

Thermus caldophilus GK24로부터 내열성 β -galactosidase의 최적생산

유진상¹ · 김현규¹ · 인만진² · 김민홍² · 권석태^{1*}

¹성균관대학교 유전공학과, ²(주)미원 중앙연구소

Optimal Production of Thermostable β -galactosidase from *Thermus caldophilus* GK24. Jinsang Yoo¹, Hyunkyu Kim¹, Man-Jin In², Min-Hong Kim² and Suk-Tae Kwon^{1*}. ¹Department of Genetic Engineering, Sung Kyun Kwan University, Suwon 440-746, Korea, ²Biotechnology Division, R&D Center, Miwon Co. Ltd., Ichon 467-810, Korea - *Thermus caldophilus* GK24 was selected as sources of thermostable β -galactosidase from a survey of genus *Thermus*. *T. caldophilus* GK24 (*Tca*) β -galactosidase was found to be inducible. The enzyme was optimally active at 75°C. Enzyme induction was achieved by addition of lactose, galactose and cellobiose to basal media. The addition of glucose to culture media had a repressive effect on further enzyme synthesis. *T. caldophilus* GK24 was tested for production of β -galactosidase by addition of various concentration of lactose, galactose and cellobiose to standard media. Cellobiose was found to be effective for the β -galactosidase induction. The optimal induction medium for production of β -galactosidase was composed of 0.2% cellobiose, 0.3% bacto-tryptone, 0.3% yeast extract, basal salts and Tris/HCl(pH 7.8). The activity of the enzyme in the optimal induction medium increased nearly 16.5-fold compared to the standard medium. *Tca* β -galactosidase was detected when cell extracts was subjected to electrophoresis in a nondenaturing polyacrylamide gel and stained for activity with 6-bromo-2-naphtyl- β -D-galactopyranoside(BNG).

β -Galactosidase(lactase, EC 3.2.1.23)는 β -1,4-D-galactosidic linkages를 가수분해하는 효소이며, 동시에 transgalactosylation 반응도 촉매하는 활성을 가진다. 즉, β -galactosidase는 lactose(유당)를 glucose와 galactose로 분해시킬 뿐 아니라, 반응조건에 따라 glucose에 galactose를 결합시켜 oligosaccharides(올리고당)를 생산할 수 있는 효소로서 미생물, 식물, 동물 등에서 다양하게 발견된다(1, 2). β -Galactosidase는 우유 속의 유당을 분해시킬 수 있으므로 저유당 우유 제조에 이용되고 있다(3, 4). 최근 β -galactosidase는 장내유용 미생물인 *Bifidobacterium*의 증식을 촉진시키는 기능성 올리고당 제조에도 이용되고 있다(5, 6). 이와같이 β -galactosidase는 산업적으로 매우 중요하지만 현재 사용되고 있는 β -galactosidase는 대부분 중온성균으로부터 생산된 것이므로 유기용매 및 열에 불안정하여 실활하기 쉽기 때문에 많은 단점을 갖고 있다.

일반적으로 고온균(thermophile)이 생산하는 효소는 보통 중온균(mesophile)이 생산하는 효소와 동일한 기능을 갖고 있으면서도 중온성 세균이 갖지 못한 성질, 즉 고온과 같은 극한반응 조건에서도 쉽게 실활하지 않고 상당히 안정하기 때문에(7), 소량의 효소로서 장기간 사용이 가능하며, 고온에서 반응시키므로 반응시간도 단축할 수

있을 뿐 아니라, 다른 미생물의 증식방지 등 많은 장점을 갖고 있다(8, 9). 이러한 이유로 학문적으로나 산업적으로 내열성 β -galactosidase에 대한 다각적인 탐색과 연구가 고온균에서 진행되고 있다. 현재, 내열성 β -galactosidase에 대한 연구가 *Bacillus stearothermophilus*(10), *Thermus* strain T2(11), *Clostridium thermosulfurogems* EM1(12), *Saccharopolyspora rectivirgula*(13), *Solfataricus* strain MT-4(14) 등에서 보고되어 있다.

본 연구에서는 주로 온천에서 분리된 생육적온이 70-75°C인 *Thermus*속 균주를 중심으로 고온성 세균 9 종류를 배양하여 lactose 첨가에 의해 β -galactosidase 활성이 높게 나타난 *T. caldophilus* GK24(15)를 선별한 후, *T. caldophilus* GK24(*Tca*)가 생산하는 β -galactosidase의 유도기질 탐색과 최적생산을 위한 다양한 조건을 검토하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양조건

내열성 β -galactosidase의 탐색용 균주들로는 *Thermus* 속의 *T. caldophilus* GK24(15), *T. aquaticus* YT-1(16), *T. filiformis*(17), *T. flavus* AT-62(18), *Thermus* strain T2(11), *Thermus* strain T351(19), *Thermus* strain X-1(20), *T. thermophilus* HB8(21), *T. thermophilus* HB 27(22) 등을 사용하였다.

*Thermus*속 균주들을 30 ml의 기본배지[0.2% bacto-

*Corresponding author

Tel. 82-331-290-7863, Fax. 82-331-290-7870

E-mail: stkwon@yurim.skku.ac.kr

Key words: Thermostable β -galactosidase, *Tca* β -galactosidase, *T. caldophilus* GK24

tryptone, 0.2% yeast extract, basal salts용액, Tris/HCl 완충용액(pH 7.8)]에 접종하여 72°C에서 180 rpm으로 12시간 진탕 배양한 후, 이를 500 ml의 둥근 플라스크에 담긴 100 ml의 β -galactosidase의 생산 균주 선별용 배지에 1%로 접종하여 72°C에서 진탕배양하였다(16). β -Galactosidase의 생산 균주 선별용 배지는 기본배지에 1% lactose를 첨가한 것이다.

Basal salts의 조성은 1liter당 nitrilotriacetic acid 0.1 g, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.06 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, NaCl 0.008 g, KNO_3 0.015 g, NaNO_3 0.7 g, Na_2HPO_4 0.11 g, FeCl_3 용액(0.03%) 1 ml, Nitsch's Trace element[(H_2SO_4 0.5 ml, MnSO_4 2.2 g, ZnSO_4 0.5 g, H_3BO_3 0.5 g, CuSO_4 0.01 g)/l]용액 10 ml이었다(16).

내열성 β -galactosidase의 활성 측정

β -Galactosidase의 활성은 Miller의 방법(23)을 약간 변형하여 측정하였다. 효소반응은 30 mM sodium phosphate(pH6.0) 완충용액에 5 mM로 포함된 *o*-nitrophenyl β -D-galactopyranoside(ONPG)의 기질용액 400 μ l와 조효소액 20 μ l을 혼합하여 75°C에서 10분간 반응시킨 후 얼음에 옮겨 0.5M Na_2CO_3 400 μ l을 첨가하여 반응을 종결시켰다.

이 때 사용한 조효소액의 제조는 다음과 같다. 배양액 800 μ l를 취하여 원심분리한 후 세포 침전물을 50 mM sodium phosphate(pH6.0)완충용액 200 μ l에 현탁시켰다. 이 현탁액에 toluene과 acetone의 2:1 혼합액을 200 μ l 첨가하여 5분간 혼합후 분리하여 하층액 20 μ l를 취하여 조효소액으로 하였다.

효소활성은 420 nm에서 *o*-nitrophenol의 extinction coefficient가 $4.44 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 임을 이용하여 기질 ONPG로부터 유리되는 *o*-nitrophenol 흡광도를 측정하여 조사하였다(11). 효소 활성 1 unit(U/ml)은 75°C에서 1분당 1 mole의 *o*-nitrophenol을 유리시키는 효소량으로 정의하였다(23).

β -Galactosidase 생산균주 선별

β -Galactosidase 생산균주 선별용 배지로 기본배지에 1% lactose와 20 mM Tris/HCl 완충용액(pH 7.8)을 첨가하여 사용하였다. 기본배지에서 하룻밤 생육시킨 *Thermus*속 균주들을 β -galactosidase 생산균주 선별용 배지에 각각 1%씩 접종시킨 후, 72°C에서 12시간 이상 배양하면서 β -galactosidase 활성을 측정하여 생산균주를 선별하였다.

β -Galactosidase 최적유도 조건 탐색

Lactose에 의해 유도되는 β -galactosidase 생산균주를 선별한 후, lactose, galactose cellobiose를 이용하여 각

기질들의 β -galactosidase 유도 효과에 따른 최적농도를 조사하였다. 또 glucose의 효소 유도 억제효과도 표준배지에 각각 0.2%-1.0%의 glucose를 첨가하여 비교하였다.

세포 파쇄와 조효소 제조

동일한 농도로 조정된 배양액 100 ml를 원심분리하여 균체를 회수한 후, 1 mM PMSF(phenylmethylsulfonyl fluoride)가 포함된 50 mM sodium phosphate(pH6.0) 완충용액 10 ml에 세포 침전물을 현탁시킨 후 sonication (200 Hz, 30초간 3회 반복)로 세포를 파쇄하였다. 여기서 얻은 균체 파쇄액을 원심분리(15,000 rpm, 30분, 4°C)로 침전물을 제거 후 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

최적 반응 온도 측정

β -Galactosidase의 최적 반응 온도의 측정은 50 mM sodium phosphate(pH6.0) 완충용액을 사용하였고, ONPG를 기질로 이용하여 20-95°C까지 shaking water bath에서 10분간 반응시켜 효소활성을 측정하였다.

비변성 겔 전기영동 및 효소 활성 염색

비변성 겔 전기영동을 위한 폴리아크릴아마이드 겔은 10% separating gel, 5% stacking gel로 두께는 1.5 mm로 하였고, 전기영동은 4°C에서 수행하였다(24). 전기영동시 조효소액의 양은 각 기질당 35 μ l씩 취하였다. 효소 활성 염색의 기질로는 6-bromo-2-naphtyl- β -D-galactopyranoside(BNG) (25)와 *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG)를 사용하였다. BNG는 0.1% 농도로 10% methanol, 50 mM sodium phosphate(pH 6.0)로 녹였으며, ONPG는 10 mM로 50 mM sodium phosphate(pH6.0) 완충용액에 포함시켰다. 전기영동이 끝난 겔을 pH6.0의 50 mM sodium phosphate 완충용액으로 세척해 준 후, BNG 또는 ONPG 기질용액에서 75°C에서 30분 반응시켰다. BNG의 경우 1 mg/ml의 diazo blue B 용액으로 발색 시킨 후 7.5% acetic acid로 고정 및 세척해 주었다. ONPG를 사용한 경우는 0.5M Na_2CO_3 로 반응을 중지시켰다.

Coomassie blue 염색은 전기영동한 겔을 0.1% coomassie brilliant blue R-250, 10% acetic acid, 10% methanol 용액으로 염색하고 10% acetic acid, 10% methanol 용액을 사용하여 탈색시켰다.

분자량 측정

β -Galactosidase의 분자량은 비변성 겔 전기영동을 통하여 측정하였다(24). 비변성 겔 전기영동시 분자량 표준 단백질은 bovine serum albumin($M_r=68,000\text{Da}$)과 β -amylase ($M_r=200,000\text{Da}$)로, 전기영동시 10% 폴리아크릴아마이드 겔을 이용하였다.

결과 및 고찰

β -Galactosidase 생산균주 선별

기본배지에서 하룻밤 생육한 *Thermus*속의 *T. caldophilus* GK24, *T. aquaticus* YT-1, *T. filiformis*, *T. flavus* AT-62, *Thermus* strain T2, *Thermus* strain T351, *Thermus* strain X-1, *T. thermophilus* HB8, *T. thermophilus* HB27 등을 β -galactosidase 생산균주 선별용 배지에 각각 1%씩 접종시킨 후, 72에서 20시간 이상 배양하면서 β -galactosidase 활성을 측정하여 생산균주를 선별하였다. Lactose 첨가에 의해 β -galactosidase 활성이 특별히 유도되는 균주로는 *T. caldophilus* GK24와 *Thermus* strain T2 뿐이었다. 이 중에서 *Thermus* strain T2는 이미 Ulrich 등(11)에 의해 내열성 β -galactosidase의 생산이 보고되었기 때문에 연구대상에서 제외하고, 최종적으로 *T. caldophilus* GK24를 선별하였다.

최적 반응온도

Tca β -galactosidase의 조효소액을 50 mM sodium phosphate 완충용액(pH 6.0)내에서 최적반응 온도를 조사한 결과 75°C에서 최대 활성을 보였으며(Fig. 1), 이는 *Thermus* strain T2의 최대 활성 온도인 80°C와 유사한 결과이다(11). 따라서 본 효소는 고온에서 작용하는 내열성 β -galactosidase라고 추정할 수 있다.

효소생산을 위한 표준배지의 선정

Tca β -galactosidase 최적 생산을 위해 먼저 질소원인 bactotryptone과 yeast extract의 최적농도부터 결정하

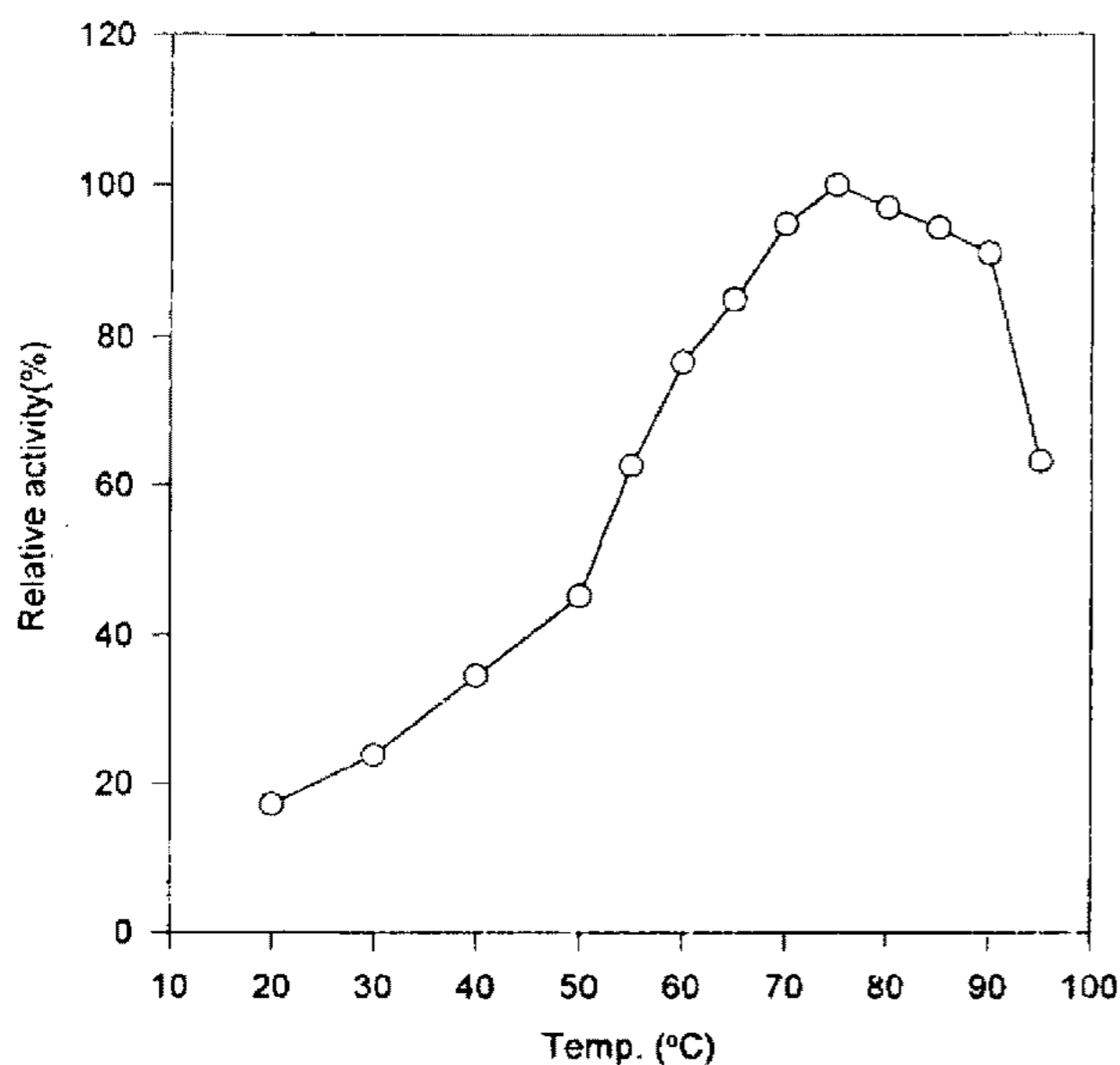


Fig. 1. Effect of temperature on the activity of *Tca* β -galactosidase.

The enzyme activity was assayed at the indicated temperature.

기로 하였다. 1% lactose가 들어있는 basal salts(pH 7.8)에 bactotryptone과 yeast extract의 농도를 동일 비율로 0-0.7% 농도까지 각각 다르게 첨가하여 배양하면서 균체량과 효소활성을 조사하였다.

Bactotryptone과 yeast extract가 0.3% 첨가시 가장 적절한 세포 성장과 더불어 높은 효소 활성을 나타내었으며, 0.3% 이상의 농도에서는 높은 세포 성장에 비해 효소 활성이 약간 저조하였다. 따라서 다양한 기질에 의한 β -galactosidase 유도효과를 검토하기 위해 0.3% bactotryptone, 0.3% yeast extract, basal salts, 10 mM Tris/HCl(pH 7.8)를 표준배지로 선정하였다.

Lactose에 의한 *Tca* galactosidase의 유도효과

Lactose 농도에 따른 *Tca* β -galactosidase 유도효과를 관찰하기 위해 다양한 농도로 lactose가 첨가된 표준배지에 균체를 접종시킨 후, 배양시간에 따라 효소 활성을 조사하였다(Fig. 2). 표준배지에 1.0% lactose를 첨가하였을 때 표준배지보다 약 3.0배 증가된 β -galactosidase 활성을 나타내었다. 또 1.5% lactose 첨가시에는 약 800 U/ml로 표준배지보다 약 4.0배 증가하였다. 표준배지에서도 β -galactosidase 활성이 약 200 U/ml로 나타났다. 이것은 배지중에 첨가된 yeast extract내에 함유된 소량의 galactose 등에 의한 것으로 생각할 수 있다. Lactose 농도를 2.0% 이상 3.5%까지 첨가시킨 배지에서 β -galactosidase 활성은 증가된 lactose농도와는 무관하게

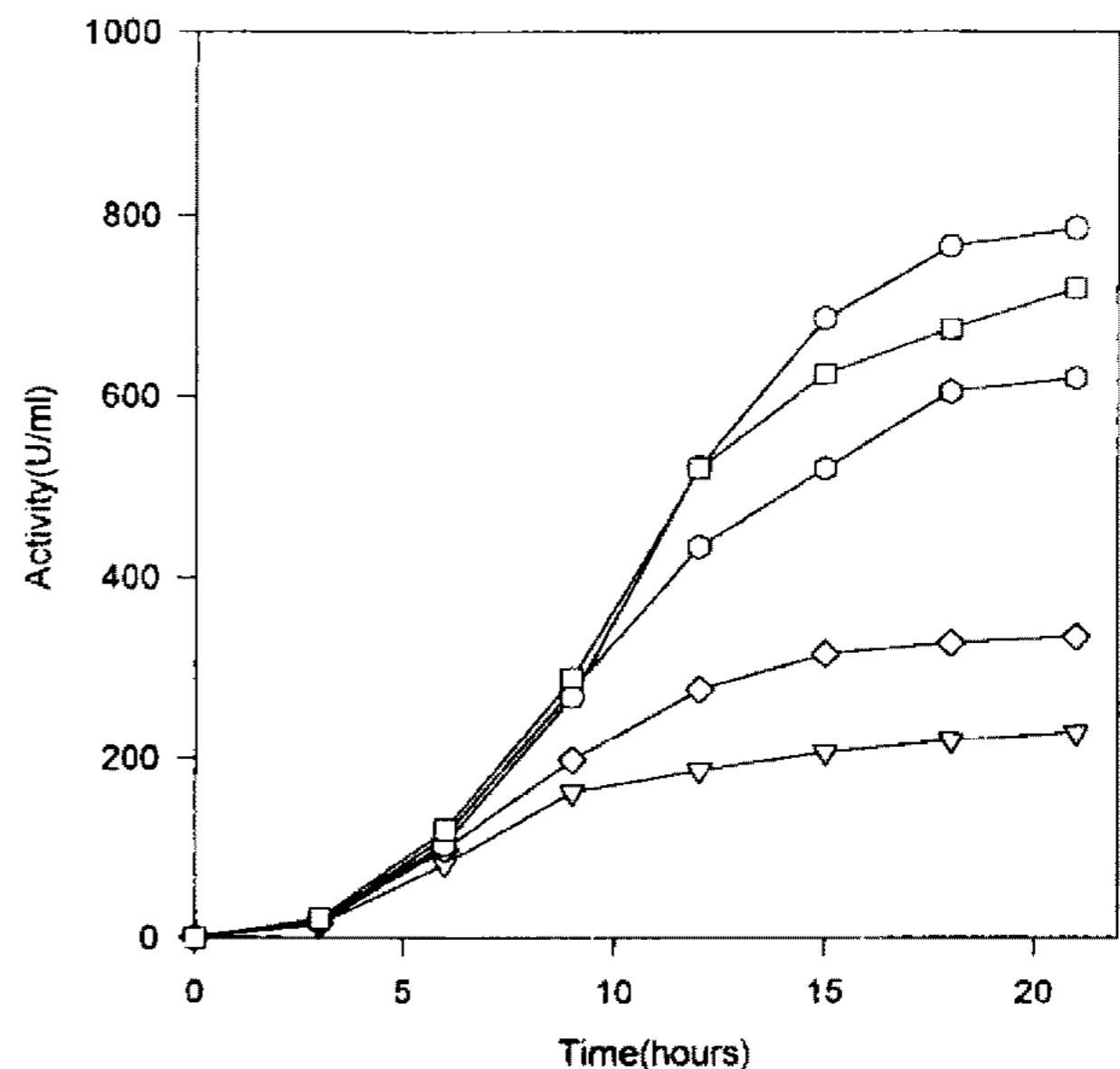


Fig. 2. Effect of lactose on the induction of *Tca* β -galactosidase.

The organism was inoculated into standard medium containing lactose of various concentration. Enzyme assay conditions: ONPG, 75°C, 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0). Symbols: ▽, Standard medium; ◇, 0.1% lactose; ○, 1.0% lactose; ○, 1.5% lactose; □, 2.0% lactose.

1.5% lactose가 첨가된 배지에서와 거의 동일한 양상을 보였다(Fig. 2). Lactose 첨가에 대한 유도효과는 *Thermus* strain T2의 β -galactosidase보다 *Tca* β -galactosidase가 훨씬 저조했다. 1% lactose가 첨가된 배지에서 생육한 *Thermus* strain T2의 β -galactosidase의 활성은 lactose 무첨가 배지에서 자란 균체에 비하여 약 10배 이상 증가하였다(11).

균체 생산량을 조사한 결과, 1.5% lactose를 첨가한 경우, 약 20시간 배양시에 O.D₆₀₀에서 5.0 정도였고, 2.0-4.0%의 lactose가 첨가된 경우, 1.5% lactose 첨가시와 거의 비슷한 균체량을 생산하였으며, 5% 이상 첨가시에는 효소활성 및 균체 생산량이 오히려 약간 떨어졌다 (data 생략).

Galactose에 의한 *Tca* β -galactosidase의 유도효과

Galactose 농도에 따른 β -galactosidase 유도 효과를 관찰하기 위해 다양한 농도로 galactose가 첨가된 표준배지에 균체를 접종한 후, 배양시간에 따른 활성을 조사하였다(Fig. 3). 그 결과 1.0% galactose 첨가시 표준배지에서 보다 약 6배 증가된 β -galactosidase 활성을 나타내었다. 효소활성은 배양 18시간까지 증가하였고 그 이후에는 완만하게 증가하였다. 균체 생산량을 조사한 결과, 1.0% galactose 농도에서 균체가 효과적으로 성장하며 약 18시간 배양시 O.D₆₀₀에서 5.0 정도였다. 1.5% galactose 첨가시에 1.0% galactose로 유도했을 때와 유사한

활성을 보였으며 균체 생산량도 거의 같았다. 2%의 galactose를 첨가 시켰을 때에는 균체생육이 매우 지연되었으며, 2.5% 이상에서는 균체 성장이 정지되었다. 균체 생육과 더불어 유기산 생성에 의해 배지의 pH 값이 낮아졌기 때문이라 생각되며, 20시간배양후 pH를 측정 한 결과, 2% galactose 첨가시 pH6.5정도 였으며, 2.5% galactose 첨가시 pH4.5 정도였다. 이러한 pH의 변동을 보완하기 위하여 완충액의 농도를 50 mM Tris/HCl (pH 7.8)로 높여서 배지에 첨가하여 최적생육에 필요한 pH값을 유지시켜 주었을 때 정상적으로 생육하였다.

Cellobiose에 의한 *Tca* β -galactosidase의 유도 효과

표준배지에 cellobiose 첨가에 의한 β -galactosidase 유도는 lactose 및 galactose 첨가시보다 상당히 효과적이었다. 표준배지에 다양한 농도의 cellobiose를 각각 첨가하여 균체를 배양하면서 효소활성을 조사한 것이 Fig. 4이다. 0.2% 농도의 cellobiose 첨가시 표준배지에서 보다 약 16.5배 증가된 β -galactosidase 활성을 나타내었다. 또 0.3% 및 0.5% 농도의 cellobiose 첨가시에도 0.2% 첨가시와 거의 유사한 효소활성을 보였으나, 오히려 상대적인 효소 생산량(효소활성/균체 성장)은 낮았다. 특히 효소 유도 효과는 lactose, galactose와는 달리 8-10시간 사이에 최고값에 도달하였다. *Thermus* strain T2의 경우 β -galactosidase의 유도 효과는 galactose 배지에서 최대였으나(11), *T. caldophilus* GK24의 경우 cellobiose

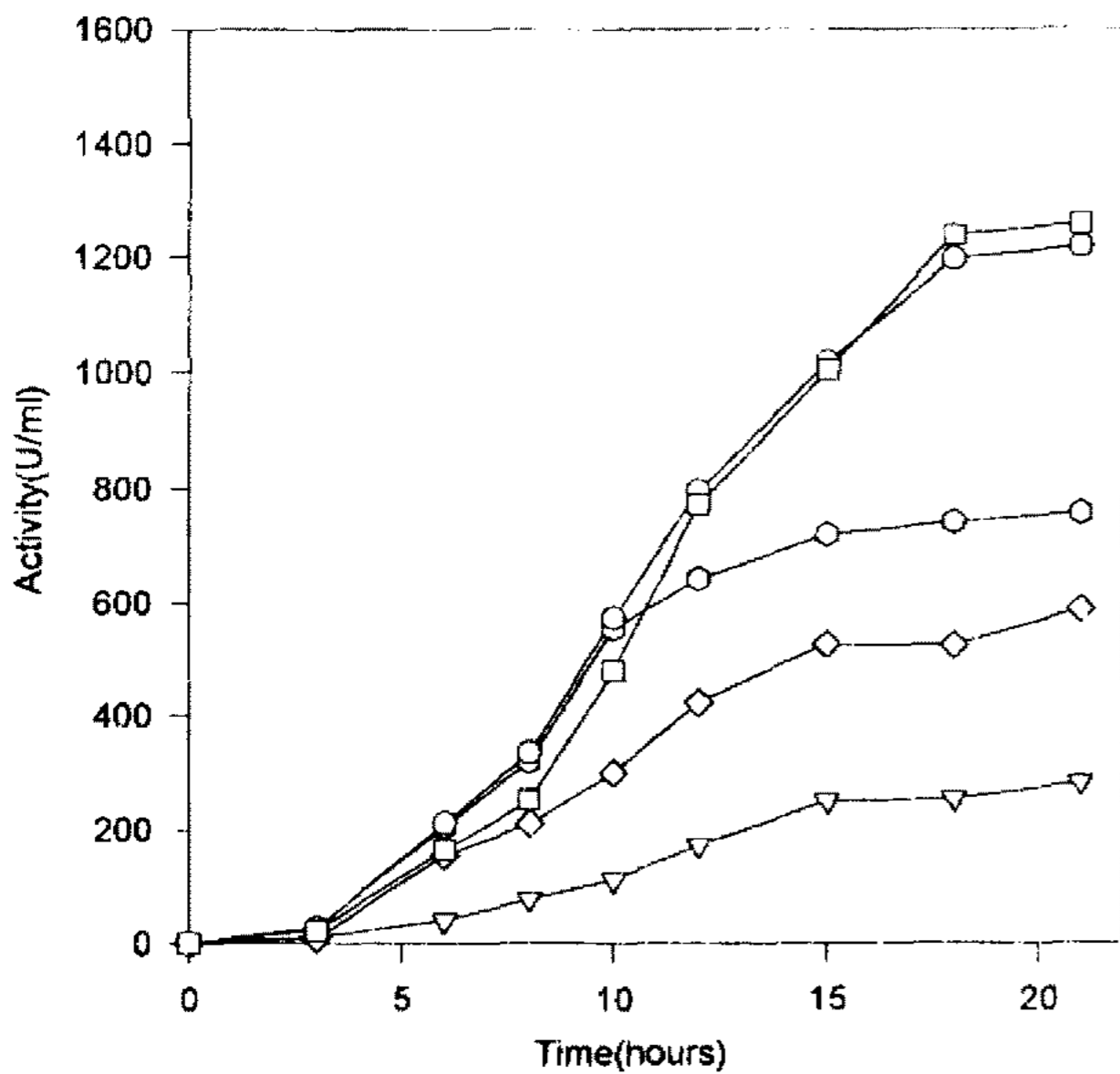


Fig. 3. Effect of galactose on the induction of *Tca* β -galactosidase.

The organism was inoculated into standard medium containing galactose of various concentration. Enzyme assay conditions: ONPG, 75°C, 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0). Symbols: ▽, Standard medium; ◇, 0.1% galactose; ○, 0.5% galactose; ○, 1.0% galactose; □, 1.5% galactose.

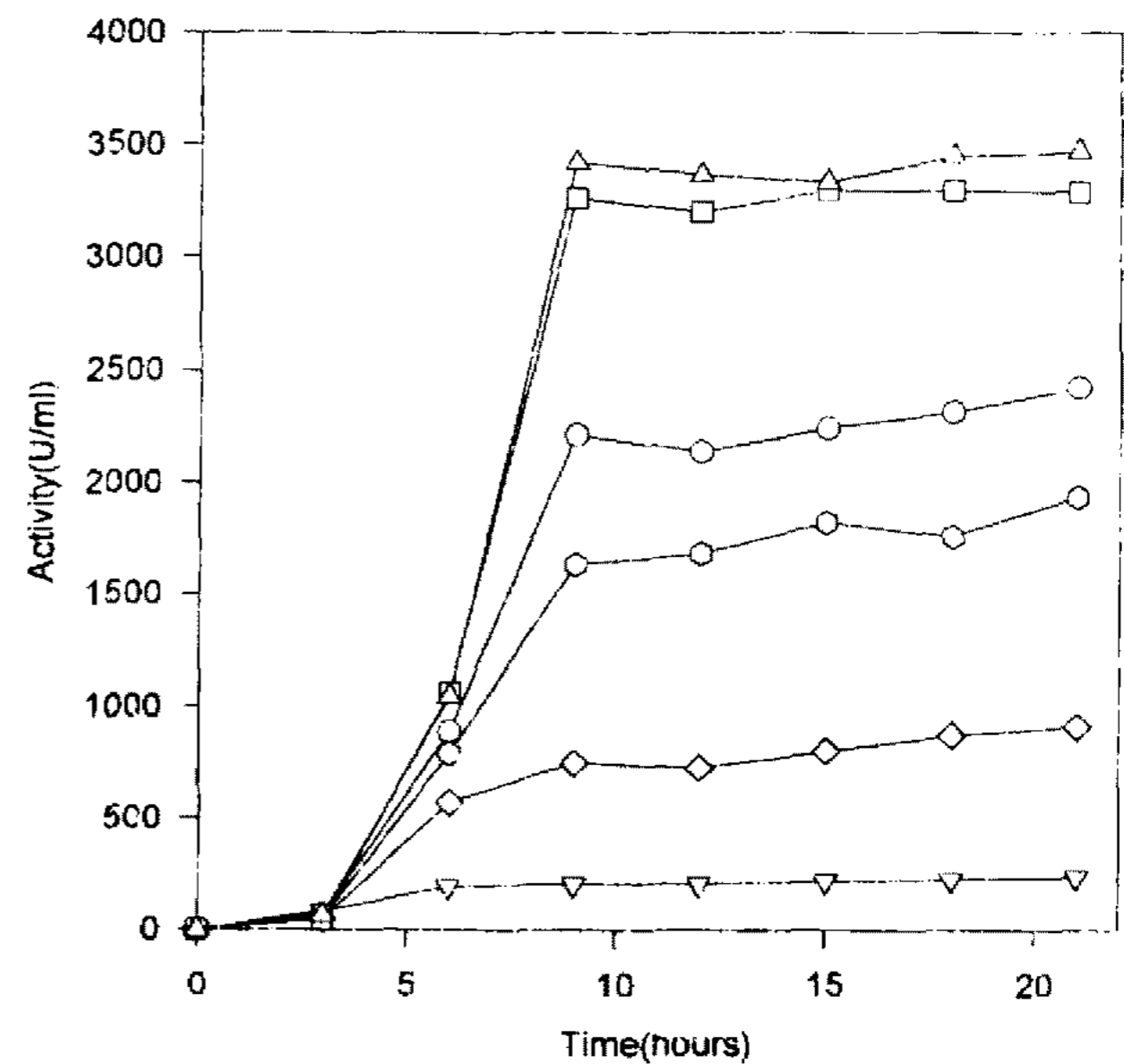


Fig. 4. Effect of cellobiose on the induction of *Tca* β -galactosidase.

The organism was inoculated into standard medium containing cellobiose of various concentration. Enzyme assay conditions: ONPG, 75°C, 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0). Symbols: ▽, Standard medium; ◇, 0.01% cellobiose; ○, 0.05% cellobiose; ○, 0.1% cellobiose; □, 0.2% cellobiose; △, 0.3% cellobiose.

배지에서 최적 유도 조건을 보인다는 차이점이 있었다.

기타 glycerol, succinic acid, glucose의 첨가효과

Glycerol과 succinic acid는 균체내에 cAMP를 증가시켜 RNA polymerase의 promoter에 결합력을 증가시키는 효과를 보이는 것으로 알려져 있다. *E. coli*에서 glycerol 또는 succinic acid의 첨가는 β -galactosidase의 유도를 3배 이상 증가시키는 것으로 알려져 있다 (25).

Tca β -galactosidase 유도에 대한 glycerol과 succinic acid의 영향을 관찰하기 위해 표준배지에 각각 0.2% 첨가하여 조사하였다. *T. caldophilus* GK24의 경우, *E. coli*와는 다르게 glycerol 또는 succinic acid의 첨가가 오히려 β -galactosidase 유도를 저해하는 것으로 나타났다. *E. coli*에서 glucose의 첨가는 β -galactosidase의 유도를 억제하는 것으로 알려져 있다. *Tca* β -galactosidase 유도에 대한 glucose의 영향을 조사하기 위해 각각 0.1-0.5%로 첨가하여 수행하였다. *T. caldophilus* GK24에 있어서도 glucose 첨가시 균체량은 증가하지만 β -galactosidase 유도효과는 나타나지 않았다.

최적 유도배지 선정

Tca β -galactosidase의 기질에 대한 최적 유도조건을 조사하기 위하여 표준배지에 lactose, galactose, cellobiose를 각각 농도별로 첨가하여 균체 생육과 효소활성을 측정된 실험결과를 종합해 볼때, 1.5% lactose를 첨가한 경우 800 U/ml로서 표준배지 보다 4배, 1.0% galactose를 첨가한 경우 1200 U/ml로 표준배지보다 6배,

0.2% cellobiose를 첨가한 경우 3300 U/ml로 표준배지보다 약 16.5배 이상의 효소활성을 보였다. 0.2% cellobiose 첨가시 균체 생육도 9시간 배양시 O.D₆₀₀ 값이 6.0 정도로 우수하였으며, 1.5% lactose 및 1.0% galactose에 비해 각각의 cell 농도당 효소활성 또한 탁월하였다(Fig. 5). 이상으로 균체 생육과 효소 유도 효과에 대한 실험 결과를 종합하여 β -galactosidase 유도용 최적배지 조성으로 0.3% bactotryptone과 0.3% yeast extract, 0.2% cellobiose, 1X castenholtz salts용액, 10 mM Tris/HCl 완충용액(pH7.8)으로 결정하였다. 배양 조건은 표준배지에서 하룻밤 생육시킨 균체 1%를 유도용 최적배지에 접종하여 72, 180 rpm으로 8-10시간 진탕배양하는 것이 효소생산에 적절하다고 판단하였다.

비변성 겔 전기영동을 통한 β -galactosidase 확인

조효소액을 비변성 겔 전기영동을 통하여 분자량 및 β -galactosidase 생성량을 측정하고, 각각의 유도기질로부터 생성되는 β -galactosidase가 동일 효소인 것을 확인한 것이 Fig. 6이다. Fig. 6에서 보면 기질 lactose, galactose, cellobiose로부터 생성되는 β -galactosidase가 동일한 효소이며, 비변성 겔 전기영동하여 BNG 활성 염색에 의해 측정된 분자량은 약 74 KDa으로, *Thermus* strain T2 β -galactosidase의 분자량 570 KDa(11) 보다

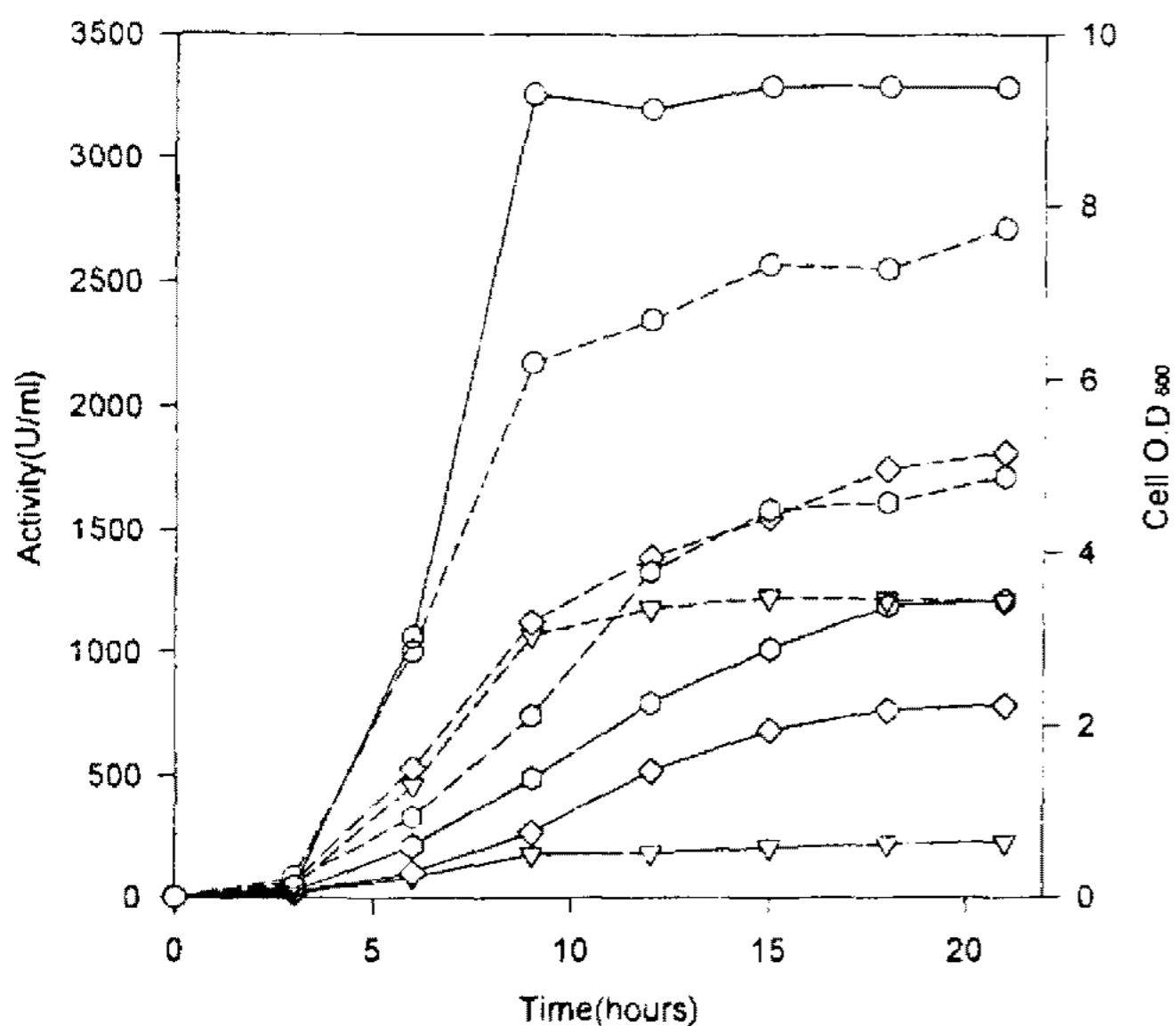


Fig. 5. Cell growth and the induction of *Tca* β -galactosidase. The organism was inoculated into optimal media of each substrates. Enzyme assay conditions: ONPG, 75°C, 50 mM sodium phosphate buffer(pH 6.0). Symbols: ∇ , Standard medium; \diamond , 1.5% lactose; \circ , 1.0% galactose; \circ , 0.2% cellobiose; —, enzyme activity; - - -, cell density.

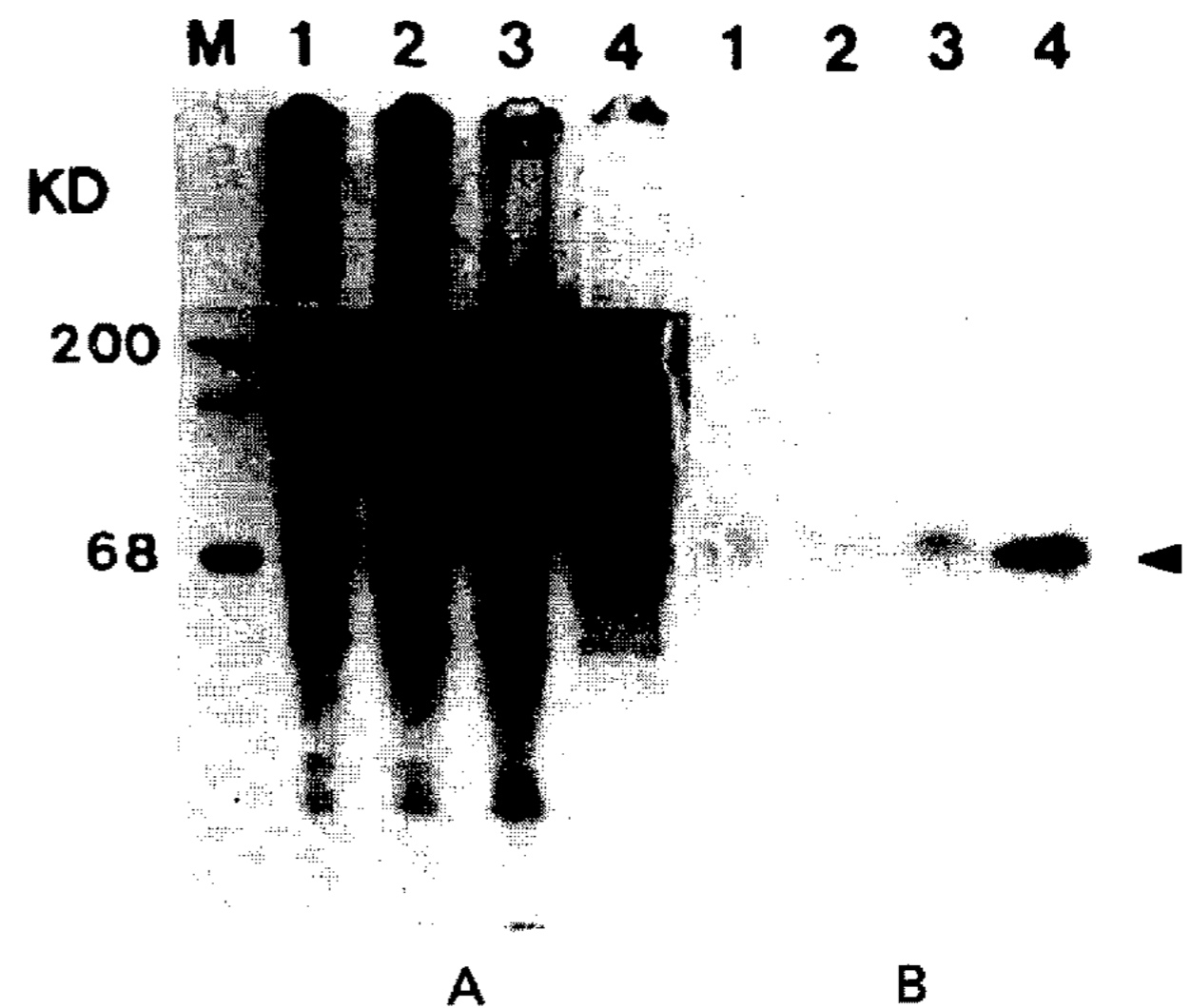


Fig. 6. Polyacrylamide gel electrophoresis and native staining of crude extract of *T. caldophilus* GK24.

The samples of crude extract were subjected to electrophoresis under non-denaturing conditions. Gel A was stained with Coomassie brilliant blue G250 and gel B with BNG for β -galactosidase activity. The closed black arrow indicates β -galactosidase. M indicates native marker composed of β -amylase (200,000 dalton) and bovine serum albumin (68,000 dalton). Lane 1, crude extract from standard medium(control); Lane 2, from standard medium containing 1.5% lactose; Lane 3, from standard medium containing 1.0% galactose; Lane 4, from standard medium containing 0.2% cellobiose.

훨씬 작은 것으로 나타났다. 또, 4량체인 *E. coli* β -galactosidase의 분자량 500 KDa(26), *Sulfolobus solfataricus* β -galactosidase의 분자량 240 KDa(27), *Clostridium thermosulfurogams* EM1 β -galactosidase의 분자량 170 KDa(12)보다 상당히 작다. 특히, cellobiose가 첨가된 배지에서 생육된 균체의 추출물에서는, lactose나 galactose 첨가배지에서 생육시킨 것보다 상당히 강한 활성 띠를 보였다(Fig. 6, lane 4). 이 결과들로부터 *Tca* β -galactosidase는 단량체인 것으로 추정되었다.

요 약

고온균(*Thermus*속)을 대상으로 β -galactosidase를 탐색한 결과 내열성 β -galactosidase를 생산하는 균주로서 *T. caldophilus* GK24를 선별하였다. *T. caldophilus* GK24 (*Tca*) β -galactosidase는 유도효소였으며, 조효소액은 75°C에서 최적활성을 나타내었다. 표준배지에 lactose, galactose, cellobiose를 첨가함으로써 β -galactosidase 활성을 유도할 수 있으며, glucose 첨가시에는 효소활성이 억제되었다. 농도를 다양하게 하여 위의 기질들을 첨가함으로써 최적생산을 조사한 결과 cellobiose가 가장 효과적으로 나타났다. *Tca* β -galactosidase 최적유도 배지 조성은 0.3% bactotryptone과 0.3% yeast extract, 0.2% cellobiose, basal salts, 10 mM Tris/HCl 완충용액 (pH 7.8)이었다. 결정된 최적유도 배지에서 효소활성은 표준배지에서보다 약 16.5배 증가하였다. 균체 추출물들을 비변성 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동을 한 후, BNG로 활성염색을 하여 *Tca* β -galactosidase를 검출하였다.

감사의 말

이 논문은 1996년도 (주)미원의 연구비 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다. 본 논문 실험에 많은 도움을 준 성균관대학교 유전공학과 이경태군에게 사의를 표합니다.

참고문헌

1. Wallenfels, K. and R. Weil. 1972. β -Galactosidase, Pp 617-663. in P. D. Boyer(ed.), *The enzymes*, vol. 7, Academic Press, New York.
2. Prenosil, J. E., E. Stuker and J. R. Bourne. 1987. Formation of oligosaccharides during enzymatic lactose. *Biotechnol Bioeng* **30**: 1019-1025.
3. Gekas, V. and M. Lopez-Leiva. 1985. Hydrolysis of lactose. literature review. *Process Biochem* **2**: 2-12.
4. Greenberg, N. A. and R. R. Mahoney. 1981. Immobilization of lactase(β -galactosidase) for use in dairy proces-

- sing. a review. *Process Biochem* **2**: 2-8.
5. Tanaka, R., H. Takayama., M. Morotomi., T. Kuroshima., S. Ueyama., K. Matsumoto., A. Kuroda and M. Mutai. 1983. Effects of administration of TOS and *Bifidobacterium breve* 4006 on the human fecal flora. *Bifidobact Microflora* **2**: 17-24.
6. Matsumoto, K. and A. Kuroda. 1988. Galactooligosaccharides, Pp 232. in The amylase research society of Japan (ed.), *Handbook of amylase and related enzymes*. Pergamon Press, Oxford.
7. Thomas, K. N. and R. K. William. 1986. Industrial applications of Thermostable enzymes. Pp. 197-215, in T. D. Brock(ed.) *Thermophiles*, John Wiley & Sons, Inc., New York.
8. Cowan, D., R. Daniel and H. Morgan. 1985. Thermophilic protease: properties and potential applications. *Trends Biotechnol.* **3**: 68-72.
9. Zamost, B. L., H. K. Nielsn, and R. L. Starnes. 1991. Thermostable enzymes for industrial applications. *J. Industrial Microbiol.* **8**: 71-82.
10. Hirata, H., S. Negoro, and H. Okada. 1984. Molecular basis of isozyme formation of β -galactosidase in *Bacillus stearothermophilus*. isolation of two β -galactosidase genes, bgaA and bgaB. *J. Bacteriol.* **160**: 9-14.
11. Ulich, J. T., G. A. McFeters and Temple, K. L. 1977. Induction and Characterization of β -galactosidase in an extreme thermophile. *J. Bacteriol.* **110**: 691-698.
12. Burchhardt, G. and H. Bahl. 1991. Cloning and analysis of the β -galactosidase-encoding gene from *Clostridium thermosulfurogenes* EM1. *Gene* **106**: 13-19.
13. Nakao, M., M. Harada., Y. Kodama., T. Nakayama., Y. Shibano, and T. Amachi. 1994. Purification and characterization of a thermostable β -galactosidase with high transgalactosylation activity from *Saccharopolyspora recitvirgula*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**: 657-663.
14. Pisani, F. M., R. Rella, C. Raia, C. Rozzo, R. Nucci, A. Cambacorta, M. De Rosa and M. Rossi. 1990. Thermostable β -galactosidase from the archebacterium *Sulfolobus solfataricus*. *Eur. J. Biochem.* **187**: 321-328.
15. Taguchi, H., M. Yanashita, H. Matsuzawa and T. Ohta. 1982. Heat stable and fructose 1,6-bisphosphate activated L-lactate dehydrogenase from an extremely thermophilic bacterium. *J. Biochem. (Tokyo)* **91**: 1343-1348.
16. Brock, T. D. 1969. *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n. a non-sporulating extreme thermophile. *J. Bacteriol.* **98**: 289-297.
17. Hudson, J. A., H. W. Morgan and R. M. Daniel. 1987. *Thermus filiformis* sp. nov., a filamentous caldoactive bacterium. *Int. Syst. Bacteriol.* **37**: 431-436.
18. Saiki, T., R. Kimura and K. Arima. 1972. Isolation and characterization of extremely thermophilic bacteria from hot springs. *Agric. Biol. Chem.* **36**: 2357-2366.
19. Cowan, D., R. Daniel and H. Morgan. 1982. Purification and some properties of an extracellular protease (caldolyisin) from an extreme thermophile. *Biochim. Biophys.*

- Acta* **705**: 293-305.
20. Higa, E. H. and R. F. Ramaley. 1973. Purification and properties of Threonine deaminases from the X-1 isolate of the genus *Thermus*. *J. Bacteriol.* **173**: 3084-3095.
21. Oshima, T. and K. Imahori. 1974. Description of *Thermus thermophilus* (Yoshida and Oshima) comb. nov., a nonsporulating thermophilic bacterium from a Japanese thermal spa. *Int. Syst. Bacteriol.* **24**: 102-112.
22. Koyama, Y., S. Okamoto and K. Furukawa. 1990. Cloning of α - and β -galactosidase genes from an extreme thermophile, *Thermus* strain T2, and Their expression in *Thermus thermophilus* HB27. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 2251-2254.
23. Miller, J. H. 1972. in *Experiments in Molecular Genetics* Pp. 352-355, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
24. Davis, B. J. 1964. Disk electrophoresis II-method and application to human serum proteins. *Ann. NY. Acad. Sci.* **121**: 404-427.
25. Erickson, R. P. and Jr. E. Steers. 1970. Comparative study of isoenzyme of Bacterial β -galactosidase. *J. Bacteriol.* **102**: 79-84.
26. Fowler, A. V. 1972. High-level production of β -galactosidase by *Escherichia coli* merodiploids. *J. Bacteriol.* **112**: 856-860.

(Received 4 March 1997)