

젓갈에서 분리한 *Lactobacillus* spp.의 β -galactosidase 특성

김종현* · 이영환 · 오민근 · 이용규¹ · 신승이²

전남대학교 농과대학 농화학과, ¹전남대학교 농과대학 낙농학과, ²동아전문대학 식품가공과

초록 : 젓갈에서 분리한 유산균 *Lactobacillus(L.) casei* 2주와 *L. pentosus* 1주의 균체내 β -galactosidase의 최적 생성 조건과 특성을 조사하였다. β -galactosidase의 최적 생성조건 조사에서, *L. casei* No.10 균주는 탄소원으로 lactose를, *L. pentosus* No.63 균주는 galactose를 1.0% 함유한 초기 pH 7.5의 MRS broth에서 30°C로 48시간 배양하였을 때로 확인되었다. *L. casei* No.36 균주는 lactose를 1.0% 함유한 초기 pH 6.5의 MRS 배지에서 30°C로 48시간 배양하였을 때가 최적 조건으로 확인 되었다. 효소의 최적 활성 반응온도는 3 균주 모두 60°C였으며, *L. casei* No.10은 45°C까지, *L. pentosus* No.63은 55°C까지 90% 이상의 안정성을 나타내었다. *L. casei* No.36은 40°C까지 안정성을 유지하였으나 55°C에서 60%로 효소활성이 감소하였으며, 따라서 40°C까지 3 균주 모두 90% 이상의 안정성을 나타내었다. 한편 효소활성의 최적 pH는 3 균주 모두 pH 6.5이었으며, *L. casei* No.10은 pH 5.0~6.0, *L. casei* No.36은 pH 5.0~8.0, 그리고 *L. pentosus* No.63은 pH 6.0~7.0에서 각각 90% 이상의 안정성을 보였다.(1996년 9월 4일 접수, 1996년 10월 16일 수리)

서 론

유산균이 생성하는 β -galactosidase(β -galactoside galactohydrolase, EC. 3.2.1.23)는 lactose의 β -1-4-glycosidic 결합을 분해하여 glucose와 galactose를 생성하는 endoenzyme 으로, 장내에 이 효소가 결합되면 lactose intolerance을 일으키며 lactose에 의한 농축 유제품과 아이스크림에 생기는 sandiness, 그리고 낮은 감미도를 해결하는 방안으로 연구되어 왔고, 또한 식물 세포벽을 구성하는 pectin질의 측쇄인 galactan이나 arabinogalactan에 작용하여 arabinose와 galactose를 유리하여 조직의 연화에 관여한다고 보고 되었다.¹⁻⁶⁾

유산균은 Gram 양성으로 catalase 음성, 내산성, 그리고 비포자성으로 발효에 의한 에너지원으로 탄수화물을 사용하여 lactic acid와 acetic acid를 최종산물로 생성하는 일반적으로 통성 혐기성 세균으로, glucose 발효시 생산되는 산물에 따라 호모 발효 유산균(homo fermentative lactic bacteria)과 헤테로 발효 유산균(hetero fermentative lactic bacteria)으로 구분 된다.

한편, 한국인의 식생활에 중요한 위치를 차지하고 있는 젓갈류는 어패류를 원료로 여러종류의 미생물과 효소작용에 의한 전통 발효 식품이다. 이는 특유의 맛과 유리 아미노산 및 정미 성분이 풍부하여 단백질 공급원으로서 뿐 아니라 김치의 부원료나 조미료로써 우리의 식생활과 밀접한 식품이나 이의 발효에 관련된 유산생성 균주와 이러한 유산균이 생성하는 β -galactosidase 활성에 관한 연구는 아직 미미한 형편이다.⁷⁻⁹⁾

따라서 본 연구에서는 전보에서 보고¹⁰⁾한 우리의 전통 발

효 식품인 젓갈류로부터 분리한 유산균을, 우유를 원료로 하는 유제품 및 기타 발효식품산업에 이용 가능한지의 여부를 면밀히 검토하고자 우선 탄소원에 따른 β -galactosidase의 최적 생성 조건과 여러 반응 조건에서 효소 활성을 조사하였다.

재료 및 방법

유산균의 배양 및 보관

유산균은 전보¹⁰⁾의 *Lactobacillus(L.) casei*로 동정된 *L. casei* No.10과 No.36 그리고 *L. pentosus*로 동정된 *L. pentosus* No.63을 본 실험에 사용 하였다. 이들 유산균은 MRS agar 배지에 접종, 배양한 후 glycerol의 최종농도가 20% (W/V)되도록 첨가하여 -70°C에 냉동 보관하며 필요에 따라 MRS broth(pH 6.5)에 배양하여 사용하였다.

단백질 정량

Bradford 방법¹¹⁾에 의하여 유산균을 MRS broth에 접종한 후 30°C에서 배양하고 대수증식 말기에 회수하여 Bovine serum albumin(BSA)을 표준 단백질로 단백질 함량을 정량하였다.

조효소액 조제

Shan 등¹²⁾의 방법을 변형하여 탄소원이 첨가된 MRS배지 20 ml에 유산균을 접종, 배양한 후 균체를 4°C에서 9,500 rpm으로 10분간 원심분리(Centricon T124)하여 회수하고 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.0)로 세척한 후, 동일한 buffer 2 ml에 현탁하여 ice-bath상에서 초음파 처리

찾는말 : *Lactobacillus* spp., β -galactosidase, 젓갈

*연락처자

(50 sec, 90 mA)하였다. 이를 다시 12,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 얻어진 상등액을 조효소액으로 사용하였다. 기질은 *o*-nitrophenyl- β -D-galacto-pyranoside (ONPG)를 5 mM의 농도로 0.1M potassium phosphate buffer(pH 7.0)에 용해시켜 2 ml씩 나눠 4°C에 보관하면서 사용하였다.

효소 활성 측정

기질 2 ml와 조효소액 0.5 ml를 37°C에서 15분간 반응시키고 반응을 정지시키기 위해 2.5 ml의 냉각된 0.5 M Na_2CO_3 용액을 가하고 OD 420 nm에서 유리 *o*-nitrophenol을 비색 정량하였다. 한편 기질액만을 상기 조건으로 반응시킨 후 반응정지액과 조효소액을 차례로 첨가하여 blank로 하였다.¹³⁾ 효소활성 단위(U)는 Mahoney 등¹⁴⁾의 방법에 따라 37°C에서 1 g의 시료당 1분간 ONPG로 부터 1 mol의 *o*-nitrophenol을 유리할 때 1 unit로 하였다.

효소의 최적 생성 조건

균주의 β -galactosidase 생성은 배지의 종류, 배양시간, pH 그리고 배양온도 등에 영향을 받는 것으로 보고^{15,16)}됨에 따라 MRS broth에 여러 종류의 탄소원을 최종 농도가 1.0~3.0%수준이 되도록 첨가하여 48시간 배양한 후 조효소액을 조제하고 기질(ONPG)과 반응시켜 OD 420 nm에서 spectrophotometry (UV-1201 spectrophotometer)로 효소 활성을 측정, 비교하여 최적 탄소원과 탄소원의 농도를 선택 하였다. 초기 pH와 배양온도에 따른 효소 최적 생성 조건은 pH와 배양온도를 각각 pH 5.5, pH 6.5, pH 7.5와 22.5°C, 30.0°C, 37.0°C, 45.0°C로 조정, 배양한 후 효소 활성도를 측정 비교하였다.

효소 최적 반응 조건 및 안정성

조효소액과 5 mM ONPG 기질을 30~60°C에서 15분간 반응시켜 효소활성을 측정하여 최적 반응온도를 조사하였고, 균체생육은 OD 660 nm의 흡광도로 나타내었다. 또한 조효소액을 35~55°C에서 10분간 열처리한 후 37°C에서 ONPG를 기질로 하여 효소활성을 측정하여 열에 대한 안정성을 조사하였다. 효소의 최적 pH와 pH 안정성은 ONPG의 pH를 pH 3.0~7.5로, 조효소액의 pH를 pH 5.0~8.0으로 각각 달리하여 37°C에서 15분간 반응시킨 후 효소 활성을 측정하였다. 이때 기질과 조효소액의 pH 조정을 위하여 pH 3.0~5.5는 McIlvaine buffer를, pH 6.0~8.0은 0.1M potassium phosphate buffer를 사용하였다.

결과 및 고찰

효소의 specific 활성

대수증식 후기에서 단백질을 정량하고 효소활성을 측정하였다. 그 결과 β -galactosidase specific 활성은 *L. pentosus* No.63에서 34.00 unit/mg protein으로 가장 높게 나타났다(Table 1), 본 실험 결과는 보고^{15,17)}된 대부분의 *Lactobacilli* 균종과 유사하였다.

Table 1. β -Galactosidase activity of *Lactobacilli* cultured with MRS broth at the late log phase.

Strain No.	Protein (mg/ml)	Enzyme activity (U/ml)	Specific activity (U/mg)	Total enzyme activity (U)	Cell growth (OD ₆₆₀)
10	0.054	1.134	21.00	22.68	1.721
36	0.016	0.333	21.00	6.60	1.406
63	0.024	0.800	34.00	16.00	1.959

효소의 최적 생성 조건

(1) 탄소원

MRS broth의 조성분 중 dextrose 대신 1.0%의 lactose를 비롯한 5종의 탄소원을 각각 첨가한 결과 *L. casei* No.10과 No.36은 lactose의 탄소원에서 효소활성이 가장 효과적이었으며 그 다음이 galactose이었다. 이러한 결과는 *Streptococcus (Str.) lactis* 경우 galactose는 lactose에 비해 효과적이지 못하나 β -galactosidase의 좋은 inducer가 될 수 있다는 Citti 등¹⁸⁾의 보고와 유사하였다. 그러나 *L. pentosus* No.63은 galactose에서 가장 좋은 활성을 보였으며, 그외 다른 탄소원에서는 효소활성을 거의 찾을 수 없었다(Fig. 1). 최적 탄소원의 농도를 조사하기 위하여 *L. casei* No. 10과 No.36은 lactose를, *L. pentosus* No.63은 galactose를 1.0~3.0%의 수준으로 농도를 달리하여 배지에 첨가하여 효소활성을 비교한 결과 Fig. 2와 같이 3 균주 모두 1.0%에서 가장 높은 효소활성을 나타내었으며, 1.5%에서 현저히 감소 하였다. 2% 이상의 농도에서 *L. casei* No.10과 No. 36은 효소활성이 점차 증가하는 경향을 보였고, *L. pentosus* No.63은 더욱 감소함에 따라 *L. sporogenes*의 경우 당의 농도가 증가 할 수록 더 큰 효소활성 저해 효과가 있다는 김 등¹⁹⁾의 보고와는 일치하지 않았다. 이는 균주에 따라 다른 양상을 보일 수 있는 것으로 사료되었으나, 균체성장은 탄소원의 농도와 무관하게 모든 균주가 비교적 좋았고 2.0%에서 가장 생육이 왕성하였다. 따라서, *L. casei* No. 10과 No.36에서는 lactose가, *L. pentosus* No.63에서는 galactose가 β -galactosidase의 생산을 유도하는 탄소원으로 가장 적합하였고, 그 농도는 1.0%로 나타났다.

(2) 배양 시간 및 온도

최적 탄소원의 농도로 조정된 배지에 유산균을 접종한 후 30°C에서 72시간 동안 배양하며 경시적으로 효소역가와 균체생육도를 측정 하였다. 배양 48시간에서 가장 높은 효소활성을 보였으며, 시간에 따른 균체생육도는 거의 일정하였다(Fig. 3). 또한, 22.5°C, 30.0°C, 37.0°C, 45.0°C로 배양 온도를 달리하여 배양한 결과 3 균주 모두 30°C에서 효소활성이 가장 높았으나, 균체생육도는 3 균주 모두 30~37°C에서 가장 높았다. 45°C에서는 모든 균주가 성장이 저해되어 효소활성이 거의 없었다. 한편 최종 pH는 균체생육이 가장 왕성한 37°C에서 가장 낮았다(Fig. 4).

(3) 초기 pH

배지의 초기 pH를 5.5~7.5로 조정하여 30°C에서 48시간 배양한 후 효소활성을 비교하였다. 그 결과 Fig. 5에서 처럼

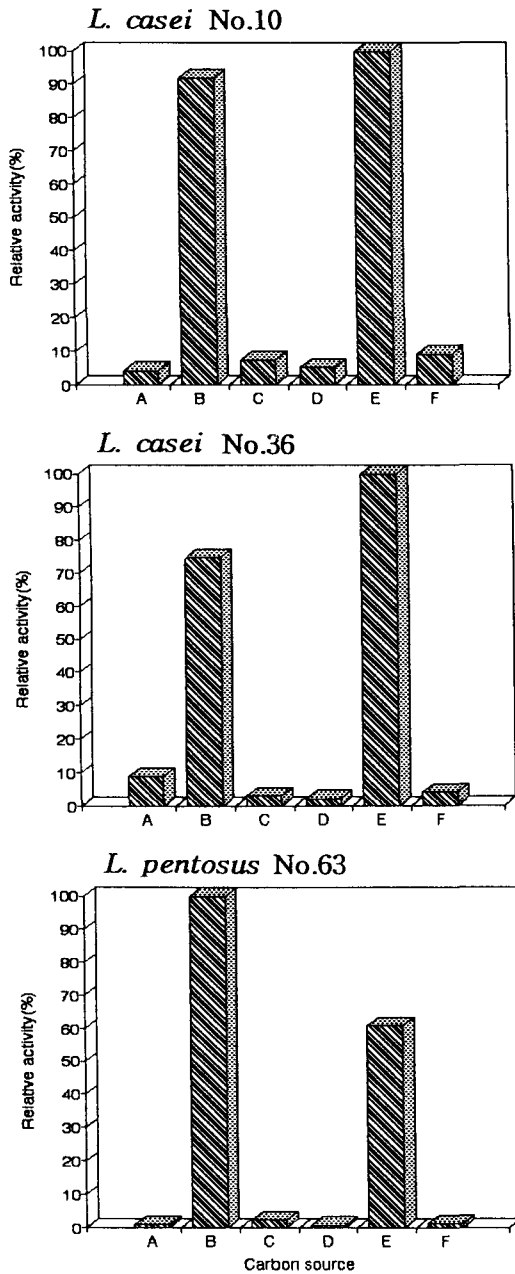


Fig. 1. Effect of various carbon sources in broth medium on the β -galactosidase production from *Lactobacilli* after 48 hrs at 30°C. A: Fructose, B: Galactose, C: Glucose, D: Maltose, E: Lactose, F: Sucrose.

L. casei No.36은 초기 pH 6.5에서, *L. casei* No.10과 *L. pentosus* No.63은 초기 pH 7.5에서 가장 높은 효소활성을 보였으며, 모든 균주가 pH 5.5에서 가장 낮은 활성을 나타내었다. *L. casei* No.10, No.36의 균체생육도는 모든 pH에서 일정하게 유지되었으나, *L. pentosus* No.63은 pH 6.5까지 일정하게 유지되다가 pH 7.5에서 감소하였다.

효소의 최적 반응 조건

효소반응의 최적 온도는 조효소액과 기질인 ONPG를 30~60°C에서 15분간 반응시켜 활성을 측정하였다. 3 균주

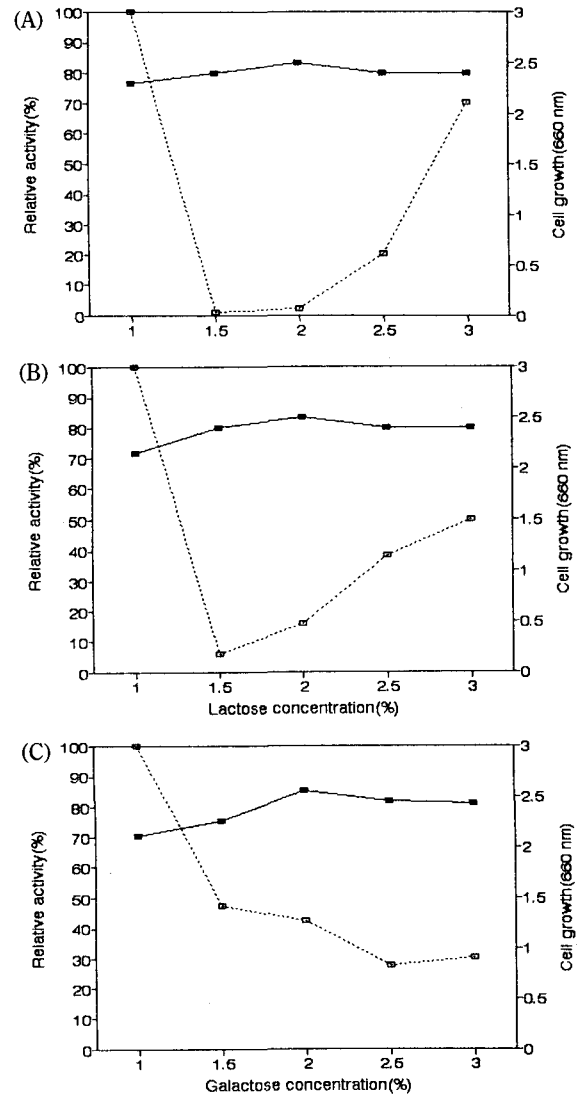


Fig. 2. Effect of lactose or galactose concentration (% W/V) in broth medium on β -galactosidase production from *Lactobacilli* after 48 hrs at 30°C. □··□, Enzyme activity; ■—■, Cell growth; A : *L. casei* No.10, B : *L. casei* No.36, C : *L. pentosus* No.63.

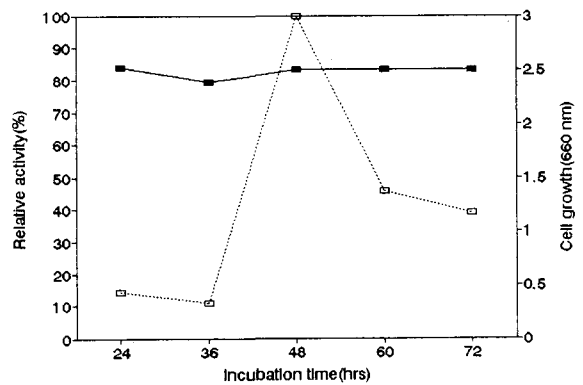


Fig. 3. Effect of incubation time on β -galactosidase production from *Lactobacilli* at 30°C. □··□, Enzyme activity; ■—■, Cell growth.

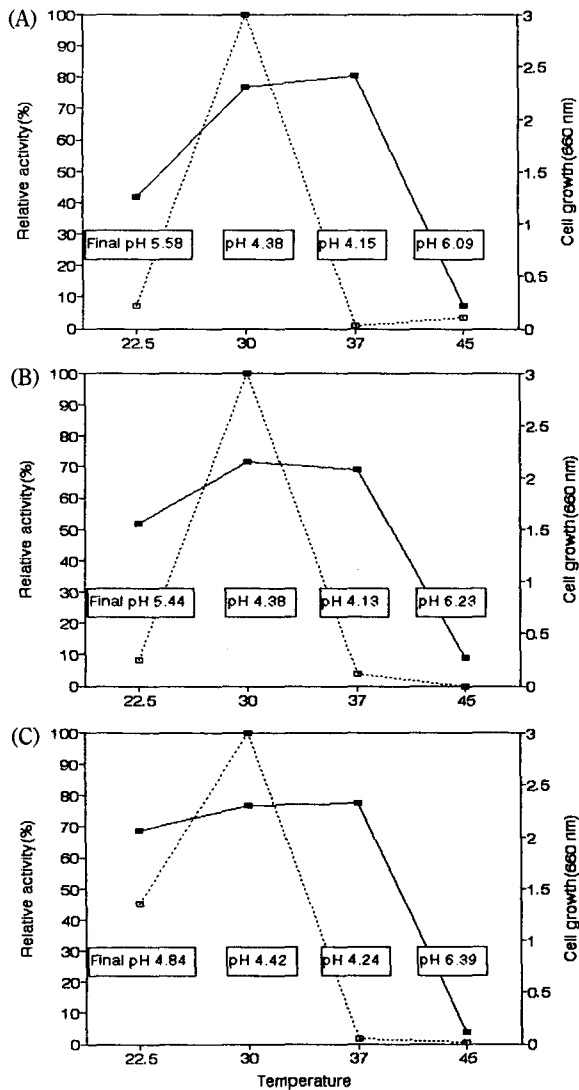


Fig. 4. Effect of cultural temperature on the β -galactosidase production from *Lactobacilli* after 48 hrs. $\square \cdots \square$, Enzyme activity; $\blacksquare - \blacksquare$, Cell growth; A : *L. casei* No.10, B : *L. casei* No.36, C : *L. pentosus* No.63.

모두 60°C에서 가장 높은 활성을 나타내었으며 특히, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*와 *L. acidophilus*의 경우 55°C에서 최고 활성을 보인 반면 60°C에서 활성이 상당히 감소하였다는 보고¹²⁾와 비교할 때 60°C의 높은 온도에서 가장 높은 활성을 보일 뿐만 아니라 효소활성이 소멸되지 않은 점은 주목할 만하였다(Fig. 6).

ONPG의 pH를 3.0~7.5까지 각각 조절한 후 37°C에서 조효소액과 15분간 반응시켜 효소의 최적 pH를 조사 하였다. 3 균주 모두 pH 6.5에서 최고 활성을 나타내었으며, pH 5.5에서 *L. casei* No.36은 60%의 효소활성을 보인 반면 *L. casei* No.10과 *L. pentosus* No.63은 40% 이하의 활성을 나타내었다. 이는 *Str. thermophilus*의 경우 pH 5.5 이하에서 효소의 활성이 현저히 저하되었다는 보고²⁰⁾와 유사하였다. 한편, pH 7.5 이상에서는 3 균주 모두 효소활성이 감소하였다(Fig. 7). 따라서 이들 3 균주의 효소 최적 반응 조건

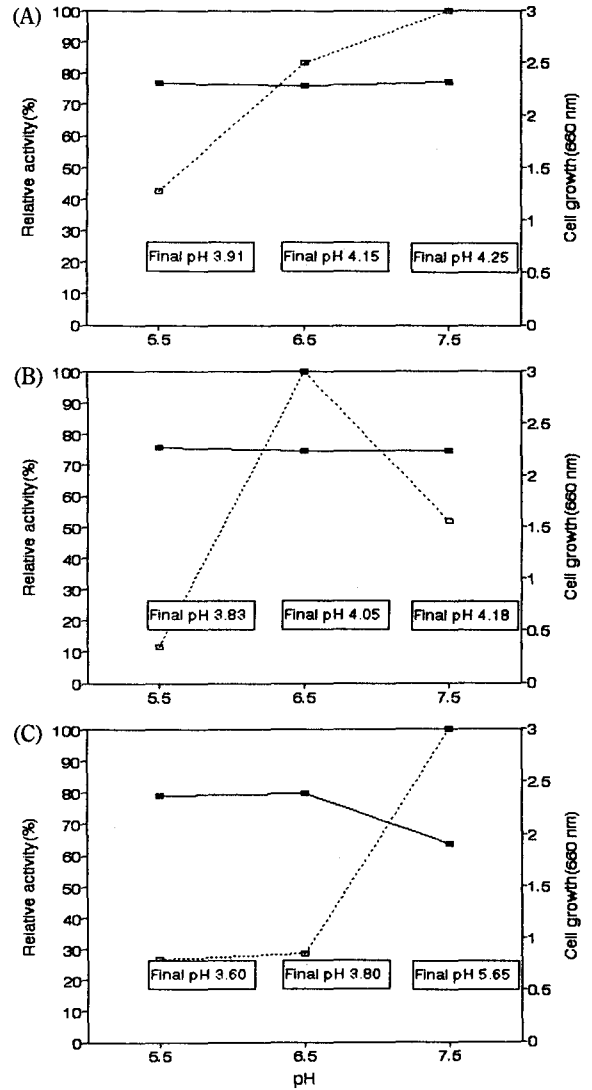


Fig. 5. Effect of initial pH in optimal broth medium on the β -galactosidase production from *Lactobacilli* after 48 hrs. $\square \cdots \square$, Enzyme activity; $\blacksquare - \blacksquare$, Cell growth; A : *L. casei* No.10, B : *L. casei* No.36, C : *L. pentosus* No.63.

은 pH 6.5와 60°C인 것으로 나타남에 따라 *L. sporogenes*의 경우¹⁹⁾ lactose를 탄소원으로 했을 때 50~60°C, pH 6.5~7.5에서, 그리고 *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*와 *L. acidophilus*의 경우¹²⁾ pH 6.0~6.5에서 최고 활성을 보였다는 보고와 유사 하였다.

효소 안정성

열에 대한 효소의 안정성은 조효소액을 35~55°C에서 각각 10분간 열처리한 후 기질인 ONPG와 37°C에서 15분간 반응시켜 활성을 측정하여 조사하였다. *L. casei* No.10은 45°C까지, *L. pentosus* No.63은 55°C까지 90%이상의 안정성을 나타내었고, *L. casei* No.36은 40°C까지 안정성을 유지하였으나 55°C에서 60%로 효소활성이 감소하였다(Fig. 8). 따라서 이들 3 균주 모두 40°C까지 90% 이상의 안정성을 갖는 것으로 관찰되었으며, 이는 효모나 세균이 생산하

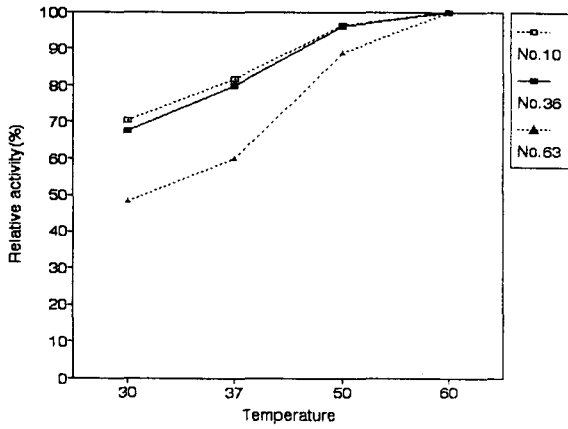


Fig. 6. Effect of temperature on the activity of β -galactosidase.

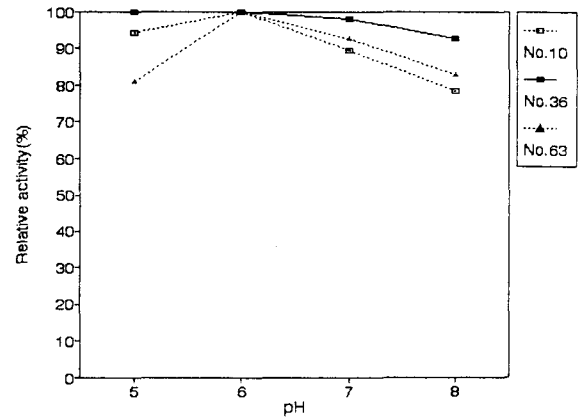


Fig. 9. Effect of pH on the stability of β -galactosidase.

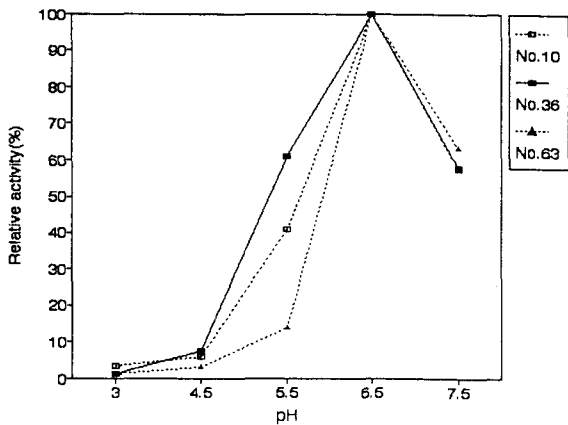


Fig. 7. Effect of pH on the activity of β -galactosidase.

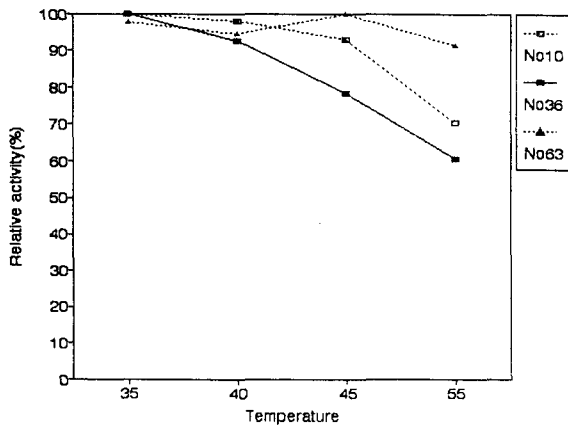


Fig. 8. Effect of heat treatment on the stability of β -galactosidase.

는 β -galactosidase가 중온성이라는 보고²¹⁾와 유사하였다. 그러나 *L. sporogenes*는 60°C에서 30분 열처리 후 90%의 효소활성이 유지되었다는 보고¹⁹⁾와 비교 할때 다소 낮은 열 안정성을 보였으며, 대부분의 열에 대한 안정성이 30분 이상에서 조사된바, 더 많은 검정이 필요하리라 사료 된다. 또한 효소의 pH 안정성은 pH 5.0~8.0까지의 McIlvaine buffer, potassium phosphate buffer와 조효소액을 1:1 비율로 혼합한 후 37°C에서 15분간 반응시켜 효소활성을 비

교하였다. 3 균주 모두 pH 6.0에서 가장 안정하였고, 그 이상의 pH에서는 점차 안정성이 감소하였으나 pH 5.0~8.0까지 비교적 안정하였다(Fig. 9). 이는 *L. sporogenes*의 경우 pH 5.0~9.0 범위에서 상당히 안정 하였다는 보고¹⁹⁾와 유사 하였다.

참 고 문 헌

1. Tumerman, L., H. Fram and K. W. Conely. (1954) The effect of lactose crystallization on protein stability in frozen concentrated milk. *J. Dairy Sci.* **37**, 830.
2. Rosensweig, N. S. (1969) Adult human milk intolerance and intestinal lactose deficiency, A review. *J. Dairy Sci.* **52**, 585.
3. Young, C. K., J. W. Stull, R. R. Tayler, R. C. Angus and T. C Daniel. (1980) Acceptability of frozen desserts made with neutralized, hydrolyzed, fluid cottage cheese whey. *J. Food Sci.* **45**, 805.
4. Goncalves, J. A. and F. J. coetillo. (1982) Partial purification and characterization of β -D-galactosidase from *Kluyveromyces marxianus*. *J. Dairy Sci.* **65**, 2088.
5. Alpers, D. H. (1969) Separation and isolation of rat and human intestinal β -galactosidase. *J. Biol. Chem.* **224**, 1238-1246.
6. 구영조, 최신양. (1991) 김치의 과학 기술. 한국식품개발연구원 기술신서 제2집, 창조.
7. Chung, S. Y. and Lee, E. H. (1976) The taste compounds of fermented *Acetes chinensis*. *Bull. Korean Fish. Soc.* **9**, 79.
8. 이응호, 김세권, 전중균, 김수현, 김정균. (1982) 멸치젓의 정미 성분. 부산수산대학 연구보고. **22**, 13.
9. 이종갑, 최위경. (1974) 멸치젓갈 숙성에 따른 미생물상의 변화에 대하여. 한국수산학회지. **7**(3), 105-114.
10. 김종현, 이영환, 나한주, 이용규, 신승이. (1996) 젓갈에서 분리한 *Lactobacillus* spp.로 제조한 요구르트의 이화학적 특성. 한국농화학회지. submitted.
11. Daniel M. Bollag, Stuart J. Edelstein. (1991) Protein methods, Wiley-Liss, Inc., 50-55.
12. Shan, N. and Jelen, P. (1990) Survival of lactic acid bacteria and their lactases under acidic conditions. *J. Food*

- Sci.* **55**, 506-509.
13. Lederberg, J. (1950) The β -D-galactosidase of *E. coli* strain K-12, *J. Bacteriol.* **60**, 381.
 14. Mahoney, R. R., Nickerson, T. A., and Whitaker, J. R. (1975) Selection of strain, growth conditions, and extraction procedures for optimum production of lactase from *Kluyveromyces fragilis*. *J. Dairy Sci.* **58**, 1620.
 15. Toba, T., Y. Tomita, T. Itoh, and S. Adachi. (1981) β -Galactosidase of lactic acid bacteria: Characterization by oligosaccharides formed during hydrolysis of lactose. *J. Dairy Science* 185.
 16. Wierzbicki, L. E. and F. V. Kosikowski. (1971) Preparation and characterization of lactase (β -galactosidase) for microbial. *J. Dairy Sci.* **54**, 763.
 17. Itoh, T., M. Suzuki, and S. Adachi (1982) Production and characterization of β -galactosidase from lactose-fermenting yeasts. *Agric. Biol. Chem.* **46**, 899.
 18. Citti, J. E., W. E. Sandine, and P. R. Elliker. (1965) β -Galactosidase of *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.* **89**, 937.
 19. 김영만, 이정치, 최용진, 양한철. (1985) *Lactobacillus sporogenes*에 의한 β -galactosidase 생산에 관한 연구. *Kor. J. Appl. Micro. Bioeng.* **13**(4), 355-359.
 20. Kang, K. H. and S. I. Park. (1989) *Streptococcus thermophilus* 510에 의한 β -galactosidase의 생산, 정제 및 특성. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **17**, 35.
 21. Kosikowski, F. V. and Wierzbicki, L. E. (1971) Preparation and characterization of lactase for microbial sources. *J. Dairy Sci.* **54**, 763.

β -galactosidase Activity of *Lactobacillus spp.* from Pickles

Jong-Hyun Kim*, Young-Hwan Rhee, Min-Keun Oh, Yong-Kyu Lee¹ and Seung-Yee Shin²(*Department of Agricultural Chemistry*; ¹*Department of Dairy Science, College of Agriculture, Chon-Nam National University, Kwang-Ju, 500-757 Korea*; ²*Department of Food Science & Technology, Dong-A Junior College, Yong-Am, 526-870 Korea*)

Abstract : Two strains of *Lactobacillus(L.) casei* and one strain of *L. pentosus*, which were isolated from pickles, were used to investigate in studying their characteristics of β -galactosidase. The preferable carbon sources and pH of the MRS media for enzyme production from *L. casei* No.10 was found to be 1.0% lactose and pH 7.5, from *L. pentosus* No.63 was 1.0% galactose and pH 7.5, and from *L. casei* No.36 was 1.0% lactose and pH 6.5, respectively. The maximum enzyme production from each strain was found after 48 hours culture at 30°C in a medium with preferable carbon source. The optimum reaction temperature with substrate for β -galactosidase activity was found at 60°C for all three strains. The stability of enzyme from *L. casei* No. 36 was found to be at 45°C, from *L. pentosus* No.63 was found at 55°C. This stability from *L. casei* No.36 was found at 40°C, but it was reduced to 60% at 55°C. These stabilities of enzymes remained about 90% at 40°C for all three strains. The optimal pH for enzyme activities was found to be pH 6.5 for all three strains. Enzyme activity remained over 90% for *L. casei* No.10 at pH 5.0~6.0, for *L. casei* No.36 at pH 5.0~8.0, and for *L. pentosus* No.63 at pH 6.0~7.0.

*Corresponding author