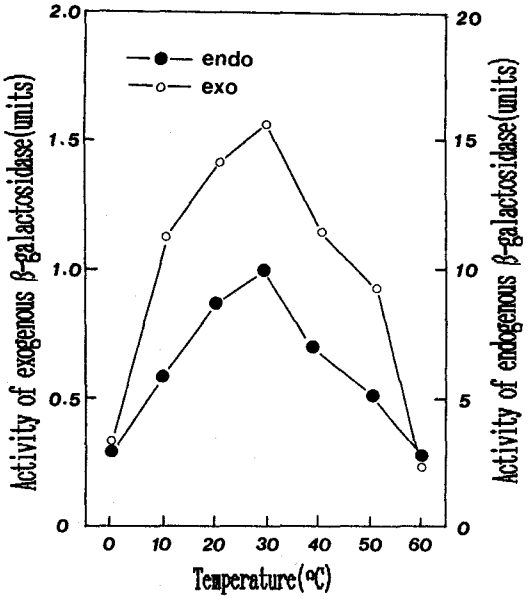

Fig. 7. Effect of temperature on the endogenous and exogenous β-galactosidase activities extracted from *L. acidophilus*.

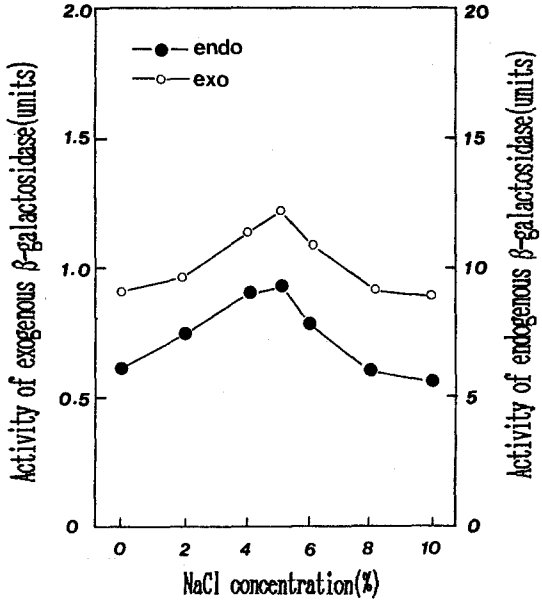

Fig. 9. Effect of heating temperature and time on the stability of endogenous β-galactosidase extracted from *L. acidophilus*.

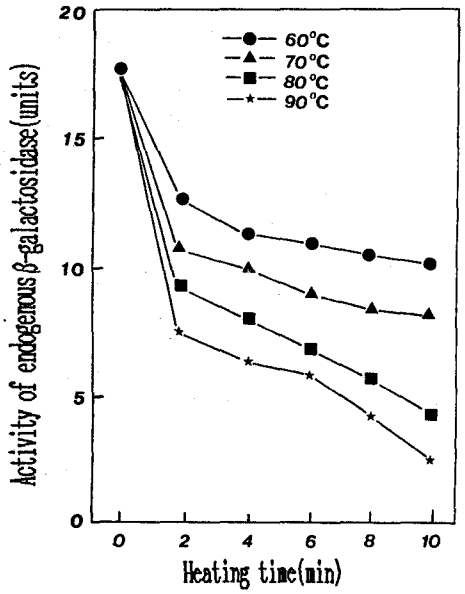

Fig. 8. Effect of NaCl concentration on the endogenous and exogenous β-galactosidase activities extracted from *L. acidophilus*.

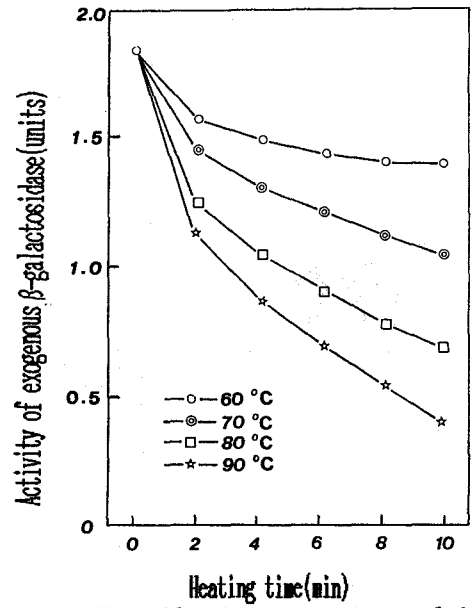

Fig. 10. Effect of heating temperature and time on the stability of exogenous β-galactosidase extracted from *L. acidophilus*.

한 후 잔존활성을 측정한 결과(Fig. 9와 10) 온도가 높아질 수록 활성이 크게 감소하였으나 그 감소율은 최초 2분간 처리시에 높았으며 그 후는 균체내외 효소 다같이 시간의 경과에 따라 완만한 감소를 보였다.

요 약

*Lactobacillus acidophilus*를 이용한 배추김치 제조 연구의 일환으로 이 균이 생성하는, 김치의 연화와 밀접한 관련이 있는 효소의 하나인 β-galactosidase (β-Galase)의 성질을 균체내외 효소로 구분하여 조사하였다. Gel여과법에 의하여 측정한 균체내외 β-Galase의 개략적인 분자량은 각각 550,000 및 740,000 dalton이었으며 K_m값은 각각 1.67mg/ml 및 1.33mg/ml, V_{max}은 각각 8.5μmol/mg/30min 및 2.65μ mol/ml/30min이었다. 최적 pH는 균체내 효소의 경우는 7, 균체외 효소는 8이었으며 최적온도는 다같이 30℃, 최적 소금농도는 4~5%이었다. β-Galase의 열에 대한 안정성은 60℃에서 90℃로 온도가 높아질수록 그리고 열처리 시간이 길어질수록 감소하였는데 최초 열처리 2분간의 감소율이 가장 높았다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 연구비의 지원(과제번호 : 911-1508-091-2)으로 이루어진 연구결과의 일부이며 지원당국에 감사를 드립니다.

문 헌

1. 신승렬, 김진구, 김순동, 김광수 : 감과실의 성숙과 추숙중의 β-galactosidase 활성변화 및 특성. 한국영양식량학회지, **19**(6), 596(1990)
2. Huber, D. J. : The role of cell wall hydrolases in fruit softening. *Horticultural Review,* **5**, 169(1983)
3. 구영조, 최신양 : 김치의 과학기술. 한국식품개발연구원 기술신서 제2집, 창조(1991)
4. 김순동, 강명수, 김광수 : 고추의 성숙에 따른 세포벽 다당류의 변화 β-galactosidase isoenzyme의 분리. 한국영양식량학회지, **14**(2), 157(1985)
5. 김순동, 이신호, 김미정, 오영애 : pH조정제를 이용한 저염 배추김치의 숙성 중 pectin질의 변화. 한국영양식량학회지, **17**(3), 255(1988)
6. Hobson, G. E. : Enzymes and texture changes during ripening. In *"Recent advances in the biochemistry of fruit and vegetables"*. Friend, J. and Rhodes, M. J. C. (eds.), Academic Press, London, p. 123(1981)
7. Bartly, I. M. : β-Galactosidase activity in ripening apple. *Phytochem.*, **13**, 2107(1974)
8. Gross, K. C. and Same, C. E. : Changes in cell wall neutral sugar composition during fruit ripening : A species survey. *Phytochem.*, **23**(11), 2457(1984)
9. Wallner, S. J. and Bloom, J. H. : Characteristics of tomato cell wall degradation *in vitro*. Implication for the study of fruit softening enzymes. *Plant Physiol.*, **60**, 207(1977)
10. Gross, K. C. and Wallner, S. J. : Degradation of cell wall polysaccharides during tomato fruit ripening. *Plant Physiol.*, **63**, 117(1979)
11. Moshrefi, M. and Luh, B. S. : Purification and characterization of two tomato polygalacturonase isoenzymes. *J. Food Biochem.*, **8**, 39(1984)
12. Nevins, D. J. : Elation of glycosidases to bean hypocotyl growth. *Plant Physiol.*, **46**, 458(1970)
13. Kim, S. D., Jang, K. S., Oh, Y. A., Kim, M. J. and Jung, Y. J. : *Lactobacillus acidophilus*가 생성하는 polygalacturonase의 성질. 한국영양식량학회지, **20**(5), 450(1991)
14 오영애, 이만정, 김순동 : 염지오이피클의 숙성중 펙틴질의 변화. 한국영양식량학회지, **19**(2), 143(1990)
15. Pressey, R. : β-Galactosidase in ripening tomatoes. *Plant Physiol.*, **71**, 132(1983)
16. Ohtami, K. and Misaki, A. : Purification and characterization of β-D-galactosidase and α-D-mannosidase from papaya*(Carica papaya)* seeds. *Agric. Biol. Chem.*, **47**(1), 2441(1983)
17. Takenishi, S., Watanabe, Y., Miwa, T. and Kobayashi, R. : Purification and some properties of β-galactosidase from *Penicillium multicolor*. *Agric. Biol. Chem.*, **47**(11), 2553(1983)
18. Gatt, H. and Baker, E. A. : Purification and separation of α-and β-galactosidase from spinach leaves. *Biochem. Biophysiol. Acta.*, **206**, 125(1970)

(1991년 10월 11일 접수)