Streptomyces sp. YB-9가 생산하는 균체외 β-galactosidase의 특성

이경섭 · 김창진[1] · 윤기홍*

우송대학교 식품생명과학부, [1]한국생명공학연구원

(2003년 8월 29일 접수, 2003년 10월 13일 수리)

토양으로부터 lactose의 가수분해를 촉매하는 균체외 β-galactosidase를 생산하는 YB-9가 분리되었다. 분리균 YB-9는 분리균의 배양, 형태, 생리적 특성을 조사한 결과 *Streptomyces*속 균주로 동정되었다. 분리균의 배양상등액을 ammonium sulfate(15~70%)로 처리하고 투석하여 부분정제된 β-galactosidase를 *para*-nitrophenyl-β-D-galacto-pyranoside(pNP-βGal)와 lactose를 기질로 하여 반응특성을 분석하기 위해 조효소액으로 사용하였다. β-Galactosidase는 pH 6.0~6.5와 60°C에서 최대활성을 보였다. pNP-βGal과 lactose에 대한 β-galactosidase의 가수분해 활성은 galactose에 의해 감소되었다. Lactose에 대한 가수분해 활성은 glucose에 의해 미미하게 감소하였으나, glucose에 의해 pNP-βGal에 대한 활성은 1.3배 증가하였다. 특히, xylose에 의한 lactose의 가수분해 활성에는 영향이 없었고, pNP-βGal에 대한 활성은 1.6배 증가시켰다.

Key words: *Streptomyces*, 동정, β-galactosidase, 반응특성

서 론

β-Galactosidase(β-D-galactoside galactohydrolase)는 유당과 같은 β-D-galactopyranosides에서 비환원 말단 β-D-galactose를 가수분해하거나 galactose의 전이반응을 촉매하는 특성을 지니고 있으며, 아미노산 잔기의 배열에 따라 glycosyl hydrolase의 1, 2, 35, 42 family로 구분된다. 각 family내에 속하는 β-galactosidases 사이에 기질 특이성의 유사도가 높지 않으며, 기질 특이성을 기준으로 β-galactosidase를 구분하기는 어려운 상태이다. β-Galactosidase의 가수분해 활성은 유제품의 유당을 가수분해하여 유당 불내증을 막아주고 감미도를 높이는데 이용되며, 당 전이 활성은 인간의 장내 유용미생물인 bifidobacteria의 성장을 증진시키는 갈락토올리고당의 제조에 이용된다.

식품산업에 사용되는 β-galactosidase는 주로 *Kluyveromyces lactis*와 *Aspergillus niger*에서 생산되는 효소가 사용되지만 열안정성이 낮아 고온처리 공정에서 사용할 때는 실활되는 문제점이 있으며, 최근에는 내열성 β-galactosidase를 생산하는 중온성 효모인 *Sterigmatomyces elviae* CBS8119[1]가 보고되었다. 비피더스균과 유산균의 경우 이들이 생산하는 β-galactosidase의 가수분해 활성이나 당 전이 활성을 개선할 경우 이들 미생물을 생균제와 발효유 제품의 제조에 이용하는데 그 유용성을 높일 수 있다. 따라서 *Bifidobacterium breve*, *B. bifidum*과 *B. longum* 및 장내에서 분리된 많은 종류의 bifidobacteria[2]와 *Lactobacillus*속, *Lactococcus*속, *Streptococcus*속, *Pediococcus* 속에 속하는 여러 유산균들이 생산하는 β-galactosidase의 특성이 밝혀졌으며,[3] 최근에 유산균으로 분류된 *Carnobacterium piscicola*[4]도 β-galactosidase가 보고되었다. 한 종류 이상의 β-galactosidases가 동일한 균주에서 생산되는 경우가 많아 *Bifidobacterium infantis* HL96[5]에서 3종류, *B. adolescentis*[6]에서 2종류, *Bacillus stearothermophilus*[7]에서 3종류의 β-galactosidase가 각각 밝혀졌으며, 이들은 동일한 균종에서 생산된 효소라 할지라도 당 전이반응의 특이성과 반응속도에 차이가 큰 것으로 확인되었다. 갈락토올리고당의 생산을 위해 당 전이반응의 특이성과 반응특성이 다른 β-galactosidase에 대한 연구도 *Pyrococcus woesei*,[8] *Sulfolobus solfataricus*,[9] *Sterigmatomyces elviae*,[1] *Thermotoga maritima*[10] 등의 균주에서 진행되었다.

한편 galactosidase를 생산하는 *Streptomyces*속 균주로 α-galactosidase 생산균인 *S. erythrus*[11]와 *Streptomyces* sp.[12] 및 β-galactosidase 생산균인 *Streptomyces* sp.[13]이 보고되었다. 본 연구에서는 최근에 보고된 *Streptomyces* sp. YB-10의 효소와 반응특성이 다른 β-galactosidase를 생산하는 *Streptomyces* sp.를 분리하고 동정하였으며, 분리균으로부터 생산된 효소의 반응특성을 조사하였다.

재료 및 방법

β-Galactosidase 생산균의 탐색. 생리식염수를 사용하여 제조한 토양시료 현탁액을 방선균 분리용 humic acid vitamin 평판배지(humic acid 1.0 g/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05 g/l, Na_2HPO_4 0.5 g/l, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g/l, $CaCO_3$ 0.02 g/l, KCl 1.7 g/l, thiamine-HCl 0.5 mg/l, riboflavin 0.5 mg/l, niacin 0.5 mg/l, inositol 0.5 mg/l, pyridoxin-HCl 0.5 mg/l, Ca-pantothenate 0.5 mg/l, biotin 0.25 mg/l, aminobenzoic acid 0.5 mg/l, cycloheximide 50 mg/l, nalidixic acid 50 mg/l, agar 18 g/l, pH 7.2)에 도말한 후 28°C에서 7일간 배양하여 방선균을 분리하였

*연락저자
Phone: 82-42-630-9742; Fax: 82-42-636-2676
E-mail: ykh@lion.woosong.ac.kr

다. 평판배지에서 형성된 서로 다른 콜로니를 방선균 배양용 G.S.S 배지(soluble starch 10 g/l, K_2HPO_4 0.25 g/l, soybean meal 25 g/l, beef extract 1 g/l, yeast extract 4 g/l, NaCl 2 g/l, glucose 20 g/l, $CaCO_3$ 2 g/l, pH 7.2)에 접종하고 28°C에서 5일간 진탕 배양한 후 원심분리하여 얻은 배양상등액의 β-galactosidase 활성을 측정함으로써 β-galactosidase를 생산하는 방선균을 탐색하였다.

분리균주 동정. 분리균주의 동정은 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology와 International Streptomyces Project (ISP) 방법[14]에 준하여 실시하였다. 배양 특성의 조사는 ISP 방법에 따라 ISP 평판배지(Difco, USA) No. 2, 3, 4, 5, 7과 glucose asparagine 평판배지 및 Bennett 평판배지에 접종한 후 28°C에서 7일, 14일, 21일 간격으로 기균사의 색깔, 배면색깔, 배지색깔, 생육정도, 가용성 색소 생성 유무 및 멜라닌 색소 생성 유무를 관찰하였다. 탄소원 이용성은 glucose, arabinose, xylose, rhamnose, fructose, sucrose, inositol, mannitol, raffinose 등을 부가 탄소원으로 첨가한 Bennett 평판배지에서 배양한 후 성장 정도를 비교하여 결정하였다. 분리균주의 형태적 특성은 포자의 사슬형태, 표면상태, 포자형성능 등을 관찰을 통해 실시하였으며 포자형성능은 oatmeal 평판배지를 이용하여 28°C에서 21일간 배양한 후 조사하였다.

β-Galactosidase 조효소액 제조. 분리균을 G.S.S 배지에 접종하여 28°C에서 5일 동안 진탕 배양한 후 원심분리하여 배양상등액을 얻었다. 배양상등액에 15% (w/v) ammonium sulfate를 처리한 후 12,000 rpm에서 30분 동안 원심분리하여 상등액을 모아 ammonium sulfate의 최종농도를 70%가 되도록 첨가하였다. 그리고 동일한 조건에서 원심분리한 후 침전물을 취하여 20 mM 인산 완충용액(pH 6.0)에 녹이고 동일 용액에 투석하여 조효소액을 제조하였다.

β-Galactosidase 활성 측정. 1 mM p-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside(pNP-βGal)와 50 mM sodium phosphate 완충용액(pH 6.0)를 포함한 반응액에 효소를 첨가하여 45°C에서 10분간 반응시킨 후 반응액의 2배 부피의 1 M Na_2CO_3 용액을 첨가하여 반응을 종결시키고 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소의 활성도는 1분 동안 1 μmole의 *para*-nitrophenol을 유리시키는 효소양을 1 unit로 정의하였다.

β-Galactosidase 활성에 미치는 온도와 pH의 영향. β-Galactosidase 활성에 미치는 반응 온도의 영향을 조사하기 위하여 30~80°C까지의 온도에서 각각 β-galactosidase 활성을 측정하였으며, 활성에 미치는 pH의 영향을 알아보기 위해서는 pH 4.0에서 pH 8.0까지의 범위에서 β-galactosidase 활성을 각각 측정하였다. 이때 pH 4.0~6.0의 범위에서는 citrate 완충용액, pH 6.0~8.0에서는 phosphate 완충용액을 각각 사용하였다. β-Galactosidase의 열안정성을 조사하기 위하여 효소 용액을 각각의 온도에서 일정시간 방치한 후 잔존활성을 측정하였다.

β-Galactosidase 활성에 미치는 당의 영향. β-Galactosidase 활성에 미치는 당의 영향을 분석하기 위하여, pNP-βGal을 기질로 사용한 반응액에 xylose, glucose, mannose, galactose를 각각 농도를 달리 첨가하여 반응을 수행한 후 활성을 측정하였다.

반응산물 분석. Lactose를 반응기질로 하여 60°C, pH 6.0에서 효소반응을 수행한 후에 반응액을 3분 동안 95°C에서 열처리한 후 원심분리하여 단백질 침전물을 제거하고 상등액을 적정량 취해 chloroform, acetic acid와 증류수(4.3 : 5 : 0.7, v/v)의 혼합용액을 전개용액으로 하여 silica gel-precoated thin layer plate(Merck Kiesegel, No. 5748)에서 박층 크로마토그래피를 수행하였다. 전개된 물질은 ethanol, *p*-anisaldehyde와 sulfuric acid(9 : 0.5 : 0.5, v/v)를 혼합한 발색제 용액을 뿌린 후, 120°C에서 5~10분간 방치 후 관찰하였다.

Fig. 1. Scanning electron microscopic photogram (1.19×10^4) of the isolate YB-9 grown on oatmeal agar medium for 21 days.

결과 및 고찰

β-Galactosidase 생산균주의 분리와 동정. Humic acid vitamin 평판배지를 이용하여 순수 분리한 방선균을 G.S.S 복합 액체배지에 접종하여 28°C에서 5일간 진탕 배양한 후 pNP-βGal을 기질로 하여 배양상등액에 존재하는 β-galactosidase의 활성을 측정함으로써 β-galactosidase를 생산하는 방선균을 탐색하였다. 이들 중 lactose의 분해능이 있으며 β-galactosidase의 생산성이 높은 균주를 최종적으로 선발하여 YB-9로 명명하였다.

선발된 YB-9의 형태적 특성을 조사한 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 포자의 표면은 매끄럽고 실린더형이며 그 크기는 0.5~0.8×0.8~1.0 μm이다. 포자는 15~40개 이상이 연결되어 나선형사슬 구조를 이루는 것으로 확인되었다. YB-9의 배양학적 특성을 확인하기 위해 ISP 배지를 포함한 8종의 평판배지에서 5~15일 동안 배양하여 균의 성장, 기균사의 색깔, 배면의 색깔, 수용성의 색소생성 등을 관찰한 결과 Table 1과 같이 대부분의 배지에서 균의 성장이 양호하였으며, 콜로니 표면의 색깔은 주로 회색이고 콜로니 배면은 주로 갈색과 노란색을 보이는 것으로 확인되었다.

선발된 YB-9 균주의 생리화학적 특성을 관찰한 결과 Table 2에서 보인 바와 같이 전분의 가수분해능을 보였으며, melanoid 색소를 생성하지 않았다. 또한 당 이용성을 확인하기 위해 각종 당류를 1%가 되도록 첨가한 배지와 이를 첨가하지 않은 배지에서 분리균의 성장정도를 비교한 결과 YB-9는 D-glucose, L-arabinose, D-mannitol, D-fructose를 탄소원으로 잘 이용하였

Table 1. Cultural characteristics of *Streptomyces* sp. YB-9

Media	Growth	Aerial mycelium color	Reverside color	Soluble pigment
Yeast extract-malt extract agar (ISP No. 2)	Good	Whitish gray	Brownish pink	None
Oatmeal agar (ISP No. 3)	Good	Whitish gray	Yellowish brown	None
Inorganic salt-starch agar (ISP No. 4)	Good	Gray	Brown	None
Glycerol-asparagine agar (ISP No. 5)	Good	Gray	Brown	None
Peptone-yeast extract-iron agar (ISP No. 6)	Good	Whitie	Yellowish brown	None
Tyrosine agar (ISP No. 7)	Good	Gray	Brown	None
Glucose-asparagine agar	Good	Gray	Pale yellow	None
Bennett's agar	Good	Gray	Pale yellow	None

Table 2. Physiological characteristics of *Streptomyces* sp. YB-9

Unit character	Description	Unit character	Description
Melanoid pigment	-	Carbohydrate utilization	
Soluble pigment	-	D-Glucose	+
Coagulation of milk	+	L-Arabinose	+
Peptonization of milk	-	D-Xylose	±
Hydrolysis of starch	+	Inositol	±
		D-Mannitol	+
Cell chemistry		D-Fructose	+
Diaminopimelic acid	*LL* type	L-Rhamnose	-
		Sucrose	-
		Raffinose	±

+, positive; -, negative; ±, faint positive

고, D-xylose, inositol과 raffinose의 이용성은 우수하지 못하였으며 L-rhamnose와 sucrose는 이용하지 못하는 것으로 나타났다. 따라서 분리균 YB-9는 β-galactosidase의 생산균 *Streptomyces* sp. YB-10[13]과는 sucrose와 mannitol의 이용성 측면에서 차이가 있는 것으로 확인되었다.

한편 분리균의 세포벽에 존재하는 diaminopiemelic acid의 형태를 TLC를 통해 분석한 결과, YB-9는 *LL*형의 diaminopiemelic acid를 지니고 있어 *Streptomyces* 속에 속하는 것으로 판단된다.

β-Galactosidase의 반응 특성. Bennett 배지와 G.S.S 배지를 사용하여 28°C, 200 rpm의 조건으로 baffled flask에서 *Streptomyces* sp. YB-9를 진탕 배양하면서 배양상등액에 존재하는 β-galactosidase의 활성을 측정한 결과 Bennett 배지에서는 β-galactosidase가 거의 생산되지 않았으며, G.S.S 배지에서는 배양 5일째에 균체외 효소 생산성이 급격히 향상되어 최대에 이르는 것으로 나타났다(결과 미제시). β-Galactosidase는 대부분의 미생물에서 균체내 효소로 존재하는데 *Bacillus* sp.,[15] *Paecilomyces varioti*,[16] *Streptomyces* sp.[13] 등에서는 균체외로 분비되는 것으로 알려져 있다. 또한, *Corynebacterium murisepticum*[17]는 galactose와 lactose에 의해 β-galactosidase의 생합성이 유도되는 반면에 *Lactobacillus crispatus*[18]는 galactose에 의해 효소 생합성이 유도되지만 lactose에 의해서는 저해되는 것으로 보고되었다. *Streptomyces* sp. YB-9의 효소 생산에 미치는 탄소원의 영향을 구체적으로 조사하지는 않았지만, glucose를 함유한 G.S.S 배지에서 β-galactosidase가 생산되는 것으로 보아 glucose에 의해 효소 생합성이 크게 저해 받지 않을 것으로 예상된다.

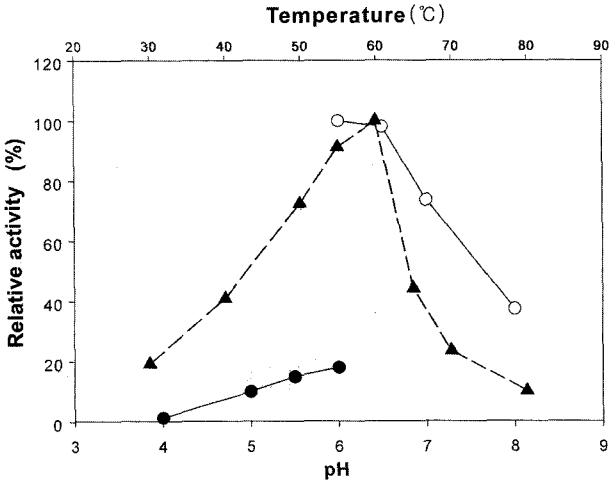

Fig. 2. Effects of reaction temperature and pH on the β-galactosidase activity. Temperature profile (-▲-) was obtained by measuring the β-galactosidase activities at pH 6.0 and different temperatures. The reactions was done at 60°C and various pHs for determining the pH profile. The following buffer systems were used: pH 4.0 to 6.0 (-●-), 50 mM citrate; pH 6.0 to 8.0 (-○-), 50 mM sodium phosphate.

Streptomyces sp. YB-9가 균체외로 분비 생산하는 β-galactosidase의 반응특성을 조사하기 위해 G.S.S 배지에서 5 일간 배양하여 얻은 배양상등액을 15~70% ammonium sulfate로 분획하여 β-galactosidase의 조효소액으로 사용하였다. pNP-βGal을 기질로 사용하여 반응온도와 pH를 달리하면서 β-galactosidase 활성을 측정함으로써 반응온도와 pH가 β-galactosidase의 활성에 미치는 영향을 조사한 결과, Fig. 2에서

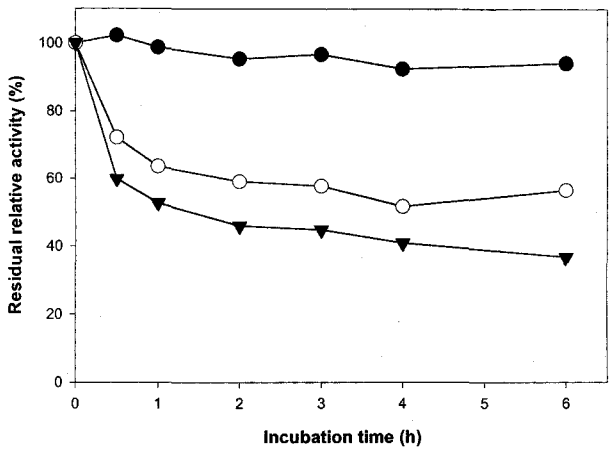

Fig. 3. Thermostability of β-galactosidase. The residual actvity was measured at various times after incubation at 40°C (-●-), 50°C (-○-) and 55°C (-▼-) with a fixed pH 6.0.

나타낸 바와 같이 60°C와 pH 6.0~6.5에서 최대 활성을 보였으며, YB-9의 β-galactosidase는 YB-10의 효소와 동일하게 구연산 완충용액을 사용하였을 때보다 phosphate 완충용액을 사용하였을 때 활성이 훨씬 높은 것으로 확인되었다. 남극에서 분리된 저온균인 *Planococcus* sp.[19]에서 생산된 효소의 최적반응 온도는 40°C이고, *Bacteroides polypragmatus*[20]는 45°C, *B. circulans*[21]는 45°C와 60°C의 최적반응 온도를 보이는 효소를 각각 생산하는 것으로 보고되었다.

열안정성을 조사하기 위해 30~60°C 범위에서 30분간 각각 열처리한 후 효소의 잔존활성을 측정한 결과, 40°C까지는 안정하였으나 60°C에서 활성이 급격히 저하되어 약 5% 이하의 활성만이 존재하였다(결과 미제시). 40~55°C에서 방치시간에 따라 잔존 β-galactosidase를 조사한 결과 Fig. 3에 보인 바와 같이 40°C에서는 실활되지 않았으며, 50°C에서는 6시간 방치 후에도 약 60% 정도의 활성을 유지하였다. 이로보아 50°C에서 6시간 후에 약 20% 정도의 활성이 남아 있는 YB-10의 효소보다는 열안정성이 높은 것으로 확인되었다. 한편 pH에 대한 안정성을 조사하기 위해 구연산 완충용액(pH 3.0~6.0), 인산 완충용액(pH 6.0~8.0)과 붕산 완충용액(pH 8.0~10.0)에 일정시간 방치한 후 잔존 효소활성을 측정한 결과 pH 6.0~10.0에서는 12시간 방치 후에도 약 80%이상의 활성이 유지되었으나, 구연산 완충용액(pH 3.0~6.0)에서는 30분 동안만 방치하였을 때도 급격히 실활되었는데 이는 pH에 의한 영향이라기 보다는 구연산 완충용액에서 불안정한 때문으로 판단된다(결과 미제시).

반응산물의 분석. *Streptomyces* sp. YB-9의 β-galactosidase가 β-1,4 결합으로 연결된 말단 galactosyl group을 함유한 당을 가수분해하는지 조사하기 위해 lactose를 기질로 하여 반응한 후 반응산물을 분석한 결과 galactose와 glucose로 분해되는 것으로 확인되었다. *Streptomyces* sp. YB-9의 β-galactosidase가 lactose 분해에 있어 당의 영향을 분석하기 위해 반응액에 galactose, mannose, xylose와 glucose를 각각 200 mM을 첨가하거나 이를 첨가하지 않은 반응액의 반응산물을 TLC로 분석한 결과 부가당을 첨가하지 않은 반응액에서는 lactose가 대부분 가수분해 되었으며, xylose를 첨가하였을 때도 이를 첨가하지 않았을 때와 유사한 정도로 lactose가 대부분 가수분해되었다. 그러나 galactose를 첨가하여 반응하였을 때는 대부분의 lactose가 가수분해되지 않았으며, mannose나 glucose를 첨가하였을 때도 이를 첨가하지 않았을 때 보다 lactose의 가수분해 정도가 낮아진 것으로 확인되었다(Fig. 4A). 이로 보아 xylose는 β-galactosidase의 lactose 가수분해 활성에 영향을 미치지 않지만, galactose, glucose, mannose는 가수분해 활성을 저해하는 것을 알 수 있으며, 특히 galactose에 의한 저해정도가 가장 높다고 여겨진다.

한편, β-galactosidase의 lactose 가수분해 활성을 저해하지 않는 것으로 확인된 xylose를 반응액에 농도를 달리하여 첨가한 후 lactose 분해활성에 미치는 영향을 검토한 결과, Fig. 4B에 나타난 바와 같이 반응액에 첨가된 xylose의 양과는 관계없이 xylose를 첨가하지 않았을 때와 유사한 정도의 lactose 가수분해 활성을 보였다.

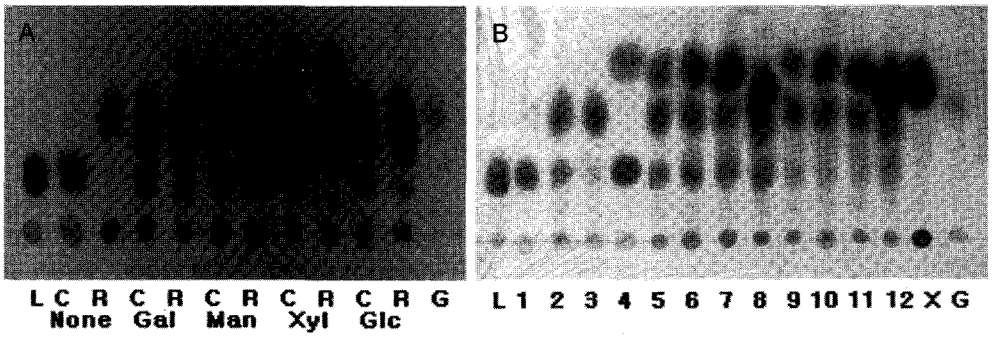

Fig. 4. Thin-layer chromatograms of hydrolysis products of lactose with the β-galactosidase. In panel A, reactions were done with 200 mM concentrations of various sugars including galactose (Gal), mannose (Man), xylose (Xyl) and glucose (Glc) or without them (None) for 2 h at 60°C, respectively. Reaction products were analyzed from reaction mixtures before reaction (C) and after reaction (R). In panel B, reaction was done for various times at 60°C. In panel B, reactions were done with various concentrations of xylose (lanes 4~12) or no additional sugar (lanes 1~3) for 30 min (lanes 2, 5, 6, 7 and 8) and 60 min (3, 9, 10, 11 and 12) at 60°C, respectively. Concentrations of xylose added to reaction mixture are 50 mM (lanes 5 and 9), 100 mM (lanes 4, 6 and 10), 200 mM (lanes 7 and 11), 400 mM (lanes 8 and 12). Lanes 1 and 4 are corresponding to reaction mixture supplemented with no additional sugar, and xylose, respectively, before β-galactosidase reaction. Authentic sugar abbreviations are as follows: L, lactose; X, xylose; G, galactose.

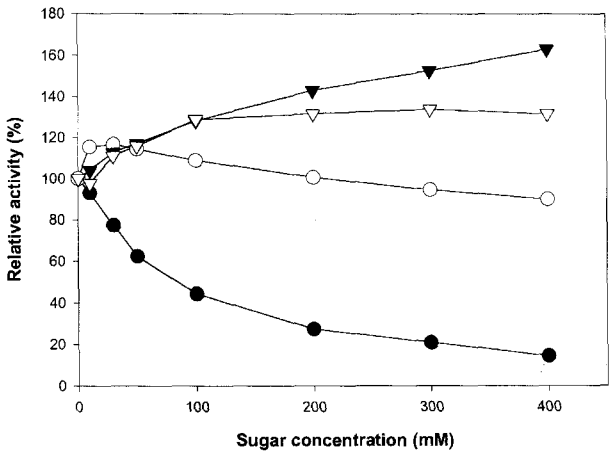

Fig. 5. Effects of sugar on the β-galactosidase activity. The relative activity was determined by measuring β-galactosidase activity for pNP-βGal (1 mM) in the presence of various concentrations of sugars including xylose (-▼-), glucose (-▽-), mannose (-○-), and galactose (-●-), respectively.

β-Galactosidase 활성에 미치는 첨가당의 영향. *Streptomyces* sp. YB-10의 β-galactosidase는 반응액에 존재하는 당에 의해 pNP-βGal와 lactose의 가수분해 활성이 다른 것으로 밝혀졌으며, *B. infantis* HL96의 β-galactosidase는 *o*-nitrophenyl-β-D-galactoside를 기질로 하였을 때 10 mM 농도의 glucose나 galactose에 의해 효소 활성이 저해되지 않는 것으로 보고되었다.[5] 또한, 대장균의 효소도 galactose에 의해 저해를 받지만, aminogalactose에 의한 저해정도가 더 큰 것으로 알려졌다.[22]

따라서 YB-9 균주로부터 생산된 β-galactosidase의 pNP-βGal 가수분해 활성에 미치는 영향을 lactose의 것과 비교하기 위해 xylose, glucose, mannose와 galactose의 농도를 달리하여 첨가한 후 효소 반응을 실시하였다. 그 결과 Fig. 5에 나타낸 바와 같이 galactose에 의해서만 가수분해 활성이 저해되었으며, glucose와 xylose의 존재하에서는 가수분해 활성이 증가하였고, mannose는 가수분해 활성에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. Galactose의 경우 50 mM이 존재하면 약 40%의 활성이 저해되었으며, 300 mM 이상이 존재하면 약 80% 정도의 활성이 저해되었다. Glucose의 경우 10~100 mM 범위의 농도로 첨가하였을 때는 glucsoe의 첨가량이 많아질수록 pNP-βGal의 가수분해능이 서서히 증가하였으며, 100 mM 이상에서는 약 130% 정도의 가수분해 활성을 유지하는 것으로 나타났다. 특히 xylose는 400 mM까지 첨가량을 증가시킴에 따라 가수분해 활성이 계속 증가하여 400 mM에서 약 160%의 가수분해 활성능을 보였다.

이러한 결과로 보아 YB-9의 β-galactosidase는 YB-10의 효소와 유사함을 보이지만, glucose에 의한 pNP-βGal 가수분해 활성의 증가정도가 400 mM의 glucose의 존재하에서 가수분해 활성이 180% 정도 증가된 YB-10의 효소보다 낮은 것으로 확인되어 *Streptomyces*속의 균주들로부터 반응특성이 다른 다양한 β-galactosidase의 탐색이 가능할 것으로 판단된다.

참고문헌

1. Onishi, N. and Tanaka, T. (1995) Purification and properties of a novel thermostable galacto-oligosaccharide-producing beta-galactosidase from *Sterigmatomyces elviae* CBS8119. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 4026-4030.
2. Smart, J. B., Pillidge, C. J. and Garman, J. H. (1993) Growth of lactic acid bacteria and bifidobacteria on lactose and lactose-related mono-, di- and tirsaccharides and correlation with distribution of beta-galactosidase and phospho-beta-galactosidase. *J. Dairy Res.* **60**, 16-22.
3. Garman, J., Coolbear, T. and Smart, J. (1996) The effect of cations on the hydrolysis of lactose and the transferase reactions catalysed by beta-galactosidase from six strains of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **46**, 22-27.
4. Jonna, C. and Jean, E. B. (2001) Characterization of two new glycosyl hydrolases from the lactic acid bacterium *Carnobacterium piscicola* strain BA. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 5094-5099.
5. Hung, M. N. and Lee, B. H. (2002) Purification and characterization of a recombinant β-galactosidase with transgalactosylation activity from *Bifidobacterium infantis* HL96. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58**, 439-445.
6. Yanahira, S., Yabe, Y., Nakakoshi, M., Miura, S., Matsubara, N. and Ishikawa, H. (1998) Structures of novel acidic galactooligosaccharides synthesized by *Bacillus circulans* beta-galactosidase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 1791-1794.
7. Haruhosa, H., Seiji, N. and Hirosuke, O. (1984) Molecular basis of isozyme formation of β-galactosidases in *Bacillus stearothermophilus*: isolation of two β-galactosidase genes, *bga*A and *bga*B. *J. Bacteriol.* **160**, 9-14.
8. Dabrowski, S., Maciunska, J. and Synowiecki, J. (1998) Cloning and nucleotide sequence of the thermostable beta-galactosidase gene from *Pyrococcus woesei* in *Escherichia coli* and some properties the isolated enzyme. *Mol. Biotechnol.* **10**, 217-222.
9. Pisani, F. M., Rella, R., Raia, C. A., Rozzo, C., Nucci, R., Gambacorta, A., Rosa, M. and Rossi, M. (1990) Thermostable beta-galactosidase from the archaebacterium *Sulfolobus solfataricus*. Purification and properties. *Eur. J. Biochem. 187*, 321-328.
10. Gabelsberger, J., Liebl, W. and Schleifer, H. (1993) Purification and properties of recombinant beta-galactosidase of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**, 44-52.
11. Elshafei, A. M., Foda, M. S., Abdel-Mobde, E. and Ali, N. H. (2001) Optimization of α-galactosidase production in *Streptomyces erythrus*. *Acta Microbiol. Pol.* **50**, 53-63.
12. Kim, S. -Y., Cho, K. H., Kim, C. -J., Park, D. -J. and Yoon, K. -H. (2003) Characterization of extracellular α-galactosidase produced by *Streptomyces* sp. YB-4. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 332-338.
13. Lee, K. S., Kim, C. -J. and Yoon, K. -H. (2003)

Characterization of the β-galactosidase produced by *Streptomyces* sp. YB-10. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 151-156.
14. Williams, S. T., Goodfellow, M., Alderson, G., Wellington, E. M. H., Sneath, P. H. A. and Sackin, M. (1983) Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *J. Gen. Microbiol.* **129**, 1743-1813.
15. Sani, R. K., Chakraborti, S., Sobti, R. C., Patnaik, P. R. and Banerjee, U. C. (1999) Characterization and some reaction-engineering aspects of thermostable extracellular beta-galactosidase from a new *Bacillus* species. *Folia Microbiol (Praha).* **44**, 367-371.
16. Carherine, T. K., Mary, R. O. and William, M. F. (1988) A novel thermostable extracellular β-galactosidase of *Paecilomyces varioti. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 383-388.
17. Priyolkar, M., Nair, C. K. and Pradhan, D. S. (1989) Purification and characterisation of an inducible beta-galactosidase from *Corynebacterium murisepticum. Arch. Microbiol.* **151**, 49-53.
18. Kim, J. W. and Rajagopal, S. N. (2000) Isolation and characterization of beta-galactosidase from *Lactobacillus crispatus. Folia Microbiol (Praha).* **45**, 29-34.
19. Peter, P. S. and Jean, E. B. (2000) Characterization of a salt-tolerant family 42 β-galactosidase from a psychrophilic antarctic *Planococcus* isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2438-2444.
20. Patel, G. B., Mackenzie, C. R. and Agnew, B. J. (1985) Properties potential advatages of β-galactosidase from *Bacteroides polypramatus. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 114-120.
21. Vetere, A. and Paikettim S. (1998) Separation and characterization of three β-galactosidases from *Bacillus circulalns. Biochim. Biophys. Acta.* **1380**, 223-231.
22. Huber, R. E. and Gaunt, M. T. (1982) The inhibition of beta-galactosidase (*Escherichia coli*) by amino sugars and amino alcohols. *Can. J. Biochem.* **60**, 608-612.

Characterization of the Extracellular β-Galactosidase Produced from *Streptomyces* sp. YB-9

Kyung-Seop Lee, Chang-Jin Kim[1] and Ki-Hong Yoon* (*School of Food Science and Biotechnology, Woosong University, Daejeon 300-718, Korea,* [1]*Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Yusong, Daejeon 305-600, Korea*)

Abstract: A strain YB-9 was isolated from soil as a producer of the extracellular β-D-galactosidase, which catalyzes the hydrolysis of lactose. The strain YB-9 was identified as *Streptomyces* sp. on the basis of its cultural, morphological and physiological properties. After treating culture supernatant of the isolate with ammonium sulfate (15~70%), the precipitated protein was used as a crude β-galactosidase for analyzing its reaction properties with *para*-nitrophenyl-β-D-galactoside (pNP-βGal) and lactose as substrates. The β-galactosidase showed its maximal activity at pH 6.0~6.5 and 60°C. The hydrolyzing activity of β-galactosidase for both pNP-βGal and lactose was decreased by galactose. Its hydrolyzing activity for lactose was slightly decreased by glucose, but the activity for pNP-βGal was increased to 1.3-folds by glucose. Especially, its hydrolyzing activity was not affected for lactose and was increased to 1.6-folds for pNP-βGal by xylose.

Key words: *Streptomyces*, identification, β-galactosidase, reaction property
*Corresponding author