

## 각 미생물의 $\beta$ -galactosidase와 phytase의 활성비교

조진국 · 장우진 · 최진영 · 허강철\* · 이종익<sup>1</sup>

극림한경대학교 낙농과학과, <sup>1</sup>(주)삼익유가공

### 서 론

$\beta$ -galactosidase는 우유의 주요 당인 유당(lactose)을 glucose와 galactose로 가수분해하는 효소로<sup>(1)</sup>, lactase가 부족한 사람은 유당을 분해하지 못하여 소화가 되지 않는 유당 불내증 증세가 빈번히 나타나므로, 유아식품, 음료, 제과의 제조나 사료에 이용되고 있다<sup>(2)</sup>.

또, Phytase(EC 3.1.3.8)는 사료에 존재하는 phytic acid 분해에 따른 인의 이용성 증대로 배설되는 인함량을 효과적으로 줄일 수 있어 수요가 증가하고 있다<sup>(3,4)</sup>. 이러한 효소들의 생산은 국내 생산기업이 영세하고 기술낙후로 주로 Novo, Daiwa, Amano, Gist-brocades 등으로부터 수입을 하고 있다. 특히 이들 외국 업체들은 특이성 효소를 위주로 개발, 판매해 시장을 넓혀가고 있으므로, 국내에서도 기능성이 있는 효소를 포함하는 균주 선발 및 유전자조작을 통한 효소생산 효율을 높이기 위한 연구가 필요하다. 본 연구는 이러한 맥락에서  $\beta$ -galactosidase와 phytase활성이 높은 균주의 선발을 목적으로 발효유인 Kefir와 축산환경에서 미생물들을 분리한 후, 각각의 효소활성을 측정하여 비교하였다.

### 재료 및 방법

#### 재 료

효소추출용 미생물은 Table 1과 같이 Kefir 및 축산분뇨에서 분리하여 동정한 것(data not shown)과, KCTC에서 구입한 것을 사용하였다.

Table 1. Microorganisms for the experiment.

Classification	Microorganisms	Origin Sources
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. rhamnosus</i>	Kefir
"	<i>L. salivarius</i>	KCTC
"	<i>L. reuteri</i>	KCTC
"	<i>L. coryniformis</i>	livestock manure
"	<i>L. paracasei</i>	livestock manure
<i>Streptococcus</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	livestock manure
<i>Yeast</i>	<i>Candida kefir</i>	Kefir
"	<i>Candida utilis</i>	KCTC
"	<i>Kluyveroyces maxiranus</i>	livestock manure
"	<i>saccharomyces sp.</i>	livestock manure

#### 실험방법

효모는 700ml의 YM 배지에 2%의 lactose를 첨가하여 사용하였으며, 유산균의 경우도 MRS 배지를 사용하여 같은 조건으로 처리하였다. 접종 후 37℃의 shaking incubator에서 72시간 동안 배양하였다. 배양액을 원심분리(4℃, 5000rpm, 20분)를 통하여 균체를 회수하고 50 ml의 PBS buffer에 회석시켰다. 다시 균체액을 French pressure cell(16,000psi)로 하고 같은 조건으로 원심분리 하여 그 상등액을 조효소액으로 사용하였다. β-galactosidase 효소의 활성은 5mM ONPG를 포함하는 0.1M potassium phosphate buffer(pH7.0)에 효소액 200μl를 첨가하여 37℃에서 10분간 반응시키고 420nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다. phytase 활성은 Shimizu 방법<sup>(5)</sup>에 따라 75μl 효소액과 2mM Na-phytate를 함유한 0.5 M sodium acetate(pH4.0) 300μl를 55℃에서 15분간 반응시키고 발색시약을 첨가하여 820nm에서의 흡광도를 측정하였다. 활성은 각각 o-Nitrophenol 과 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>를 standard로 이용하여 작성한 standard curve로부터 산출하여 비활성은 umol/min/mg으로, 체적활성은 umol/ml으로 나타냈다. 단백질의 농도는 Bradford 방법으로 정량하였다.

#### 결과 및 고찰

##### 각 미생물 세포질의 단백질 함량

배양후 유산균과 효모의 수는 대략 5.0~ 9.0× 10<sup>9</sup> cfu/ml로 나타났으며, 효모는 1.0 ~ 5.0× 10<sup>9</sup> cfu/ml 범위인 것으로 확인되었다. French Pressure cell로 파쇄한 각 미생물에서 추출된 단백질농도는, 효모보다 유산균이 대체로 높은 것으로 나타났다. 단백질 농도는 *Saccharomyces sp.*와 *Lactobacillus paracasei*가 40.86과 36.20 mg/ml로 회수율이 가장 높았으며, *Enterococcus faecium*과 *Cadida kefir* 및 *utilis*가 15.0과 18.8 및 18.0 mg/ml 이었다.

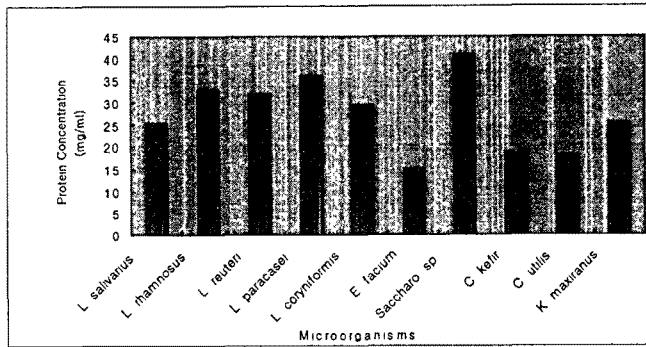


Fig. 1. Protein concentration of the extracted cytosol fraction from each microorganism.

### $\beta$ -galactosidase 의 비활성 및 체적활성

$\beta$ -galactosidase의 비활성은 *Kluyveromyces maxiranus*와 *Candida utilis*를 제외하고는 대부분 0.80~ 0.89  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  사이인 것으로 확인되었다(Fig. 2). 이중 *Lactobacillus paracasei*가 0.89  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ 로 가장 높은 비활성을 나타냈다. 체적활성은 비교하였을 때는 *Lactobacillus paracasei* 및 *Lactobacillus rhamnosus*, *Enterococcus faecium*이 각각 15.9 및 14.5, 14.5  $\mu\text{mol}/\text{ml}$ 를 기록하였고, 효모중에서는 *Cadida kefir*가 8.36  $\mu\text{mol}/\text{ml}$ 으로 다른 효모들보다도 높았다(Fig. 2). 체적활성이 높은 것이 총효소단백질이 많은 것이므로,  $\beta$ -galactosidase의 추출재료로는 *Lactobacillus paracasei* 및 *Lactobacillus rhamnosus*, *Enterococcus faecium* 등이 적합한 것으로 나타났다.

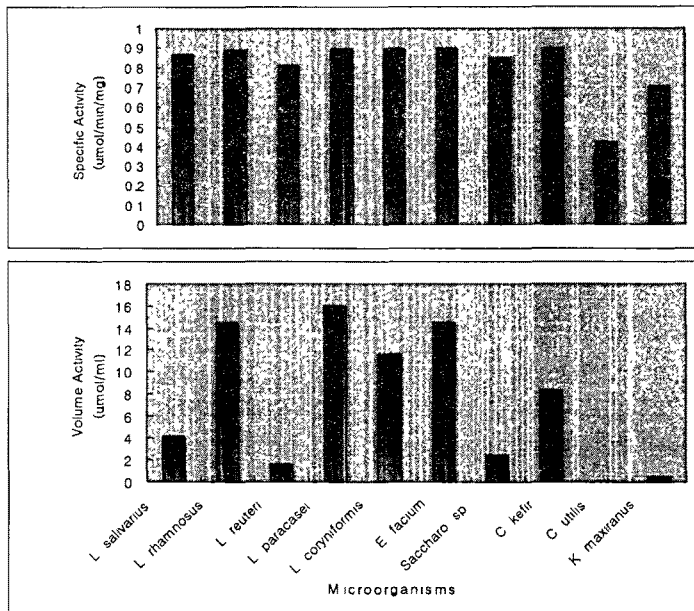


Fig. 2. Specific activity and volume activity of  $\beta$ -galactosidase in the extracted fraction from each microorganisms.

### Phytase의 비활성 및 체적활성

phytase의 비활성은 *Lactobacillus paracasei* 와 *Enterococcus faecium* 가 0.032와 0.038 umol/min/mg로 가장 높았다(Fig. 3). 효모중에서는 candida kefir와 *Candida utilis* 가 약 0.02 umol/min/mg로 약간 높았다.  $\beta$ -galactosidase의 비활성이 대략 같은 활성을 나타낸 것에 비해 phytase는 미생물별로 차이가 있었다. 체적활성의 경우는 *Lactobacillus paracasei*가 35.12 umol/ml로 가장 높았으며, *Lactobacillus rahmnosus*, *Enterococcus faecium*은 각각 17.26 및 17.04 umol/ml를 기록하였다(Fig. 3). 그 외는 약 11~13 umol/ml를 나타냈으며, *saccharomyces sp.* 가장 낮았다. 이결과로부터 phytase의 추출재료로는 *Lactobacillus paracasei* 가 가장 적합한 것으로 사료되었다.

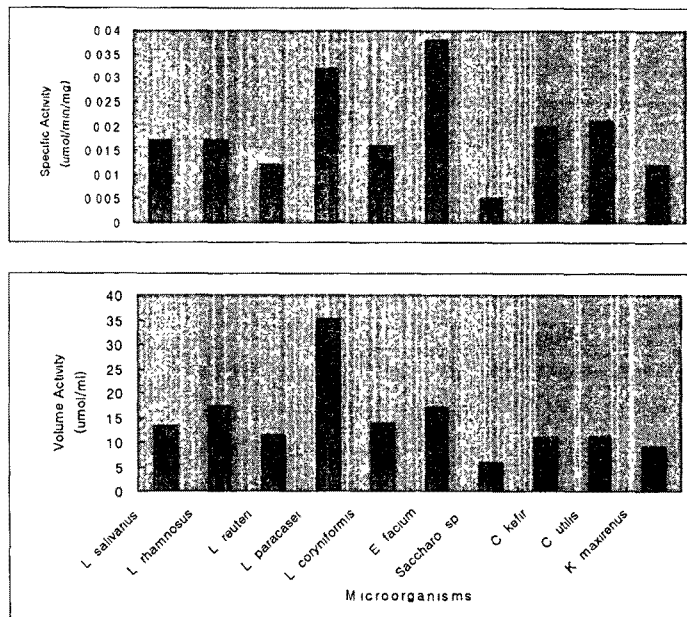


Fig. 3. Specific activity and volume activity of phytase in the extracted fraction from each microorganisms.

### 요약

본 연구는  $\beta$ -galactosidase와 phytase활성이 높은 균주의 선별을 목적으로 수각 미생물들을 Kefir와 자연환경에서 분리하여 효소활성을 측정하였다. 배양한 유산균과 효모 균체액을 French pressure cell press로 세포를 파쇄하였을 때, 각 미생물의 단백질농도는 효모보다 유산균이 높은 것으로 나타났다.  $\beta$ -galactosidase의 비활성은 *Kluyveromyces marxianus* 와 *Candida utilis*를 제외하고는 대부분 0.80~0.89 umol/min/mg 사이였다. 체적활성의 경우는 *Lactobacillus paracasei* 및 *Lactobacillus rahmnosus*, *Enterococcus faecium*이 각각 15.9 및 14.5, 14.5 umol/ml를 기록하여  $\beta$ -galactosidase의 추출재료로 우수하였다.

phytase의 비활성은 *Lactobacillus paracasei* 와 *Enterococcus faecium*이 0.032와 0.038 umol/min/mg로 가장 높았다. 체적활성의 경우는 *Lactobacillus paracasei*가 35.12 umol/ml로 가장 높았다. 결론적으로  $\beta$ -galactosidase와 phytase의 생산측면에서 이용한 미생물중에서는 *Lactobacillus paracasei* 가 가장 우수한 것으로 사료되었다.

## 참 고 문 헌

1. Nijpels, H. H. (1979) 何故低乳糖牛乳は必要か, 乳業ジャーナル, 10-15
2. Artolozaga M. J, et al. (1998) *Bioseparation*, 7(3), 137-141.
3. Nelson, T. S. et al. (1976) *J. Anim. Sci.*, 42, 1509-1515.
4. Fisher, H. (1993) *Nutr. Rev.* 50, 170-175.
5. Shimizu, M. H. (1992) *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56, 1266-1271.