

된장에서 분리된 *Bacillus licheniformis*의 β -galactosidase 생산성과 효소특성

진현경, 윤기홍*
우송대학교 바이오식품과학전공

Received: October 15, 2014 / Revised: November 25, 2014 / Accepted: November 25, 2014

Production and Characterization of β -galactosidase from *Bacillus licheniformis* Isolated from Doenjang

Hyun Kyung Jin and Ki-Hong Yoon*

Food Science & Biotechnology Major, Woosong University, Daejeon 300-718, Republic of Korea

A bacterial strain was isolated from homemade *doenjang* (Korean fermented soybean paste) as a producer of the extracellular β -galactosidase, capable of hydrolyzing lactose to liberate galactose and glucose residues. The isolate YB-1414 has been identified as *Bacillus licheniformis* on the basis of its 16S rDNA sequence, morphology and biochemical properties. The production of β -galactosidase by *B. licheniformis* YB-1414 reached maximum levels of 6.2 U/ml in culture medium containing wheat bran (1%) and yeast extract (2.5%) as carbon and nitrogen sources, respectively. Particularly, the insoluble fraction was more effective for β -galactosidase production than the soluble extract of wheat bran. The enzyme exhibited maximum activity for hydrolysis of *para*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (pNP- β Gal) under reaction conditions of pH 6.0 and 55-60°C. Its hydrolyzing activity for pNP- β Gal was drastically decreased by the addition of low concentrations of galactose, but only slightly decreased by glucose, with 85% of maximal activity in the presence of 400 mM glucose.

Keywords: *Bacillus licheniformis*, β -galactosidase, productivity, property

서론

β -galactosidase는 미생물을 비롯하여 동식물에 두루 존재하며 lactose를 glucose와 galactose로 분해하는 효소이고 식품산업에 활용성이 높다. 우유, 유제품과 유장으로부터 lactose를 제거하거나 [2] 장내 유용미생물의 성장을 증진시키는 갈락토올리고당 [26]을 비롯한 lactulose [6], lactosucrose [16]의 생산에 사용되며 또한 대장균 유래의 β -galactosidase가 작용하지 못하는 재조합 숙주균에서 표지 효소로 이용되고 있다 [27].

효소의 생산 균주에 따라서 β -galactosidase의 lactose 가수분해능과 당 전이효율을 비롯하여 반응특성이 다르므로 산업적 활용에 적합한 효소 특성과 생산성을 확보하기 위해 내열성이나 저온성 균주를 비롯한 여러 균주로부터 β -

galactosidase가 연구되었다 [22]. *Bacillus stearothermophilus* [8], *B. circulans* [26]와 *B. coagulans* [1]는 3종 이상의 β -galactosidase isozymes를 생산하는데, 온천에서 분리된 *B. coagulans* RCS3의 isozyme III은 다른 isozymes와는 달리 균체외로 분비되며 lactose 분해능이 우수한 것으로 확인되었다. 또한 *B. circulans*의 효소는 isozymes간에 면역학적으로 동일하나 lactose 분해능과 당 전이에 의한 갈락토올리고당 생산능에는 차이가 큰 것으로 보고되었다. 한편 *B. licheniformis*의 β -galactosidase는 당 전이효율은 낮으나 lactose 분해에 적합한 효소를 생산하는 것으로 알려졌다 [12].

*Bacillus*속 균주 중 *B. megaterium* [23], *B. licheniformis* [12], *B. stearothermophilus* [5, 8]와 *B. coagulans* [1]로부터 β -galactosidase 효소와 유전자의 특성이 보고되었으며, 북극에서 분리된 *Alkalilactibacillus ikkense*로부터 저온에서 활성이 높은 β -galactosidase의 유전자도 클로닝되었다 [22]. β -galactosidase의 활용성을 증대시키기 위해서 단백질의 구조를 기반으로 하여 lactose 가수분해능이 향상된 변이체가 개발되었으며 [5], 담체에 고정화된 *B. stearothermophilus*와 *B. circulans* 유래의 효소가 당 전이반응과 lactose 분해반응

*Corresponding author

Tel: +82-42-630-9742, Fax: +82-42-636-2676
E-mail: ykh@wsu.ac.kr

© 2014, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

에 사용되었다[3, 7]. β -galactosidase의 생산성을 증가시키기 위해서는 *B. stearothermophilus*의 효소 유전자를 *B. subtilis* [9] 또는 *B. amyloliquefaciens* [10]에서 발현시켰다. 또한 *B. subtilis* [13]와 *B. licheniformis* [18]의 β -galactosidase 생산성에 영향을 미치는 배지성분에 대한 연구도 수행되었다.

최근 들어 청국장장의 기능성에 관심이 높아지면서 생청국장이나 건조된 청국장장의 분말 또는 환의 형태로 유유와 혼합하여 건강식으로 이용되고 있다. β -galactosidase 활성이 높은 청국장은 우유와 함께 섭취할 경우 유당 불내증을 방지하는 효과가 예상되므로 β -galactosidase를 생산하는 미생물을 청국장 발효균으로 활용하기 위해 청국장으로부터 *B. licheniformis*가 분리된 바 있으며[28], 본 연구에서는 된장으로부터 β -galactosidase를 생산하는 *Bacillus*속 균주 중 효소 생산성이 우수한 미생물을 분리하여 반응특성을 조사하였다.

재료 및 방법

β -galactosidase 생산균의 탐색

Spizizen 최소배지[25]의 탄소원인 포도당과 sodium citrate 및 질소원인 ammonium sulfate 대신에 대두분 (1%) 이 첨가된 변형 배지(K_2HPO_4 , 7 g; KH_2PO_4 , 1.5 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0.04 g; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.003 g; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.0025 g; $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$, 0.002 g; water, 1 L)에 가정에서 수집된 된장을 접종하여 37°C에서 약 3일간 진탕 배양하고 동일한 배지에 3-4일 간격으로 3회 계대 배양을 실시하였다. 최종적으로 계대 배양액을 동일한 성분의 평판배지에 도말하고 37°C에서 4일간 배양한 후 형성된 콜로니 중에서 서로 다른 모양을 보이는 콜로니를 채취하였다. 이들 분리균을 LB 액체 배지에서 24시간 동안 진탕 배양한 후 배양상등액을 회수하여 1 mM *para*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (pNP- β Gal; Sigma, USA)을 포함한 20 mM sodium phosphate 완충액(pH 6.0)에 첨가하고 45°C에서 2시간 동안 방치한 후 반응액의 색깔을 관찰함으로써 β -galactosidase 활성을 갖는 균을 탐색하였다.

분리균주의 동정

그람염색과 포자염색을 통해 분리균의 형태를 조사하였으며, 균체 현탁액을 API 20E와 API 50CHB (Biomereux사, France) kits에 제조사의 지침을 따라 접종하고 37°C에서 배양하면서 1일과 2일째 각각 관찰하여 탄수화물 이용능과 생화학적 특성을 판별하였다. 분리균의 총 염색체 DNA를 주형으로 하고, 세균의 16S rRNA 유전자의 보존적 지역의 염기서열 5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3' (*E. coli* 16S rRNA 유전자 염기서열 8-27), 5'-GGTTACCTTGTACGACTT-

3' (*E. coli* 16S rRNA 유전자 염기서열 1492-1510)을 primer로 사용하여 중합효소 연쇄반응(PCR)을 실시한 후 증폭된 PCR 산물을 정제하여 분리균의 16S rDNA 염기서열을 분석하였다.

β -galactosidase 조효소액 제조

분리균 *B. licheniformis* YB-1414를 LB 배지에서 16시간 동안 배양한 배양액을 1% (v/v)가 되도록 동일 성분의 본 배양액에 접종하고 37°C에서 36시간 동안 진탕 배양하였다. 원심분리하여 얻은 배양상등액을 ammonium sulfate (25-75%)로 처리하고 침전된 단백질을 10 mM sodium phosphate 완충액(pH 6.0)에 현탁하여 동일 완충액으로 투석한 후 조효소액으로 사용하였다.

β -galactosidase 반응특성 분석

β -galactosidase 활성을 결정하기 위해서는 1 mM pNP- β Gal과 50 mM sodium phosphate 완충액(pH 6.0)을 포함한 반응액에 효소를 첨가하여 50°C에서 10분간 반응시킨 후 반응액의 2배 부피의 1 M Na_2CO_3 용액을 첨가하여 반응을 종결시키고 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. *para*-nitrophenol (pNP)을 표준물질로 하여 얻은 검량곡선을 사용하여 효소 반응에 의해 생성된 pNP의 양을 결정하였다. 효소의 활성도 1 unit는 1분 동안 1 μ mol의 pNP를 유리시키는 효소량으로 정의하였다. 효소 활성에 미치는 반응 온도와 pH의 영향을 조사하기 위하여 30-70°C와 pH 5.0-8.0의 범위에서 각각 β -galactosidase 활성을 측정하였다. β -galactosidase의 열 안정성을 조사하기 위하여 조효소액을 서로 다른 온도에서 일정시간 방치한 후 잔존활성을 측정하였다. β -galactosidase에 의한 최종 가수분해산물을 조사하기 위해 lactose (1%)와 과량의 조효소액을 포함한 반응액을 40°C에서 5시간 반응시킨 후 반응액을 열처리하여 단백질을 제거하고 상등액을 취해 chloroform, acetic acid와 증류수 (4.3 : 5 : 0.7, (v/v)) 혼합용액을 전개용액으로 하여 silica gel-precoated thin layer plate (Merck, Gemany)에서 박층 크로마토그래피를 수행하였다. 전개된 물질을 발색시키기 위해서는 9 ml ethanol, 0.5 ml *p*-anisaldehyde, 0.5 ml sulfuric acid와 glacial acetic acid 몇 방울을 혼합한 발색제 용액을 뿌린 후, 120°C에서 10분간 방치하였다. 당이 효소 활성에 미치는 영향을 분석하기 위하여 기질로 pNP- β Gal을 포함한 반응액에 종류와 농도가 다르게 당을 첨가한 상태에서 반응을 수행한 후 β -galactosidase 활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

β -galactosidase 생산균의 분리와 특성

된장으로부터 고분자 물질의 가수분해 효소를 생산하는 *B.*

subtilis, *B. licheniformis* 및 *B. amyloliquefaciens*가 분리된 바 있으며[11, 29], 여러 종류의 *Bacillus*속 및 이와 관련된 균이 발효 장류에 다수 존재하는 것으로 보고되었다[19]. 된장을 직접 복합 평판배지에 도말하여 균주를 분리할 경우 우점균이나 한정된 균종만 빠르게 성장할 수 있으므로[17] 탄소원과 질소원 대신 대두분을 첨가한 최소배지를 사용하여 계대 배양과 분리 과정을 실시하고 평판배지에서 형성된 콜로니의 모양이 서로 다른 균을 분리하였다. 가정에서 제조된 된장 60점 시료로부터 균을 분리한 결과 된장 시료당 약 1-4개의 균주가 분리되었다. 총 150개 분리균을 LB 액체배지에 배양하여 얻은 배양상등액의 β-galactosidase 활성을 조사하였으며, 그 결과 5개 분리 균주를 제외하고는 대부분이 β-galactosidase 활성이 관찰되지 않거나 미약한 것으로 나타났다. 따라서 효소 생산성이 우수한 5개 분리균의 배양상등액내 효소 활성을 비교하여 최종적으로 β-galactosidase 활성이 높은 분리균 YB-1414를 확보하였다.

분리균 YB-1414는 포자를 형성하는 그람 양성 간균이며, API 50CHB와 20E kit를 사용하여 조사한 생화학적 특성을 Biomeriux의 API web (<https://apiweb.biomerieux.com/jsp/login.jsp>)에서 다른 균주와 비교한 결과 *B. licheniformis*와 유사도가 99.9%로 가장 높게 나타났고 당 이용성도 *B. licheniformis*와 동일하였다. 분리균은 arginine dihydrolase, gelatinase와 oxidase 활성을 보였고, nitrate 환원능과 citrate 이용능이 있으며 acetoin을 생성하였다. 또한 lysine decarboxylase, ornithine decarboxylase, urease와 tryptophan deaminase의 활성은 없고, indole과 황화수소를 생성하지 못하였다. 분리균의 16S rRNA 유전자를 PCR로 증폭한 후 1,430 bp 크기의 염기서열을 결정하였으며(Genbank accession No. KM660627) 이를 미국 NCBI의 BLAST 검색방법을 사용하여 세균들의 상응하는 염기서열과 비교하였다. 그 결과, *B. licheniformis* DSM 13 (NR_118996)과 BCRC 11702 (NR_116025)의 16S rDNA 서열과 가장 상동성이 높았으며, 2개의 염기를 제외하고는 동일하였다. 이상의 형태적, 생화학적 특성 및 16S rDNA 서열의 결과로 볼 때 분리균 YB-1414는 *B. licheniformis*인 것으로 판단된다. 분리균 YB-1414의 고분자 물질의 분해능을 조사하기 위해 1% skim milk, 0.2% potato starch, 0.5% xylan과 0.5% carboxymethyl cellulose를 각각 첨가한 평판배지에서 하룻밤 배양하여 분해환을 관찰하였으며 그 결과 분리균은 xylan을 분해하지 못하였고 나머지 물질을 모두 분해하는 것으로 나타났다. 한편 청국장에서도 β-galactosidase를 생산하는 *B. licheniformis*가 분리된 바 있는데[28], 분리균 YB-1414는 청국장에서 분리된 β-galactosidase 생산균과는 달리 acetoin을 생성하고, citrate, rhamnose, sorbitol, melibiose, inuline과 β-gentiobiose를 탄소원으로 이용하는 차이점을 보였다.

***B. licheniformis* YB-1414의 β-galactosidase 생산성**

β-galactosidase는 균체내 효소로 존재하는 경우가 많으며 *B. stearothermophilus* [4, 8], *B. megaterium* ATCC 14581 [23], *B. subtilis* KL88 [20]에서 균체내 효소로 보고된 바 있다. 또한 청국장에서 분리된 *B. licheniformis* YB-1105도 배양상등액 보다 균체내에 β-galactosidase 활성이 높은 것으로 알려졌다[28]. 한편 면양유에서 분리된 *B. subtilis* [13]와 온천에서 분리된 *Bacillus* sp. [21]는 균체외로 β-galactosidase를 분비 생산하며, *B. coagulans* RCS3의 경우 5개의 β-galactosidase isozymes 중 한 개가 배양상등액에서 관찰된 바 있다[1]. 분리균 *B. licheniformis* YB-1414도 배양상등액에서 β-galactosidase가 높은 활성으로 관찰되므로 균의 성장과 효소 생산성과의 관계를 조사하기 위해 LB 액체배지에서 진탕 배양하면서 일정시간마다 배양액을 채취하여 600 nm에서 흡광도와 배양상등액에 존재하는 β-galactosidase의 활성을 측정하였다.

B. licheniformis YB-1414는 배양 시간이 12시간되었을 때 최대 성장도에 이르렀고 이때부터 β-galactosidase 생산이 시작되어 정지기를 지나 사멸기에 도달한 후까지 효소 생산성이 지속적으로 증가하였으며 30시간이 되었을 때 2.8 U/ml로 최대에 이르렀고 이후에도 배양상등액에 존재하는 효소 활성이 감소하지 않고 그대로 유지되었다(Fig. 1). 균체의 β-galactosidase를 생산하는 *Bacillus* sp.의 경우도 효소 생산성이 정지기 이후에 지속적으로 증가되는 현상을 보여 분리균과 유사하였으며, 이러한 현상은 균체내에서 합성된 효소가 균체외로 확산되는데 걸리는 시간의 차이 때문인 것으로

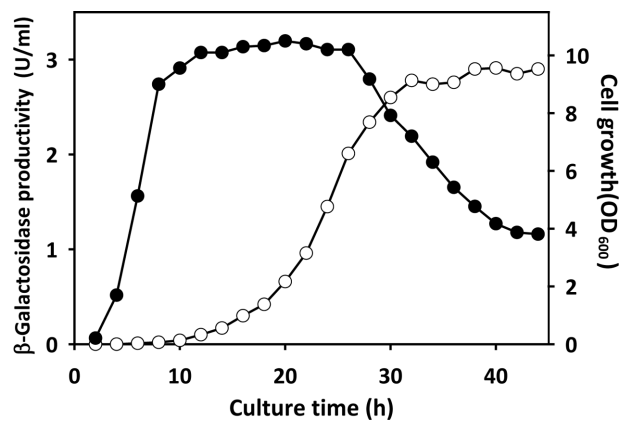


Fig. 1. Growth and β-galactosidase production of *B. licheniformis* YB-1414. *B. licheniformis* YB-1414 was grown at 37°C in LB medium. The cell growth (●) was determined by measuring absorbance of the cell culture at wavelength of 600 nm. β-galactosidase activities (○) were determined with the culture filtrate. The curve for β-galactosidase production represents the average of three independent experiments within standard errors of 1.5% between them.

추정된 바 있다[21]. 또한 *B. stearothermophilus*의 β -galactosidase 유전자를 함유한 *B. subtilis* 재조합 균주는 균체내 β -galactosidase를 생산하므로 효소 생산성이 균의 성장과 연계된 형태로 정지기에 이를 때까지 지속적으로 증가하여 최대 생산성이 약 6.3 U/ml로 나타났다[9].

β -galactosidase 생산성은 배지내 탄소원과 질소원 성분에 따라 영향을 받는다고 알려져 있으므로 potassium phosphate (0.01%)와 magnesium sulfate (0.1%)를 기본 성분으로 하고 탄소원과 질소원을 달리하여 분리균 YB-1414의 효소 생산성을 조사하였다. 질소원으로 peptone (0.5%)을 함유하는 배지에 서로 다른 탄소원을 0.5%가 되도록 각각 첨가한 상태에서 분리균을 접종하여 37°C에서 36시간 동안 진탕 배양한 후 배양상등액의 효소 활성을 측정된 결과 Table 1에 보인 바와 같이 밀기울을 비롯하여 쌀기울, locust bean gum 또는 guar gum을 첨가한 배지에서 효소 생산성이 증가되었으며 glucose와 lactose를 비롯한 단당류나 이당류가 첨가된 배지에서는 탄소원을 첨가하지 않은 배지보다 효소 생산성이

감소하였거나 큰 변화가 없는 것으로 나타났다. 이는 쉽게 대사되는 glucose와 lactose보다 귀리가루, 밀기울과 쌀기울이 함유된 배지에서 *B. subtilis*의 β -galactosidase 생산성이 증가되거나, 왕겨를 첨가한 고체배지에서 *B. licheniformis*의 β -galactosidase 생산성이 증가한 현상과 유사하지만[13, 18], *B. megaterium* [23]과 *B. stearothermophilus* [9] 및 *B. stearothermophilus*의 β -galactosidase 유전자가 함유된 재조합 *B. amyloliquefaciens* [10]에서 효소 생산이 lactose에 의해 유도된다는 결과와는 달랐다. 또한 밀기울을 첨가한 배지에서 효소 생산성이 가장 높았으므로 밀기울의 농도를 달리한 배지에서 동일조건으로 배양하였을 때 밀기울 첨가량이 1%가 될 때까지는 효소 생산성이 증가되었으나 1.5% 이상의 밀기울이 첨가되었을 때는 효소 생산성이 약간 감소하는 현상을 보였다(Table 1).

탄소원으로 밀기울 첨가량을 1%로 고정하고 유기질소원 (0.5%)의 종류를 달리한 배지에서 효소 생산성을 조사하였을 때 yeast extract 또는 tryptone이 첨가된 배지에서 효소

Table 1. Effects of additional carbon sources on the β -galactosidase production from *B. licheniformis* YB-1414

Additional carbon sources (0.5%)	β -galactosidase activity (U/ml)	Amount (%) of wheat bran	β -galactosidase activity (U/ml)
None	0.114 ± 0.004	None	0.201 ± 0.005
Glucose	0.143 ± 0.002	0.3	0.692 ± 0.002
Sucrose	0.000 ± 0.000	0.5	0.878 ± 0.008
Lactose	0.191 ± 0.003	0.7	1.152 ± 0.006
Galactose	0.114 ± 0.005	1.0	1.781 ± 0.008
Arabinose	0.000 ± 0.000	1.5	1.453 ± 0.009
Melibiose	0.000 ± 0.000	2.0	1.294 ± 0.009
Raffinose	0.000 ± 0.000	2.5	1.231 ± 0.006
Locust bean gum	0.321 ± 0.003	3.0	1.252 ± 0.005
Guar gum	0.192 ± 0.002		
Wheat bran	0.762 ± 0.008		
Rice bran	0.534 ± 0.008		

Table 2. Effects of additional nitrogen sources on the β -galactosidase production from *B. licheniformis* YB-1414

Additional nitrogen sources (0.5%)	β -galactosidase activity (U/ml)	Amount (%) of yeast extract	β -galactosidase activity (U/ml)
None	0.083 ± 0.005	0.0	0.042 ± 0.003
Corn steep powder	0.003 ± 0.002	0.5	1.485 ± 0.009
Soytone	0.851 ± 0.001	0.8	2.385 ± 0.010
Yeast extract	1.312 ± 0.004	1.0	3.092 ± 0.010
Tryptone	1.153 ± 0.009	1.5	4.793 ± 0.017
Peptone	0.884 ± 0.009	2.0	6.152 ± 0.001
Casein hydrolyzate	0.742 ± 0.005	2.5	6.205 ± 0.014
		3.0	5.523 ± 0.011

Table 3. β-galactosidase production from *B. licheniformis* YB-1414 according to soluble and insoluble fraction of wheat bran

Additional sources for		β-galactosidase activity (U/ml)
Carbon (1%)	Nitrogen (2.5%)	
Total wheat bran	None	0.075 ± 0.006
None	Yeast extract	1.384 ± 0.011
Total wheat bran	Yeast extract	6.223 ± 0.018
Soluble extract of wheat bran	Yeast extract	3.205 ± 0.012
Insoluble fraction of wheat bran	Yeast extract	5.447 ± 0.019

생산성이 높았으며, soytone, peptone 또는 casein 가수분해 물이 첨가된 배지에서는 서로 유사한 수준의 효소 생산성을 보였고 특이하게도 corn steep powder가 함유된 배지에서는 효소가 거의 생산되지 않았다(Table 2). 효소 생산성을 가장 크게 증가시킨 yeast extract의 첨가량을 달리하였을 때 yeast extract의 첨가량이 많아질수록 β-galactosidase 생산성이 증가하여 2.5%에서 최대 생산성을 보이고 3.0%에서는 약간 감소하였다. *B. subtilis*도 분리균 YB-1414와 유사하게 yeast extract를 질소원으로 사용하였을 때 효소 생산성이 가장 높았으나, 분리균과는 달리 peptone이 tryptone 보다는 효소 생산능을 더 증가시키는 것으로 보고되었다[13].

한편 밀기울의 불용성 물질과 수용성 물질 중 어느 것이 효소 생산성을 증가시키는지 확인하기 위해서 밀기울 1%를 증류수에 현탁하고 원심분리 후 불용성의 침전물과 수용성의 상등액 부분으로 나누고 yeast extract (2.5%)와 기본 성분을 각각 첨가하여 제조된 배지에서 효소 생산성을 비교하였다. Table 3에 보인 바와 같이 밀기울의 불용성 물질이 첨가된 배지에서 효소 생산성은 밀기울이 그대로 첨가되었을 때보다 약간 낮은 것으로 나타났지만 수용성 물질이 첨가된 배지에서 보다 더 높았다. 또한 밀기울의 수용성 물질이 함유된 배지에서의 효소 생산성은 밀기울이 첨가되지 않고 yeast extract만 첨가된 배지에서 보다 2배 이상 높은 것으로 나타났다. 이로 보아 β-galactosidase의 생산성을 증가시키는 물질이 밀기울의 불용성 물질과 수용성 물질에 모두 있으며 불용성 물질에 좀 더 많이 존재하는 것으로 판단된다. 한편 yeast extract를 첨가하지 않고 밀기울만을 첨가한 배지에서는 효소 생산성이 매우 낮았는데 이는 질소원이 거의 없어 균의 성장이 낮아진 때문으로 여겨진다.

***B. licheniformis*의 β-galactosidase의 반응특성**

배양상등액을 ammonium sulfate (25-75%)로 처리하여 제조된 조효소액을 사용하여 반응 조건에 따른 β-galactosidase 활성을 측정하였다. 그 결과 pH 6.0과 55-60°C에서 최대활성을 나타냈으며, pH 5.5-6.5 범위에서는 최대활성의 90% 이상의 활성을 보였다(Fig. 2). 분리균 효소의 최적 반응온도는 50°C에서 최대 효소활성을 보이는 *B. licheniformis*

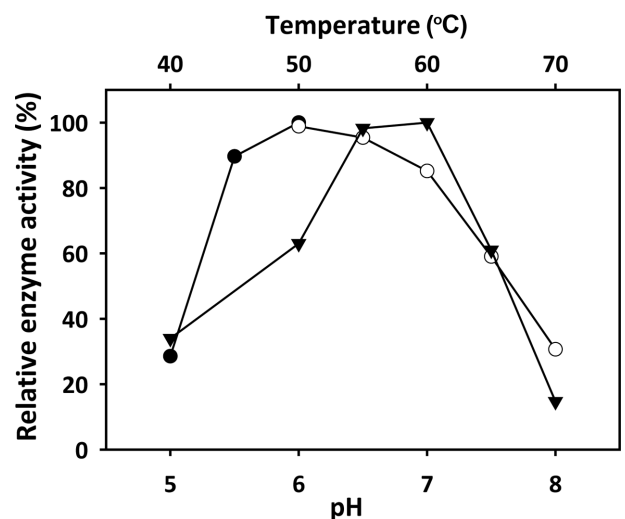


Fig. 2. Effects of reaction temperature and pH on the β-galactosidase activity. Temperature profile (triangles) was obtained by measuring the β-galactosidase activities at different temperatures and pH 6.0. The reactions were done at 50°C and various pHs for determining the pH profile (circles). Buffers used were as follows: sodium citrate (-●-), sodium phosphate (-○-). Each curve represents the average of three independent experiments within standard errors of 2% between them.

DSM 13 [12]과 *B. licheniformis* YB-1105 [28]의 효소에 비해 높았으며, *B. coagulans* L4 [14]와 *B. megaterium* 2-37-4-1 [15]의 효소와는 유사하였고, 최적반응온도가 65°C와 70°C로 보고된 *B. coagulans* RCS3 [2], *B. subtilis* [13]와 *B. stearothermophilus* [4]의 효소보다는 낮았다. 한편 북극에서 분리된 *A. ikkense*가 생산하는 저온 활성 효소는 20-30°C에서 최대 활성을 보이는 것으로 보고되었다[22]. 또한 *B. licheniformis* DSM 13, *B. coagulans* [1]와 *B. stearothermophilus* [4] 유래 효소의 최적 pH는 6.0-7.0 범위로 알려져 분리균의 효소와 유사하였으며, *B. megaterium* 2-37-4-1과 *A. ikkense*의 효소 및 *B. stearothermophilus*의 변이체 효소[5]는 pH 7.5-8의 범위에서 최대 활성을 보이는 것으로 보고되었다.

30-60°C 범위의 온도에서 조효소액을 30분과 60분 동안

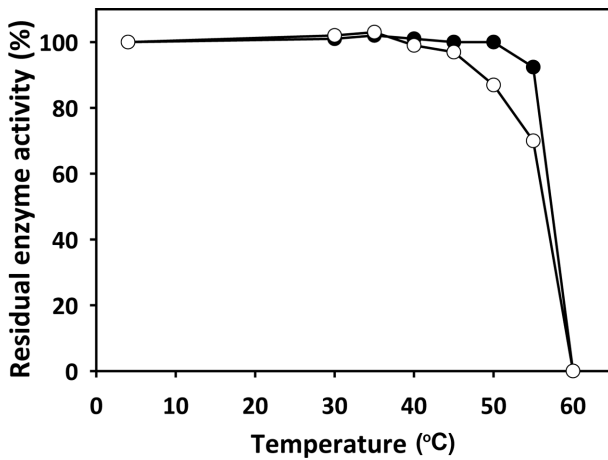


Fig. 3. Thermostability of the β -galactosidase in culrue filtrate. Thermostability was determined by measuring the residual activities of β -galactosidase after pre-incubations for 30 min (○) and 1 h (●) at the different temperatures. Each curve represents the average of three independent experiments within standard errors of 2% between them.

각각 열처리한 후 잔존활성을 조사한 결과 Fig. 3에 보인 바와 같이 40°C 이하에서는 60분 동안 방치하여도 안정하였으나, 45°C 이상의 온도에서는 1시간 방치하였을 때 β -galactosidase는 서서히 실활되기 시작하였으며 60°C에서는 30분 방치하였을 때도 잔존활성이 거의 관찰되지 않는 것으로 보아 60°C 이상에서는 매우 불안정한 것으로 판단된다. 그러므로 분리균의 β -galactosidase는 55°C에서 반감기가 94시간인 *Bacillus* sp.의 효소[21], 65°C에서 반감기가 2시간인 *B. coagulans* RCS3의 효소와 반감기가 50시간인 *B. stearothermophilus* ATCC 8005의 효소에 비해 열안정성이 낮으며[2, 4], 55°C에서 30분만에 70%가 실활된 *B. coagulans* L4의 효소와 45°C에서 1시간만에 70%가 실활된 *B. licheniformis* YB-1105의 균체의 효소 보다는 열안정성이 높았다[14, 28].

pNP- β Gal의 가수분해능이 있는 β -galactosidase 중에서 실제 lactose를 거의 분해하지 못하는 경우도 있으므로[24] 분리균이 생산하는 β -galactosidase의 lactose 가수분해 산물을 TLC로 분석하였다. 그 결과 Fig. 4에 보인 바와 같이 lactose가 완전히 분해되지는 않았지만, 분해산물로 galactose와 glucose의 이동도가 동일한 반응산물이 생성된 것으로 보아 lactose를 분해하는 것을 알 수 있다. 실제 β -galactosidase는 lactose의 분해산물인 galactose 또는 glucose에 의해 가수분해 활성이 저해를 받는 것으로 알려져 있는데, 반응 산물에 상당량의 lactose가 분해되지 못한 상태인 것으로 보아 YB-1414의 β -galactosidase도 lactose 가수분해 과정에서 반응산물에 의해 크게 저해를 받은 것으로 여겨진다.

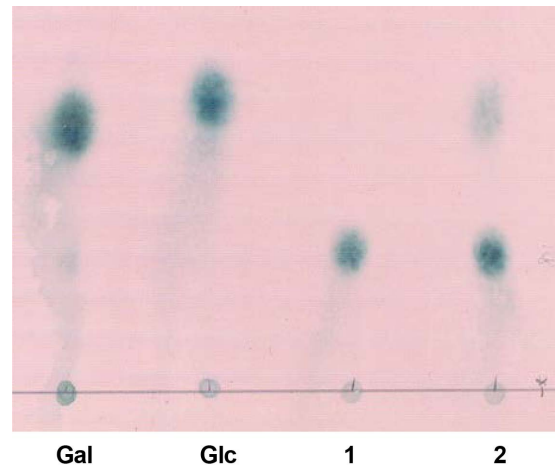


Fig. 4. Thin-layer chromatogram of hydrolysis product of lactose. Reactions were done using lactose as a substrate by culture filtrate (lanes 1 and 2) at 40°C for 5 h. Reaction products were analyzed from reaction mixtures before (lane 1) and after reaction (lane 2). Authentic sugar abbreviations are as follows: Gal, galactose; Glc, glucose.

β -galactosidase의 가수분해 활성에 미치는 당의 영향

β -galactosidase, β -glucosidase, β -xylosidase와 α -galactosidase 등을 포함하는 여러 종류의 glycosidase는 가수분해 반응시 반응산물에 의해 효소 활성이 저해되는 것으로 알려져 있다. 따라서 YB-1414의 β -galactosidase 활성에 미치는 당의 영향을 분석하기 위해 1 mM pNP- β Gal을 기질로 하고 glucose, galactose, xylose, mannose의 첨가농도를 달리하여 가수분해 활성을 측정하였다. 그 결과 galactose에 의한 가수분해 활성의 저해도가 가장 큰 것으로 나타났으며, 20 mM 이상이 존재할 경우 효소활성이 50% 이상 저해되었다(Fig. 5). *B. coagulans* RCS3 [2], *B. stearothermophilus* [9], *B. licheniformis* DSM 13 [12]과 *B. licheniformis* YB-1105 [28]의 효소도 galactose에 의해 활성이 강력하게 저해를 받는 것으로 알려져 있으나, *B. subtilis* KL88의 효소는 galactose가 20% 존재할 때도 50% 이상의 β -galactosidase 활성을 유지하는 것으로 보고되었다[16].

Glucose는 galactose에 비해 분리균의 효소 활성을 약하게 저해하였으며, 400 mM의 존재하에서도 약 85%의 활성을 보였다. Glucose와 유사한 mannose도 효소활성을 약하게 저해하였으며, 400 mM 존재하에서 약 91% 이상의 활성을 보였다. β -galactosidase에 의한 lactose 분해산물로 glucose와 galactose가 동시에 생성되는데 glucose 보다 galactose에 의한 효소 활성저해도가 큰 것은 galactose는 효소의 활성부위에 경쟁적 저해제로 작용하는 반면에 glucose는 비경쟁적 저해제로 작용하기 때문인 것으로 알려졌다[16]. 그러므로 대부분의 β -galactosidase는 분리균의 효소와 유사하게 glucose

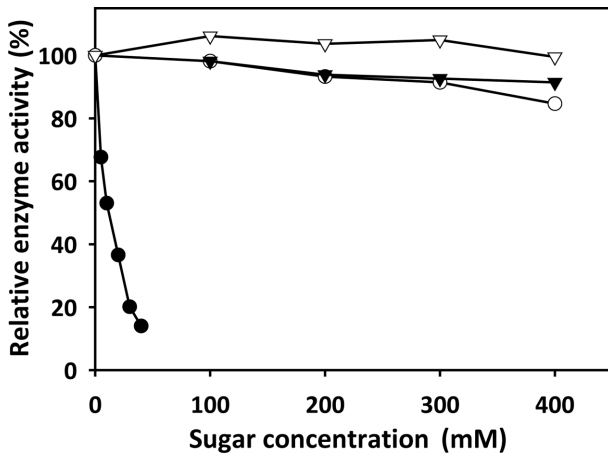


Fig. 5. Effects of sugar on the β-galactosidase activities of the culture filtrate. The relative activity was determined by measuring β-galactosidase activity of the culture filtrate for pNP-βGal (1.0 mM) in the presence of various concentrations of each sugar including glucose (○), mannose (▽), xylose (△), and galactose (●), respectively. Each curve represents the average of three independent experiments within standard errors of 2% between them.

에 의한 활성의 저해도가 galactose에 비해 훨씬 낮으나[20, 28], *B. licheniformis* DSM 13의 효소 경우는 glucose에 의해서도 효소 활성이 크게 저해되는 것으로 보고되었다[12]. 한편 xylose에 의해서는 효소 활성이 저해를 받지 않았을 뿐 아니라, xylose 농도가 300 mM 이하에서는 β-galactosidase 활성이 미약하게 증가되는 현상을 보였는데 이와 같은 현상은 *B. licheniformis* YB-1105에서 생산된 효소에서도 보고된 바 있다.

요 약

가정에서 제조된 된장으로부터 lactose를 glucose와 galactose로 가수분해하는 균체의 β-galactosidase의 생산균이 분리되었다. 분리균 YB-1414는 형태적 특성, 생화학적 성질 및 16S rRNA 유전자 염기서열에 근거하여 *Bacillus licheniformis*로 확인되었다. 탄소원과 질소원으로 밀기울(1%)과 yeast extract (2.5%)를 사용하였을 때 *B. licheniformis* YB-1414의 β-galactosidase 생산성이 최대 6.2 U/ml에 이르렀다. 특히 밀기울의 불용성 성분이 수용성 성분보다 β-galactosidase 생산성을 더 증가 시키는 것으로 확인되었다. β-galactosidase의 para-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside 가수분해 활성은 pH 6.0과 55-60°C에서 가장 높았으며, 낮은 농도의 galactose에 의해서도 크게 저해를 받았다. 그러나 glucose에 의해서는 β-galactosidase의 가수분해 활성이 약하게 저해를 받으며 400 mM glucose가 존재하여도 최대

활성의 85%에 해당하는 가수분해 활성을 보였다.

References

1. Batra N, Singh J, Joshi A, Bhatia S. 2011. Applications of β-gal-III isozyme from *Bacillus coagulans* RCS3, in lactose hydrolysis. *Int. J. Biol. Macromol.* **49**: 879-884.
2. Batra N, Singh J, Banerjee UC, Patnaik PR, Sobti RC. 2002. Production and characterization of a thermostable β-galactosidase from *Bacillus coagulans* RCS3. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **36**: 1-6.
3. Chen W, Chen H, Xia Y, Yang J, Zhao J, Tian F, et al. 2009. Immobilization of recombinant thermostable β-galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* for lactose hydrolysis in milk. *J. Dairy Sci.* **92**: 491-498.
4. Chen W, Chen H, Xia Y, Zhao J, Tian F, Zhang H. 2008. Production, purification, and characterization of a potential thermostable galactosidase for milk lactose hydrolysis from *Bacillus stearothermophilus*. *J. Dairy Sci.* **91**: 1751-1758.
5. Dong Y-N, Liu X-M, Chen H-Q, Xia Y, Zhang H-P, Zhang H, et al. 2011. Enhancement of the hydrolysis activity of β-galactosidase from *Geobacillus stearothermophilus* by saturation mutagenesis. *J. Dairy Sci.* **94**: 1176-1184.
6. Guerrero C, Vera C, Illanes A. 2013. Optimisation of synthesis of oligosaccharides derived from lactulose (fructosyl-galactooligosaccharides) with β-galactosidases of different origin. *Food Chem.* **138**: 2225-2232.
7. Hernaiz MJ, Crout DHG. 2000. A highly selective synthesis of N-acetylglucosamine catalyzed by immobilised β-galactosidase from *Bacillus circulans*. *J. Mol. Catalysis B.* **10**: 403-408.
8. Hirata H, Negoro S, Okada H. 1984. Molecular basis of isozyme formation of β-galactosidases in *Bacillus stearothermophilus*: isolation of two β-galactosidase genes, *bgaA* and *bgaB*. *J. Bacteriol.* **160**: 9-14.
9. Hirata H, Negoro S, Okada H. 1985. High production of thermostable β-galactosidase of *Bacillus stearothermophilus* in *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 1547-1549.
10. Iijima S, Lin KH, Kobayashi T. 1991. Increased production of cloned β-galactosidase in two-stage culture of *Bacillus amyloliquefaciens*. *J. Ferment. Bioeng.* **71**: 69-71.
11. Jo HD, Lee HA, Jeong SJ, Kim JH. 2011. Purification and characterization of a major fibrinolytic enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* MJ5-41 isolated from Meju. *J. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 1166-1173.
12. Juajun O, Nguyen TH, Maischberger T, Iqbal S, Haltrich D, Yamabhai M. 2011. Cloning, purification, and characterization of β-galactosidase from *Bacillus licheniformis* DSM 13. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **89**: 645-654.
13. Konsoula Z, Liakopoulou-Kyriakides M. 2007. Co-production of α-amylase and β-galactosidase by *Bacillus subtilis* in complex organic substrates. *Bioresour. Technol.* **98**: 150-157.
14. Levein RE, Mahoney RR. 1981. Purification and characterization of β-galactosidase from a strain of *Bacillus coagulans*.

- Antonie Van Leeuwenhoek*. **47**: 53-64.
15. Li Y, Wang H, Lu L, Li Z, Xu X, Xiao M. 2009. Purification and characterization of a novel β -galactosidase with transglycosylation activity from *Bacillus megaterium* 2-37-4-1. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **158**: 192-199.
 16. Li W, Xiang X, Tang S, Hu B, Tian L, Sun Y, et al. 2009. Effective enzymatic synthesis of lactosucrose and its analogues by β -D-galactosidase from *Bacillus circulans*. *J. Agric. Food Chem.* **57**: 3927-3933.
 17. Nam YD, Lee SY, Lim SI. 2012. Microbial community analysis of Korean soybean pastes by next-generation sequencing. *Int. J. Food Microbiol.* **155**: 36-42.
 18. Ozic C, Akcan N. 2010. Molecular characterization of β -galactosidase enzyme from *Bacillus licheniformis* ATCC 12759. *J. Biotechnol.* **150S**: 537.
 19. Phromraksa P, Nagano H, Boonmars T, Kamboonruang C. 2008. Identification of proteolytic bacteria from thai traditional fermented foods and their allergenic reducing potentials. *J. Food Sci.* **73**: 189-195.
 20. Rahim KA, Lee BH. 1991. Specificity, inhibitory studies, and oligosaccharide formation by β -galactosidase from psychrotrophic *Bacillus subtilis* KL88. *J. Dairy Sci.* **74**: 1773-1778.
 21. Sani RK, Chakraborti S, Sobti RC, Patnaik PR, Banerjee UC. 1999. Characterization and some reaction-engineering aspects of thermostable extracellular β -galactosidase from a new *Bacillus* species. *Folia Microbiol (Praha)*. **44**: 367-371.
 22. Schmidt M, Stougaard P. 2010. Identification, cloning and expression of a cold-active β -galactosidase from a novel Arctic bacterium, *Alkalilactibacillus ikkense*. *Environ. Technol.* **31**: 1107-1114.
 23. Shaw GC, Kao HS, Chiou CY. 1998. Cloning, expression, and catabolite repression of a gene encoding β -galactosidase of *Bacillus megaterium* ATCC 14581. *J. Bacteriol.* **180**: 4734-4738.
 24. Shipkowski S, Brenchley JE. 2006. Bioinformatic, genetic, and biochemical evidence that some glycoside hydrolase family 42 β -galactosidases are arabinogalactan type I oligomer hydrolases. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 7730-7738.
 25. Spizizen J. 1958. Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **44**: 407-408.
 26. Warmerdam A, Paudel E, Jia W, Boom RM, Janssen AE. 2013. Characterization of β -galactosidase isoforms from *Bacillus circulans* and their contribution to GOS production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **170**: 340-358.
 27. Welsch N, Homuth G, Schweder T. 2012. Suitability of different β -galactosidases as reporter enzymes in *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **93**: 381-392.
 28. Yoon K-H. 2012. Properties of β -galactosidase from *Bacillus licheniformis* isolated from cheongkookjang. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **40**: 17-22.
 29. Yoon K-H, Lim BL. 2007. Cloning and strong expression of a *Bacillus subtilis* WL-3 mannanase gene in *B. subtilis*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**: 1688-1694.