

Streptococcus thermophilus 510에 의한 β -Galactosidase의 생산, 정제 및 특성

강국희*·박신인

성균관대학교 농과대학 낙농학과

Production, Purification and Characterization of β -Galactosidase from *Streptococcus thermophilus* 510

Kang, Kook-Hee* and Shin-In Park

Department of Dairy Science, College of Agriculture, Sung Kyun Kwan University, Kyungi, Korea

Streptococcus thermophilus 510 was investigated as a potential source of β -galactosidase. Optimum cultural conditions for maximum enzyme production were 0.5% lactose as carbon source, initial pH 7.0, 37°C, and 18 hours of cultivation. The enzyme was purified to homogeneity by ammonium sulfate fractionation, protamine sulfate precipitation, Sephadex G-200 gel filtration, and DEAE-Sephadex A-50 ion exchange chromatography. The purified enzyme exhibited an optimum pH at 7.0, and an optimum temperature of 50°C. Metal ions such as Mn^{2+} and K^+ , dithiothreitol, and 2-mercaptoethanol stimulated β -galactosidase activity. Ethylenediamine tetracetic acid, 8-hydroxyquinoline, Hg^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} , and galactose were inhibitory. The K_m and V_{max} for *o*-nitrophenyl β -D-galactopyranoside were 1.25 mM and 88.50 μ moles/min-mg protein, respectively. The molecular weight was estimated to be 520,000, and the amino acid composition indicated relatively high contents of glutamic acid, aspartic acid, leucine, and valine.

β -Galactosidase는 우유내의 유당이 낙농제품에서 나타내는 몇가지 문제점을 개선할 수 있다고 인정되어, 이에대한 연구가 진행되고 있다. 유당을 β -galactosidase에 의해 단당류인 glucose와 galactose로 분해함으로써 유당 소화장애자(lactose intolerance)들이 우유를 섭취할 수 있도록 하였으며(1), 농축 유제품과 냉동 유제품에서 유당의 결정화 현상을 감소시켜 유제품의 품질을 향상시킬 수 있었다(2-4). β -Galactosidase는 효모, 세균, 곰팡이 등 많은 미생물들로부터 생산되며(5), 이중 현재 GRAS(Generally Recognized As Safe)로 안정성을 인정받아 효소로서 식품산업에 사용되고 있는 균주는 *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Kluyveromyces fragilis*와 *Kluyveromyces lactis* 뿐이다(6). 이 중에서 *Kluyveromyces fragilis*의 β -galactosidase가 낙농산업에 널리 이용되고 있지만, 이 효소는 열안정성

과 저장안정성이 낮은 단점을 가지고 있다(7). 따라서 열안정성이 높은 동시에 식품에 사용될 수 있는 효소를 생산하기 위한 연구가 계속 되었으며, 최근에는 유산균에서 β -galactosidase를 유도하여 이용하고자 하는 연구가 시도되었다(8). Wierzbicki와 Kosikowski(9)에 의해 최초로 고온성 유산균인 *Streptococcus thermophilus* C-12에서 생산되는 β -galactosidase가 보고되었다.

본 연구는 *Streptococcus thermophilus* 510으로부터 생산되는 β -galactosidase의 생성조건, 정제, 이화학적 및 효소학적 특성을 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주

시험균주는 성균관대학교 낙농학과 보존 균주인

Key words: β -Galactosidase, purification, characterization, *Streptococcus thermophilus* 510.

*Corresponding author

Streptococcus thermophilus 510 SKD 1006을 사용하였다.

사용배지와 배양방법

기본배지는 지금까지 보고된 (8, 10-13) 유산균의 β -galactosidase 생산연구에 사용된 배지를 비교 검토한 결과, J8 broth medium(11)가 *S. thermophilus* 510의 β -galactosidase 생산을 위한 최적 배지로 인정되어 본 실험에 사용하였다.

M 17 slant에 보존중인 시험균을 10% 탈지 우유에 접종하여 37°C에서 24시간 배양하고, 이 배양액을 기본배지에 대해 1%(v/v) 접종하여 배양온도 37°C에서 20시간 배양하였다.

Cell growth의 측정

배양이 끝난 배양액을 4°C로 급냉하고 Klett-Sumerson colorimeter (red filter)에서 측정하여 흡광도가 증가하는 것으로 균체의 증식을 나타내었다.

조효소액의 조제

배양이 끝난 후 배양액을 4°C로 급냉하고 저온(4°C)에서 6000 rpm으로 20분간 원심분리하여 균체를 포함한 다음 냉각한 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.0, 0.1 mM $MnCl_2$) 용액으로 3회 세척하였다. 미리 냉각한 세포 마쇄용 aluminium oxide (Nakarai Chemicals)을 균체 무게에 대해 15:1 비율로 가하여 유발에서 10분동안 격렬하게 갈아서 세포를 파쇄시켰다. 파쇄된 균체를 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.0, 0.1 mM $MnCl_2$)에 현탁시켜 10,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 분리된 상등액을 본 실험의 균체내 조효소액으로 사용하였다.

효소활성의 측정

효소의 역가는 Lederberg (14)의 방법에 따라 *o*-nitrophenyl β -D-galactopyranoside (ONPG)를 기질로 하여 측정하였다. 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.0)에 ONPG를 5 mM이 되도록 용해한 기질용액 2 ml를 37°C에서 이온화 시킨 후, 적절히 희석한 효소액 0.5 ml를 가하고 37°C에서 10분간 반응 후 급냉시키면서 냉각된 0.5 M Na_2CO_3 용액 2.5 ml를 가해서 반응을 정지시킨 다음, 발색된 황색의 흡광도를 420 nm에서 측정하였다. 효소활성의 단위는 상기 조건에서 1분 동안에 1 μ mole의 *o*-nitrophenol을 유리시키는데 필요한 효소량을 1단위로 하였다.

효소의 정제

준비된 균체내 조효소액을 ammonium sulfate에 의한 염석, 투석, protamine sulfate에 의한 핵산의 제거, Sephadex G-200 gel filtration 및 DEAE-Sephadex A-50 ion exchange chromatography 등의 4단계를 거쳐서 분리 정제하였다.

단백질의 정량

단백질을 Lowry 등 (15)의 방법에 따라 측정하여 bovine serum albumin을 표준 단백질로 하여 정량하였다.

Polyacrylamide disc gel electrophoresis

Analytical disc gel electrophoresis을 Gabriel (16)의 방법에 의해서 행하였다.

Gel의 acrylamide 함량은 7.5%이었고 (0.5×10.5 cm), tris-glycine buffer (pH 8.3)에서 1개의 gel당 3 mA의 전류를 사용하여 4°C에서 3시간 수행되었다. 전기영동이 끝난 후 gel을 methanol:acetic acid:water (5:1:5)의 용액에 용해된 0.25% coomassie brilliant blue로 염색하였으며, 과다하게 염색된 coomassie brilliant blue는 위의 용액에서 탈색하였다.

결과 및 고찰

효소의 생산

탄소원의 영향: 각종 탄소원을 기본배지에 대하여 0.5%(w/v)씩 첨가한 후 배양액의 최종 pH와 효소

Table 1. Effect of carbon sources on production of β -galactosidase by *S. thermophilus* 510.

Carbon source	Final pH	Enzyme activity (unit/ml)	Relative activity (%)
Control	6.92	0	0
Glucose	6.31	4.90	15.02
Galactose	5.92	22.94	70.32
Fructose	5.98	16.99	52.08
Lactose	5.22	32.62	100.00
Sucrose	5.92	21.01	64.41
Melibiose	6.81	2.16	6.62
Arabinose	6.89	0.33	1.01
Raffinose	6.91	0.04	0.12

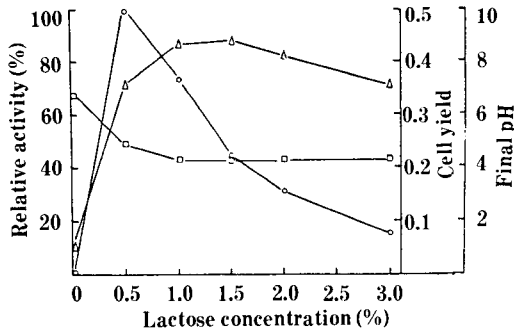


Fig. 1. Effect of lactose concentration on production of β -galactosidase by *S. thermophilus* 510. Relative activity, \circ ; cell yield, Δ ; final pH, \square .

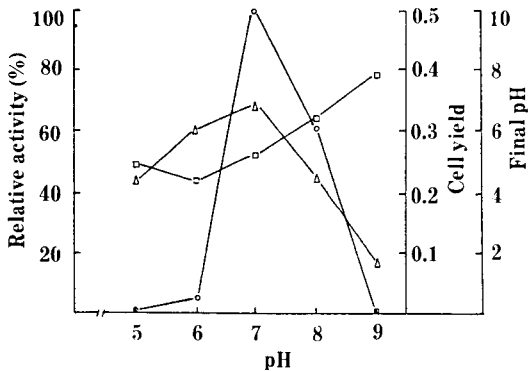


Fig. 2. Effect of initial pH of medium on production of β -galactosidase by *S. thermophilus* 510. Relative activity, \circ ; cell yield, Δ ; final pH, \square .

역가를 조사한 결과는 Table 1과 같다. 효소의 활성이 가장 높게 나타난 탄소원은 lactose로써 32.62 unit/ml의 효소역가를 나타내었으며 다음이 galactose로 22.94 unit/ml의 효소역가를 보였다. 효소생산이 가장 높은 lactose의 첨가농도를 0.5~3.0% 범위로 조정하여 농도에 따른 cell growth 및 효소역가를 조사한 결과가 Fig. 1에 나타난 바와 같이 균체증식은 1.5% lactose 농도에서 가장 좋았으나 효소생산은 0.5% lactose 농도에서 가장 높게 나타났다.

Initial pH의 영향 : 본 균주의 효소생산 및 균체증식에 가장 적합한 배지의 초기 pH 결정을 위한 배양 실험 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 균체증식은 pH 6.0~7.0 사이의 범위에서 높게 일어났으나, 효소생산은 pH에 따라 극히 민감한 영향을 나타내어 효소의 최대 생산은 초기 pH 7.0에서 나타났다.

배양온도의 영향 : 본 균주에 의한 효소생산에 미치는 배양온도의 영향을 검토하기 위해 Fig. 3에 나

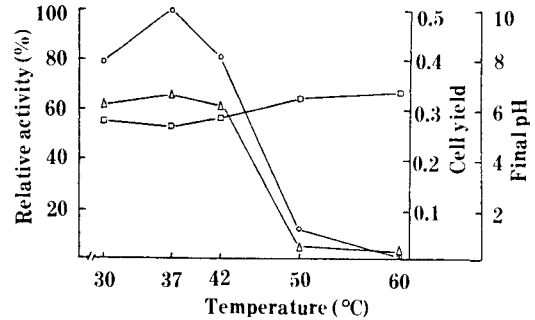


Fig. 3. Effect of incubation temperature on production of β -galactosidase by *S. thermophilus* 510. Relative activity, \circ ; cell yield, Δ ; final pH, \square .

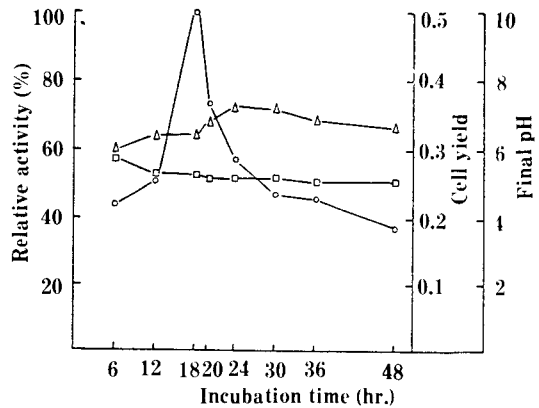


Fig. 4. Effect of incubation time on production of β -galactosidase by *S. thermophilus* 510. Relative activity, \circ ; cell yield, Δ ; final pH, \square .

타난 바와 같이 30°C에서 60°C 사이의 각 온도에서 20시간 배양한 결과, 균체증식은 30°C와 42°C 사이의 비교적 넓은 범위에서 높은 수준이었다.

그러나, 효소생산은 37°C에서 가장 높은 생산성을 나타내 보임으로써 이후의 효소생산 실험에서는 37°C를 배양적으로 하였다.

배양시간의 영향 : 최적 배지 (pH 7.0)에 본 균주 배양액 1%를 접종하고 배양온도 37°C에서 48시간 동안 배양하면서 배양시간에 따른 균체증식과 효소생산성의 변화를 측정하여 Fig. 4와 같은 결과를 얻었다. 본 균주의 균체증식은 배양 24시간 전후에서 균체증식의 정지기에 들어감으로서 최고값을 나타내고 있고, 효소 생산성은 배양 18시간에 균체를 포집하여 효소 생산성을 측정하였을 때 가장 높은 효소 생산량을 나타내었으나 정지기의 초기 이후부터는 효소 활력이 감소하였다. *Streptococcus thermophilus*의 β -galactosidase는 cytoplasm에 존재하는 균체내 효소로써 (17, 18), 균체증식 속도와 비례적으

Table 2. Effect of saturation concentration of ammonium sulfate on β -galactosidase activity from cell free extract of *S. thermophilus* 510.

	Saturation % of ammonium sulfate							
	0	30	40	50	60	70	80	90
Enzyme activity (unit/ml)	32.72	0.57	1.79	25.45	26.77	27.07	27.45	27.56
Protein content (μ g/ml)	1135.15	330.23	541.62	716.65	751.73	752.35	826.85	827.73
Specific activity (unit/mg)	28.82	1.73	3.30	35.51	35.61	35.98	33.20	33.30
Yield (%)	100.00	1.74	5.47	77.78	81.82	82.74	83.89	84.24

Table 3. Effect of different levels of protamine sulfate on removal of nucleic acid from ammonium sulfate fractionated β -galactosidase

	Protamine sulfate (mg/mg protein)						
	0	0.108	0.153	0.197	0.251	0.305	0.401
Enzyme activity (unit/ml)	138.81	121.55	116.18	115.38	107.95	79.15	55.39
Protein content (μ g/ml)	4579.81	3988.46	3698.08	3395.19	3077.89	2865.39	2344.23
Specific activity (unit/mg)	30.31	30.48	31.42	33.98	35.07	27.62	23.63
Yield (%)	100.00	87.57	83.70	83.12	77.77	57.02	39.90
Absorbance at 280nm	3.862	3.690	3.561	3.561	3.360	2.816	2.361
Absorbance at 260nm	3.862	3.721	3.437	3.187	2.392	2.214	1.906
A 280/A 260	1.00	0.99	1.04	1.12	1.40	1.27	1.24

로 균체내 효소생산이 증가한다. 그러나 최대 효소 활력을 얻기 위해 균체를 포집하는 가장 좋은 시기는 정지기가 시작되기 전인 대수기 후반기에 하는 것이 가장 좋았으며, 이 결과는 Mahoney 등 (19)의 보고와 일치하였다. 따라서 이후 효소생산 실험에서는 Fig. 4에 나타난 바와 같이 대수기 후반기인 배양 18시간 후에 균체증식을 정지시키고 효소생산 준비를 위한 실험을 하였다.

효소의 정제

Ammonium sulfate fractionation: 세포 물질을 제거한 조효소액에 고품 ammonium sulfate를 30~90% 농도로 포화시키고 4°C에서 3시간 정치한 후 원심분리하여 불용성 물질로서 침전된 효소 단백질을 분획하여 소량의 0.1M potassium phosphate buffer(pH 7.0)에 용해시킨 다음 잔존하는 ammo-

nium sulfate을 제거하기 위하여 동일한 원충용액을 사용하여 4°C에서 투석하였다. Table 2에 나타난 바와 같이 ammonium sulfate 70% 포화농도에서 가장 높은 specific activity(35.98 unit/mg protein)을 갖는 활성을 보였는데 이때 효소 단백질의 회수율은 조효소액에 있는 β -galactosidase의 82.74%이었다. Ammonium sulfate를 80% 포화농도 이상으로 첨가하여도 specific activity는 증가하지 못하였으며, 다른 단백질이 더 침전되었다. 따라서 본 실험에서는 70% 포화농도의 고품 ammonium sulfate를 첨가하여 조효소액 중의 β -galactosidase를 침전물로 분획하였다.

핵산의 제거: Ammonium sulfate를 제거한 시료에 1%의 protamine sulfate 용액을 첨가하여 4°C에서 30분간 방치한 후 원심분리하여 핵산을 침전물로서 제거하였다.

첨가하는 protamine sulfate의 양은 시료의 단백질 농도에 따라 결정하였으며 그 결과가 Table 3에 나타났다. 단백질 1mg당 0.251 mg의 protamine sulfate가 첨가되었을 때 β -galactosidase 회수율은 ammonium sulfate 분획의 77.77%이었고, specific activity는 35.07 unit/mg protein으로써 ammonium sulfate 분획의 1.2배가 증가하였다. 그러나 단백질 1mg당 0.305 mg 이상의 protamine sulfate를 첨가한 경우에는 β -galactosidase의 회수율과 specific activity를 감소시켰을 뿐만 아니라 280 nm에서의 흡광도와 260 nm에서의 흡광도의 비율도 감소하였다. 단백질 1mg당 protamine sulfate 0.251 mg을 첨가함으로써 280 nm에서의 흡광도와 260 nm에서의 흡광도의 비율을 1.0에서 1.40으로 증가시킬 수 있었다. 이것은 핵산함량이 약 3.25%에서 약 0.75%로 감소되었음을 나타낸다(20).

Sephadex G-200 gel filtration : 핵산을 제거한 효소액을 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.0) 로 미리 평형시킨 Sephadex G-200 column (2.2×65 cm)에 주입하고 1시간당 20 ml의 유속으로 같은 buffer로 용출하였으며 5 ml씩 분획하여 gel 여과하였다. Fig. 5에서와 같이 β -galactosidase 활성을 나타내는 효소 peak가 제일 먼저 용출되었는데 이것은 주입된 시료의 다른 단백질에 비해서 β -galactosidase의 분자량이 큰 것을 의미한다. Gel 여과한 효소 용출액의 specific activity (244.91 unit/mg protein)는 세포 물질을 제거한 조효소액에 비해 7.95배 증가하였고 회수율은 63.08% 이었다 (Table 4).

DEAE-Sephadex A-50 ion exchange chromatography : Gel 여과에서 분획된 효소액을 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.0)로 평형시킨 DEAE-Sephadex A-50 column (3.3×25 cm)에 흡착시켰

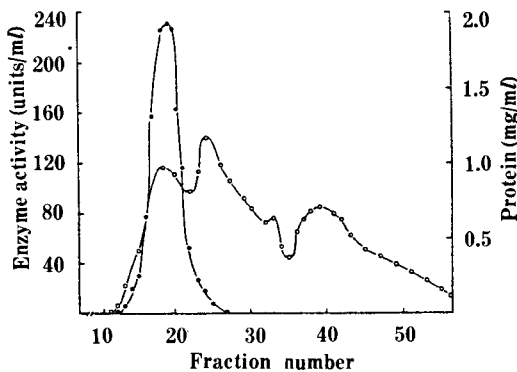


Fig. 5. Sephadex G-200 gel filtration pattern of β -galactosidase of *S. thermophilus* 510. Enzyme activity, ●; protein, ○.

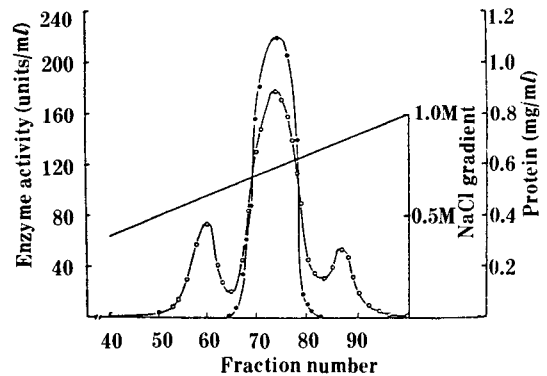


Fig. 6. DEAE-Sephadex A-50 ion exchange chromatogram of β -galactosidase of *S. thermophilus* 510. Enzyme activity, ●; protein, ○.

Table 4. Summary of purification of β -galactosidase from *S. thermophilus* 510.

Procedure	Total activity (unit)	Total protein (mg)	Specific activity (unit/mg)	Yield (%)	Fold purification
Cell free extract	7066.67	229.44	30.80	100	1.00
Ammonium sulfate (0-70% saturation)	6126.48	154.20	39.73	86.70	1.29
Protamine sulfate fractionation	4863.07	87.37	55.66	68.82	1.81
Sephadex G-200 gel filtration	4457.39	18.20	244.91	63.08	7.95
DEAE-Sephadex A-50 ion exchange chromatography	4063.20	7.47	543.94	57.50	17.66

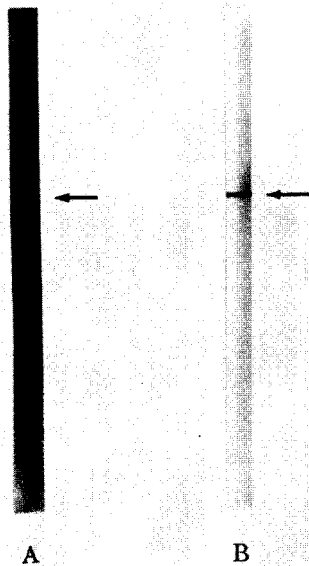


Fig. 7. Polyacrylamide disc gel electrophoresis patterns of crude extract (A) and purified β -galactosidase (B).

다. 흡착된 효소는 동일한 완충용액 250 ml/와 1.0 M NaCl을 함유시킨 같은 완충용액 250 ml/와의 continuous linear gradient로 1시간당 20 ml/의 유속으로 용출하고 5 ml/씩 분획하여 Fig. 6에 표시된 바와 같이 β -galactosidase의 역가와 단백질 함량을 측정하였다. β -Galactosidase는 NaCl 농도 0.65 M과 0.81 M 사이에서 용출되었으며 중간에 용출된 단백질 정점과 일치하였다(Fig. 6). 분리된 효소액의 회수율은 조효소액의 57.50%이었고 specific activity는 543.94 unit/mg protein으로서 정제과정을 통하여 효소활력이 17.66배 증가하였다. 이상의 정제과정 단계의 결과를 Table 4에 요약하였으며, 4단계의 정제공정을 거쳐서 얻은 정제된 β -galactosidase는 Fig. 7과 같이 polyacrylamide disc gel electrophoresis에서 단일 band를 나타냄으로써 순수하게 정제되었음을 확인할 수 있었다.

효소의 특성

pH의 영향 : 정제효소에 대한 pH의 영향을 조사하기 위해서 0.1M citrate phosphate buffer(pH 2.5~6.5), 0.1M potassium phosphate buffer(pH 7.0)와 0.1M tris-HCl buffer(pH 7.5~10.0)을 사용하여 효소액을 37°C에서 10분간 반응시켜

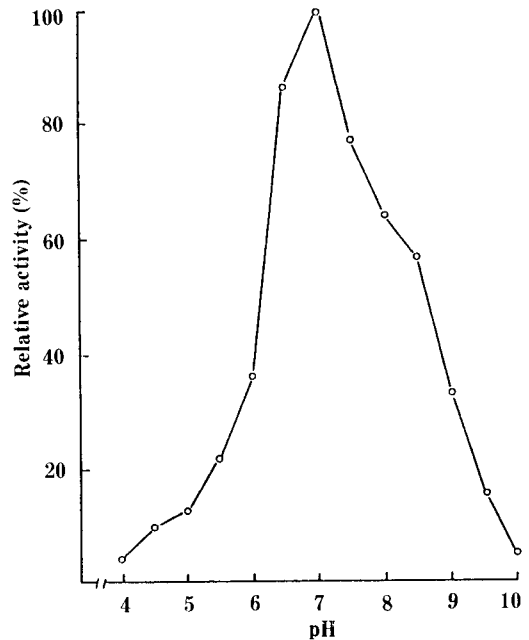


Fig. 8. Effect of pH on β -galactosidase activity of *S. thermophilus* 510.

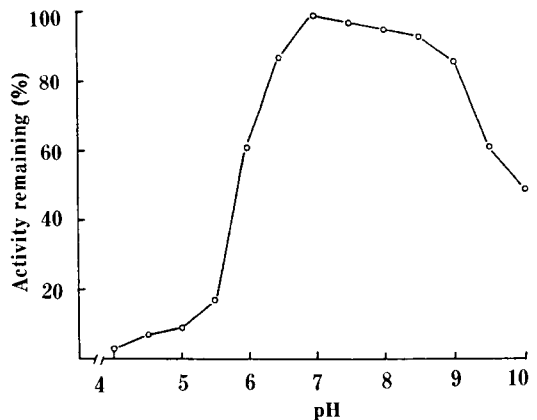


Fig. 9. Effect of pH on β -galactosidase stability of *S. thermophilus* 510 at 37°C.

β -galactosidase의 활성을 측정하였다. Fig. 8에 나타난 바와 같이 pH 7.0에서 최고의 효소활성을 나타내었으며, 이것은 Ramana Rao와 Dutta(21) 및 Greenberg와 Mahoney(22) 등에 의해서 보고된 *Streptococcus thermophilus*의 β -galactosidase의 최적 pH 7.0과 일치하는 결과이다.

반응시간 동안 각 pH에서 효소활력의 안정성을 조사하기 위하여 pH 4.0과 pH 10.0 사이의 완충용액에 용해된 효소용액을 37°C에서 60분 동안 정치한 후

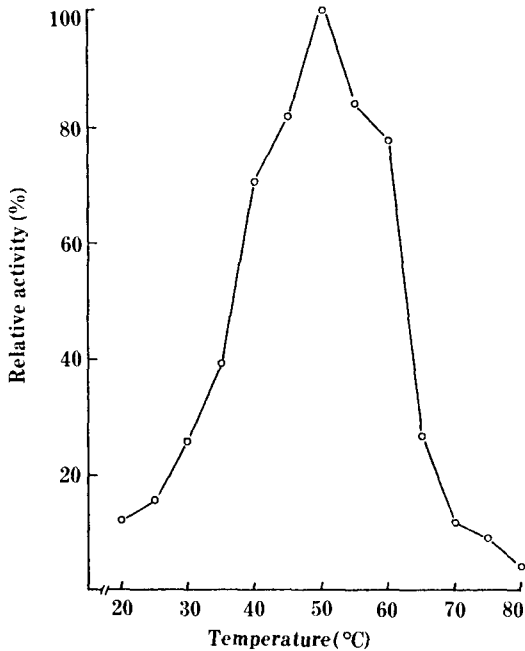


Fig. 10. Effect of temperature on β -galactosidase activity of *S. thermophilus* 510.

잔존하는 효소역가를 측정한 결과를 Fig. 9에 나타냈다. 본 효소는 pH 7.0과 pH 8.5 사이에서 37°C에서 60분간의 반응시간 동안에도 높은 안정성을 나타내어 93% 이상의 효소활력이 유지되었다. 그러나 pH 5.5 이하에서는 효소의 불활성화 경향이 뚜렷하였으나 pH 9.0 이상의 알카리쪽에서는 불활성화 현상이 미약하여 pH 10.0에서도 약 48%의 활성이 잔존하였다.

온도의 영향: 정제효소에 대한 온도의 영향을 조사하기 위하여 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.0)에 용해한 효소용액을 20°C~80°C 사이의 각 온도에서 10분간 반응시킨 후 효소의 활성을 측정된 결과는 Fig. 10에 나타난 바와 같다. 본 효소의 활성은 온도가 상승함에 따라 급격히 증가하며 50°C에서 최대치를 나타내었으나 이 이상의 온도에서는 급격히 감소하였다. 정제효소의 열안정성을 시험하기 위해 37°C, 45°C, 50°C, 55°C와 60°C에서 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.0)에 용해한 효소용액을 60분 동안 정치하면서 효소의 불활성화 되는 정도를 조사한 결과(Fig. 11), 37°C, 45°C와 50°C에서는 효소의 열에 대한 안정성이 높아 60분 정치 후에도 각각의 온도에서 80%, 61%, 42%의 효소활성이 잔존하였다. 그러나 55°C와 60°C에서는 열안정성이 시간이 지남에 따라 급격히 감소하여, 55°C에

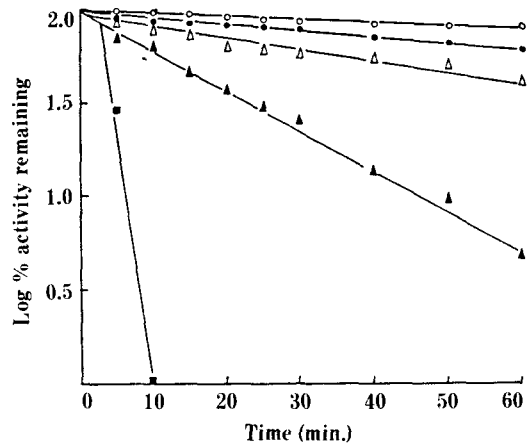


Fig. 11. Effect of temperature on rate of denaturation of β -galactosidase from *S. thermophilus* 510.

37°C, ○; 45°C, ●; 50°C, △; 55°C, ▲; 60°C, ■.

Table 5. Effect of metal ions on β -galactosidase activity of *S. thermophilus* 510.

Metal ion	Relative activity (%) at	
	1×10^{-3} M conc.	1×10^{-4} M conc.
Control ^a	100.00	100.00
CsCl	90.38	93.46
KCl	134.56	117.93
NaCl	114.40	106.06
LiCl	91.65	99.30
RbCl	68.21	98.78
CaCl ₂	44.40	75.39
CoCl ₂	29.71	40.16
FeCl ₂	46.37	63.41
HgCl ₂	0.00	0.00
MgCl ₂	113.89	104.19
MnCl ₂	137.99	125.91
ZnCl ₂	6.12	17.30

^a) Control consisted of enzyme in tris-HCl buffer (50mM, pH 7.0) without any other metal ion added.

서 60분 정치 후에는 5% 정도의 활성만이 유지되었으며, 60°C에서 10분 후에는 완전히 불활성화 되었다. *Kluyveromyces fragilis*의 β -galactosidase는 40°C까지는 안정성을 유지하였으나 40°C 이상부터는 활성이 급격히 상실되기 시작하였으며 (23), 51°C에서 10분간 정치 후 96%의 활성이 상실되었다(24). 이러한 보고에 비교하면 *Streptococcus thermophilus* 510의 β -galactosidase는 *Kluyveromyces fragilis*의

효소보다 열에 대한 안정성이 높음을 알 수 있다.

금속이온의 영향 : 50mM tris-HCl buffer (pH 7, 0)에 용해한 β -galactosidase 용액에 여러 종류의 금속이온들을 각각 1 mM과 0.1 mM 농도로 첨가하여 효소활성에 대한 금속이온의 효과를 ONPG를 기질로 하여 측정된 결과가 Table 5에 요약되었다.

본 효소의 최대 활력을 위해서 K^+ 와 Mn^{2+} 을 요구하며, Mg^{2+} 와 Na^+ 도 활력을 유지시켰다. 그러나 본 효소는 sulfhydryl기가 효소의 완전한 활성화에 필수적인 것으로 (25), Hg^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} 등과 같은 중금속이온들에 의해서 거의 완전히 불활성화 되었다. 이러한 결과는 *E. coli*, *L. murinus*,

Table 6. Effect of specific agents on β -galactosidase activity of *S. thermophilus* 510.

Reagent	Relative activity (%) at	
	$1 \times 10^{-2}M$ conc.	$1 \times 10^{-3}M$ conc.
Control	100.00	100.00
8-Hydroxyquinoline	37.89	55.75
Sodium bisulfite	107.07	105.34
EDTA	13.82	24.72
2-Mercaptoethanol	110.17	112.44
Cysteine	90.28	100.41
Dithiothreitol	124.97	133.51

Table 7. Effect of carbohydrates on β -galactosidase activity of *S. thermophilus* 510.

Carbohydrate	Relative activity (%) at	
	$1 \times 10^{-2}M$ conc.	$1 \times 10^{-3}M$ conc.
Control	100.00	100.00
Glucose	99.57	103.08
Galactose	49.18	69.88
Melibiose	102.58	108.40
Ribose	77.92	87.90
Lactose	90.28	92.15
Xylose	87.49	90.87
Fructose	92.01	96.67
Sucrose	111.24	101.89
Maltose	102.68	109.59
Mannose	94.35	107.11
Glucosamine	93.01	101.15
Methyl -D-gluco-side	99.85	103.64

Leu. citrovorum, *K. fragilis* 등과 같은 균주에서 정제된 β -galactosidase의 금속이온에 대한 영향과 유사한 결과를 나타내었다 (23, 24, 26-28).

Inhibitor의 영향 : 정제효소에 대한 각종 inhibitor의 영향을 조사하기 위하여 Table 6에 나타난 바와 같이 각 inhibitor를 10 mM과 1 mM 농도별로 반응액에 첨가한 후에 잔류활성을 측정하였다. Table 6에 나타난 바와 같이 본 효소는 ethylenediamine tetraacetate (EDTA)와 8-hydroxyquinoline에 의해서 강하게 억제를 받으나, dithiothreitol과 2-mercaptoethanol에 의해서는 전혀 억제되지 않았다. 본 효소가 chelating agent인 EDTA에 의해 억제받은 것을 미루어 보아 효소의 활성단에 금속이온이 존재하여 활성발현에 영향을 주는 metalloenzyme의 하나인 것으로 추정된다. 또한 dithiothreitol과 2-mercaptoethanol과 같은 reducing agent들에 의한 효과는 효소에 있는 많은 sulfhydryl기들이 산화되어 disulfide 결합을 형성함으로써 효소활성이 상실되는 것을 방지하는 것으로 사료된다. 이러한 결과는 *Bacteroides polypragmatus* (29), *Lactobacillus sporogenes* (30), *Thermus aquaticus* (31), *E. coli* (32)의 β -galactosidase에 대한 inhibitor의 영향을 조사한 실험결과와 일치한다.

탄수화물의 영향 : β -Galactosidase 활성화에 영향을 미치는 각종 당류의 저해효과는 Table 7에 표시되어 있는 바와 같이 galactose, lactose, ribose, xylose, fructose에 의해 효소에 의한 ONPG 가수분해가 저

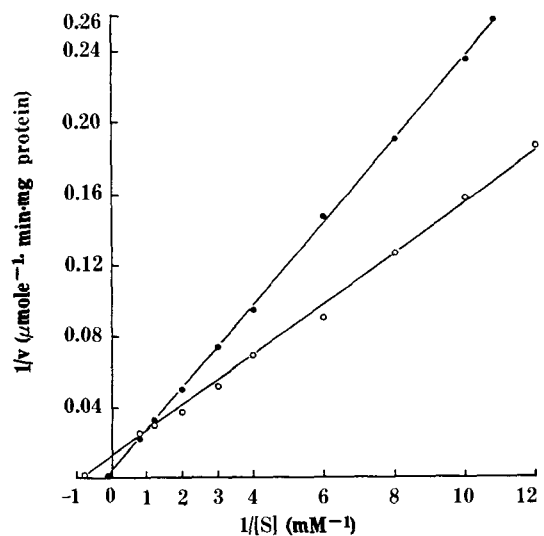


Fig. 12. Effect of substrate concentration on β -galactosidase activity of *S. thermophilus* 510. ONPG, ○; lactose, ●.

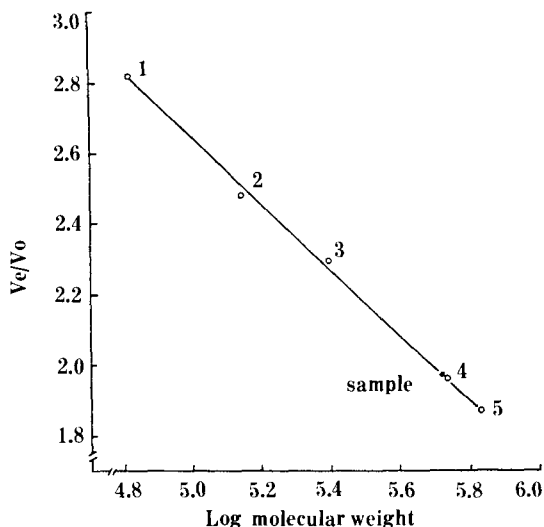


Fig. 13. Calibration of column of Sephadex G-200 gel filtration medium for determination of molecular weight of β-galactosidase
 1, bovine serum albumin; 2, lactate dehydrogenase; 3, catalase; 4, *E. coli* β-galactosidase; 5, thyroglobulin; ★, *S. thermophilus* β-galactosidase.

해되었으나, glucose, melibiose, sucrose, maltose, mannose, methyl-α-D-glucoside 등에 의해서는 저해되지 않았다. 본 효소가 galactose에 의해 가장 크게 활성이 저해되었는데, 이것은 galactose가 이 효소의 활성부위에 결합하는 친화력이 lactose보다 훨씬 강하기 때문이다(4).

기질 농도의 영향 : 기질 농도에 따른 반응속도를 Lineweaver-Burk 방법(33)으로 plot한 결과는 Fig. 12와 같으며, Lineweaver-Burk 방정식에 의하여 Michaelis-Menten 상수(K_m)와 최대 반응속도(V_{max})를 구하였다.

본 효소는 ONPG가 기질일 때 K_m은 1.25 mM이고, V_{max}는 88.50 μ mole/min·mg protein이었고, lactose의 경우에는 각각 7.23 mM과 308.64 μ mole/min·mg protein이었다. 이와같이 β-galactosidase의 기질이 lactose일 때 ONPG보다도 기질에 대한 친화력과 분해속도가 상당히 낮았는데 이러한 현상은 일반적으로 β-galactosidase는 lactose의 aglycone moiety (glucose)을 aryl compound로 치환하였을 때 반응성이 높아진다는 사실(25, 34)과 일치한다.

효소의 분자량 : 본 효소의 분자량은 Whitaker(35)의 방법에 의해서 Sephadex G-200 gel filtration을 사용하여 측정하였을 때 Fig. 13에서 보는 바와 같이 약 520,000이었다.

또한 Weber와 Osborn(36)의 방법에 따라 sodium

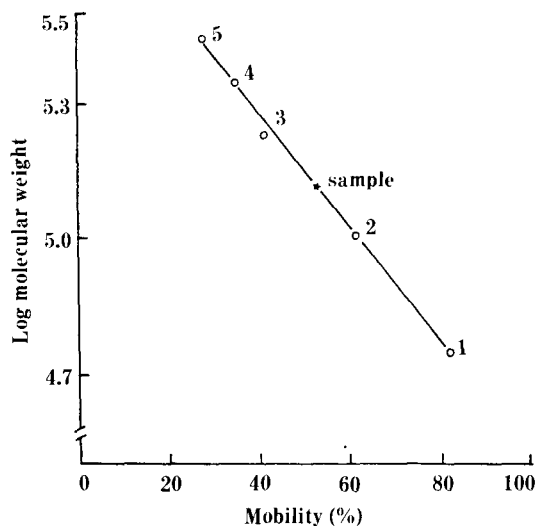


Fig. 14. Estimation of molecular weight of β-galactosidase by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
 1, monomer (M.W. 56000); 2, dimer (M.W. 112000); 3, trimer (M.W. 168000); 4, tetramer (M.W. 224000); 5, pentamer (M.W. 280000); ★, *S. thermophilus* β-galactosidase.

Table 8. Amino acid composition of β-galactosidase from *S. thermophilus* 510.

Amino acid	Ratio (%)	Content (mg/g)
Aspartic acid	10.49	109.45
Threonine	4.84	50.49
Serine	3.99	41.61
Glutamic acid	13.38	139.62
Proline	4.28	44.66
Glycine	5.04	52.60
Alanine	7.33	76.46
Cysteine	1.18	12.31
Valine	7.68	80.15
Methionine	1.88	19.63
Isoleucine	6.37	66.45
Leucine	8.37	87.30
Tyrosine	5.10	53.17
Phenylalanine	4.94	51.59
Histidine	2.10	21.93
Lysine	7.67	80.06
Arginine	5.36	55.96

dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 방법에 의해서는 Fig. 14와 같이 분자량이 약 130,000으로 나타났다. 따라서 본 효소는

native enzyme의 분자량은 520,000이고, 분자량이 130,000인 동일한 subunit 4개로 구성된 tetramer인 것으로 추측된다.

이것은 Craven 등(32)이 *E. coli*의 β -galactosidase의 분자량은 540,000이며, polypeptide chain의 분자량은 135,000으로써 4개의 동일한 subunit로 구성되어있다고 발표한 것과 같은 결과이다.

효소의 아미노산 조성: 본 효소의 아미노산 조성을 amino acid analyzer(LKB 4150 ALPHA PLUS)을 이용하여 분석한 결과가 Table 8에 나타나 있다. 본 효소의 아미노산 조성비율을 보면, glutamic acid 13.38%, aspartic acid 10.49%, leucine 8.37%, valine 7.68% 순으로 많은 양을 나타냈으며, sulfur을 함유한 아미노산인 cysteine(1.18%)과 methionine(1.88%)이 가장 적은 비율을 나타내었다. 이러한 분석 결과는 *E. coli* K-12(32), *Penicillium citrinum*(37), *Aspergillus niger*(38), *Aspergillus oryzae*(39)로부터 정제된 β -galactosidase의 아미노산 조성과 일치하였다.

요 약

Streptococcus thermophilus 510 으로부터 β -galactosidase의 생성조건은 탄소원으로 0.5% lactose를 첨가한 배지에서 초기 pH 7.0, 배양온도 37°C, 배양기간 18시간이었다. 배양여액으로부터 β -galactosidase를 ammonium sulfate 분획, 핵산의 제거, Sephadex G-200 gel filtration 및 DEAE-Sephadex A-50 ion exchange chromatography 등의 4단계 정제과정을 거쳐 정제한 결과 18배 정제되어 단일 단백질로 분리되었다. 정제효소의 활성 최적온도는 50°C, 최적 pH는 7.0이었고, 효소활성이 Mn^{2+} , K^+ 과 같은 금속이온과 dithiothreitol, 2-mercaptoethanol에 의해 촉진되었고, Hg^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} , EDTA, 8-hydroxyquinoline, galactose 등에 의해 저해되었다. 효소의 분자량이 520,000, 합성기질인 ONPG에 대한 K_m 은 1.25 mM, V_{max} 는 88.50 μ mole/min·mg protein이었고, 주종 아미노산은 glutamic acid, aspartic acid, leucine 및 valine이었다.

참고문헌

1. Rosensweig, N.S.: *J. Dairy Sci.* **52**, 585 (1969).
2. Guy, E.J., A. Tamsma, A. Kontson and V.H. Holsinger: *Food Prod. Develop.* **8**, 50 (1974).

3. Young, C.K., J.W. Stull, R.R. Taylor, R.C. Angus and T.C. Daniel: *J. Food Sci.* **45**, 805 (1980).
4. Hourigan, J.A.: *Austral. J. Dairy Technol.* **39**, 114 (1984).
5. Shukla, T.D.: *CRC Crit. Reviews Food Technol.* **5**, 325 (1975).
6. Gekas, V. and M. Lopez-Leiva: *Process Biochem.* **20**, 2 (1985).
7. Blankenship, L.C. and P.A. Wells: *J. Milk Food Technol.* **37**, 199 (1974).
8. Toba, T., Y. Tomita, T. Itoh and S. Adachi: *J. Dairy Sci.* **64**, 185 (1981).
9. Wierzbicki, L.E. and F.V. Kosikowski: *J. Dairy Sci.* **56**, 26 (1973).
10. Thomas, T.D., B.D.W. Jarvis and N.A. Skipper: *J. Bact.* **118**, 329 (1974).
11. Thomas, T.D. and V.L. Crow: *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 186 (1984).
12. Hogg, D. Mc C. and G.R. Jago: *J. Dairy Res.* **37**, 199 (1970).
13. Terzaghi, B.E. and W.E. Sandine: *Appl. Microbiol.* **29**, 807 (1975).
14. Lederberg, J.: *J. Bact.* **60**, 381 (1950).
15. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall: *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
16. Gabriel, O.: *Methods in Enzymology*. Jakoby, W.B. ed. Academic Press. N.Y. Vol. 22, 565 (1971).
17. Somkuti, G.A. and D.H. Steinberg: *J. Appl. Biochem.* **1**, 357 (1979).
18. Thomas, T.D. and V.L. Crow: *FEMS Microbiol. Letters.* **17**, 13 (1983).
19. Mahoney, R.R., T.A. Nickerson and J.R. Whitaker: *J. Dairy Sci.* **58**, 1620 (1975).
20. Layne, E.: *Methods in Enzymology*. Colowick, S.P., N.O. Kaplan, ed. Academic Press. N.Y. Vol. 3, 447 (1957).
21. Ramana Rao, M.V. and S.M. Dutta: *J. Food Sci.* **46**, 1419 (1981).
22. Greenberg, N.A. and R.R. Mahoney: *J. Food Sci.* **47**, 1824 (1982).
23. Uwajima, T., H. Yagi and O. Terada: *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 570 (1972).
24. Wendorff, W.L. and C.H. Amundson: *J. Milk Food Technol.* **34**, 300 (1971).
25. Wallenfels, K. and O.P. Malhotra: *Advances in Carbohydrate Chemistry*. Wolfrom, M.L. ed. Academic Press. N.Y. Vol. 16, 239 (1961).
26. Reithel, F.J. and J.C. Kim: *Arch. Biochem. Biophys.* **90**, 271 (1960).

27. N. de Macias, M.E., M.C. Manca de Nadra, A.M. Strasser de Saad, A. Pesce de Ruiz Holgado and G. Oliver: *Current Microbiol.* **9**, 99 (1983).
28. Singh, H.P., M.V.R. Rao and S.M. Dutta: *Milchwissenschaft.* **34**, 475 (1979).
29. Patel, G.B., C.R. Mackenzie and B.J. Agnew: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 114 (1985).
30. Kim, Y.M., J.C. Lee, Y.J. Choi and H.C. Yang: *Korean J. Appl. Microbiol. Bioengin.* **13**, 355 (1985).
31. Ulrich, J.T., G.A. McFeters and K.L. Temple: *J. Bact.* **110**, 691 (1972).
32. Craven, G.R., E. Jr. Steers and C.B. Anfinsen: *J. Biol. Chem.* **240**, 2468 (1965).
33. Lineweaver, H. and D. Burk: *J. Amer. Chem. Soc.* **56**, 658 (1934).
34. Colby, C. Jr. and A.S.L. Hu: *Biochim. Biophys. Acta.* **157**, 167 (1968).
35. Whitaker, J.R.: *Anal. Chem.* **35**, 1950 (1963).
36. Weber, K. and M. Osborn: *J. Biol. Chem.* **244**, 4406 (1969).
37. Watanabe, Y., Y. Kibesaki, S. Takenishi, K. Sakai and Y. Tsujisaka: *Agric. Biol. Chem.* **43**, 943 (1979).
38. Widmer, F. and J.L. Leuba: *European J. Biochem.* **100**, 559 (1979).
39. Tanaka, Y., A. Kagamiishi, A. Kiuchi and T. Horiuchi: *J. Biochem.* **77**, 241 (1975).

(Received November 1, 1988)