

## *Pantoea* spp.에서 분리한 호냉성 $\beta$ -Galactosidase의 생화학적 특성 및 우유 내 유당분해 활성

최재원\* · 이승배 · 최석호

상지대학교 생명공학과

### 서 론

$\beta$ -Galactosidase는 자연계에 널리 존재하는 효소로 동식물 및 미생물로부터 분리, 정제 및 효소의 생화학적 특성과 이용에 관련된 연구가 많이 보고되어 있다.<sup>(1,2,3,4)</sup>

$\beta$ -Galactosidase는 우유 내에 존재하는 유당을 가수분해하여 glucose와 galactose로 분해하는 효소로 우유를 마셨을 때 일어나는 유당소화장애를 해결할 수 있는 중요한 효소이다.<sup>(5)</sup> 유당 소화 장애는 동양인의 경우 86~100%로 보고하고 있다<sup>(6)</sup>.

본 연구는 유당소화장애에 유용하게 이용할 수 있는  $\beta$ -Galactosidase를 국내의 토양에서 분리한 *Pantoea* spp.로 부터 분리하였고 효소의 생화학적 특성과 우유에서의 유당분해능력을 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 가. *Pantoea* spp.의 분리

저온성  $\beta$ -Galactosidase를 생산하는 호냉성 세균으로서 겨울철 고지대 토양으로부터 분리 동정한 *Pantoea* spp.을 사용하였다.

#### 1) 토양시료

강원도 발왕산 정상에서 부식토양을 채취하여 4℃로 온도를 유지시켜 실험실로 운반하였다.

#### 2) 미생물의 분리 및 선발

2%유당 용액을 토양에 섞으면서 분무하여 7℃에 보관해 두었다가 50mg/mlX-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside)을 포함한 Tryptic soy agar에 접종하여 5℃에 배양하여 청색 집락을 형성하는 세균을 분리하였다.

#### 나. *Pantoea* spp.의 동정

분리된 청색 집락을 Tryptic soy agar에서 37℃에서 하룻밤 배양하여 API 20E kit (bioMerieux sa)를 사용하여 동정하였다.

#### 다. 세균 추출액의 제조

*Pantoea* spp.를 유당이 포함된 Tryptic soy agar(7ℓ)에 1% 접종하여 15℃에서 배양한 후 배양액을 원심 분리(3,000rpm, 30분)하여 균체를 모아 PBS로 세척하였다. 0.067M Sodium phosphate 에 분산하여 초음파 분쇄기(Sonics & Material Inc, Vibra Cell)를 이용하여 분쇄하고 원심분리(10,000rpm, 20분)하여 상등액을 사용하였다.

#### 라. Chromatography

세균 추출액에서 β-Galactosidase를 분리하기 위해 DEAE-Sephacel(SIGMA)을 이용하여 이온교환 chromatography를 실시하였으며 다음으로 p-aminobenzyl-1-thio-β-galactopyranoside가 결합되어 있는 agarose를 이용하여 affinity chromatography를 실시하였다.

#### 마. 효소활력측정

β-Galactosidase의 활성은 ONPG(O-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside)을 가수분해하여 생성된 o-nitrophenol의 흡광도(420nm)를 측정하여 효소활력을 결정하였다.

각 분획의 시료를 반응액(0.1M MgCl<sub>2</sub>, 4.5M β-mercaptoethanol, 4mg/mlONPG 0.1M Sodium phosphate pH 7.5)에 혼합하여 30℃에서 30분간 반응시킨 후 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>용액을 넣어 반응을 중단시킨 후 420nm의 흡광도를 측정하였다.

#### 바. SDS-PAGE

세균 추출물을 10% SDS-polyacrylamide gel에서 50V로 전기영동을 하였으며 Comassie Blue R-250으로 염색하였다.

## 결과 및 고찰

겨울철 토양에서 β-Galactosidase를 생산하는 균주를 분리하였으며 그람 염색과 API 20E kit로 동정한 결과 그람음성 간균이고 *Pantoea* spp. 로 확인되었다. *Pantoea* spp. 균주의 세포 추출물로부터 DEAE-Sephacel chromatography와 affinity chromatography를 이용하여 β-Galactosidase를 분리하였다(Fig. 1).

그 결과 세포 추출물에 비해 28.5배의 순수 분리율을 달성하였고, ONPG가수분해 활성은 30℃에서 156.8μmol/min·mg이었다(Table 1).

β-Galactosidase의 반응 최적 온도는 45℃이고 최적 pH는 5.5~7.5이었다.

β-Galactosidase의 열안정성을 조사한 결과 45℃이상의 온도에서 불활성되는 것으로 나타났다(Fig. 2).

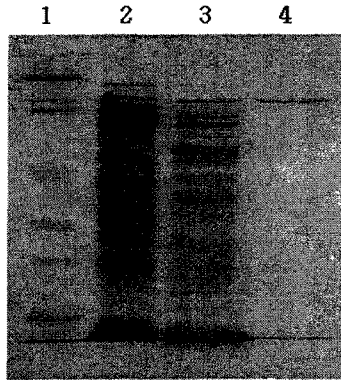


Fig 1. SDS-PAGE of *Pantoea* spp. cell extract and  $\beta$ -Galactosidase fraction.

1. Molecular weight marker protein
2. Cell extract.
3. DEAE-Sphacel chromatography
4. Affinity chromatography.

Table 1.  $\beta$ -Galactosidase activity of cell extract and chromatography fraction from *Pantoea* spp.

	Vol (ml)	Total protein (mg)	Total activity ( $\mu$ mol/min)	Specific activity ( $\mu$ mol/min-mg)	Recovery (%)	Purification (fold)
Cell extract	60	76.7	421.9	5.5	100	1.0
DEAE-Sephacel chromatography	28	16.9	280.5	16.6	66	3.0
Affinity chromatography	15	0.5	78.4	156.8	19	28.5

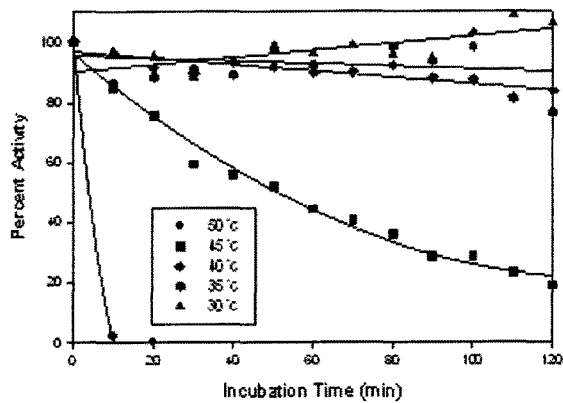


Fig 2. *Pantoea* spp.로부터 분리한  $\beta$ -Galactosidase의 열안정성

다른  $\beta$ -Galactosidase와의 우유 내 유당분해능력을 비교한 결과 *Pantoea* spp.에서 분리된  $\beta$ -Galactosidase는 대장균의 효소보다 활력이 높았으나 *Kluyveromyces lactis* 효소보다 상대적으로 낮았다(Table 2).

Table. 2 Lactose hydrolyzing activity of  $\beta$ -Galactosidase in milk

$\beta$ -Galactosidase sources	Incubation Temperature ( $\mu$ mol/min-mg)	
	4 $^{\circ}$ C	30 $^{\circ}$ C
<i>Pantoea</i> spp.	0.37	3.99
<i>Kluyveromyces lactis</i> (Validase)	1.13	9.45
$\beta$ -Galactosidase from <i>E. coli</i>	0.17	2.76

## 요 약

겨울철 토양에서  $\beta$ -Galactosidase를 생산하는 균주를 분리하였으며 동정한 결과 그람 음성 간균이고 *Pantoea* spp. 로 확인되었다. *Pantoea* spp. 균주의 세포 추출물로부터 DEAE-Sephacel chromatography와 affinity chromatography를 이용하여  $\beta$ -Galactosidase를 분리하였다.

*Pantoea* spp.의  $\beta$ -Galactosidase의 반응 최적 온도는 45 $^{\circ}$ C이이고 최적 pH는 5.5~7.5이고 열안정성을 조사한 결과 45 $^{\circ}$ C이상의 온도에서 불활성 되는 것으로 나타났고 *E. coli*에서 분리된 효소보다 저온에서의 활력이 좋았지만 상업적인 효소인 *Kluyveromyces lactis* (Validase) 보다는 낮았다.

## 참 고 문 헌

1. Pomeranz, Y. (1964) *Food Technol.*, 88, 682
2. Pomeranz, Y. (1964) *Ibid.*, 96, 690
3. Shukla, T.P (1975) *Crit. Rev. Fd. Technol.*, 5, 325
4. Woychik, J.H et al. (1977) *Am. Chem. Soc. Symp. S.S.R.*, 47, 67
5. Holsinger, V.H (1978) *Food Technology* 35, 40
6. Alm, Liva (1982) *Dairy Science* 65, 346