

*Lactobacillus sporogenes*에 의한 β -Galactosidase

생산에 관한 연구

- 균체의 β -Galactosidase의 정제 -

김영만 · 이정치 · 최용진* · 양한철*

일동제약(주) 중앙연구소, *고려대학교 유전공학과
(1985년 6월 7일 수리)

Studies on Production of β -Galactosidase by

Lactobacillus sporogenes

- Purification of Extracellular β -Galactosidase -

Young-Man Kim, Jung-Chi Lee, Yong-Jin Choi* and Han-Chul Yang*

Research Laboratories, Il-Dong Pharm. Co., Ltd.

*Dept. of Genetic Engineering, Korea University

(Received June 7, 1985)

Extracellular β -galactosidase from the culture broth of *L. sporogenes* was purified to apparent homogeneity by procedures including ammonium sulfate fractionation, Sephadex G-200 gel filtration, DEAE-Sephadex A-50 ion exchange chromatography; and Hydroxyapatite adsorption chromatography. The purifying procedures resulted in 347-fold purification with the overall yield of 39.5%. The purified enzyme had a specific activity (using ONPG as a substrate) of about 1,585 units per mg protein. The molecular weight of the enzyme protein was estimated to be 140,000 by gel filtration on Sephadex G-200, and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis showed that the enzyme consisted of two identical subunits with a molecular weight of 72,000.

β -Galactosidase의 효소학적 성질을 연구하기 위하여 정제에 관한 많은 연구가 이루어졌으며 1950년대 초에는 주로 ammonium sulfate, 알칼리, pH 변화에 의한 침전방법^(1,2)으로 부분 정제하였을 뿐이다. 그러나 1959년 Hu등⁽³⁾은 *Escherichia coli*의 β -galactosidase를 정제하기 위하여 DEAE-cellulose ion exchanger를 사용하였고, 1960년대에는 Sephadex G type⁽⁴⁾과 Sepharose의 겔 여과법⁽⁵⁾이 사용되었고, 그외에 일종의 이온교환수지로 DEAE-Sephadex^(6,7)와 CM-Sephadex⁽⁸⁾가 사용되어 보다 효과적인 정제를 행할 수 있게 되었다. 또한 hydroxyapatite를 이용한 adsorption chromatography

법을 이용하여 정제도를 더욱 높일 수 있게 되었다. 본 실험은 *L. sporogenes*의 배양액에서 얻은 균체의 β -galactosidase의 초효소액을 주로 Craven 등⁽⁴⁾과 Watanabe 등⁽⁵⁾의 방법에 따라 정제를 실시하여 그 결과를 보고한다.

재료 및 방법

사용시약

Sephadex G-200과 DEAE-Sephadex A-50은 Pharmacia Fine Chemical Co.; hydroxyapatite는 Japan Chemical Co.; acrylamide, N,N'-methylene

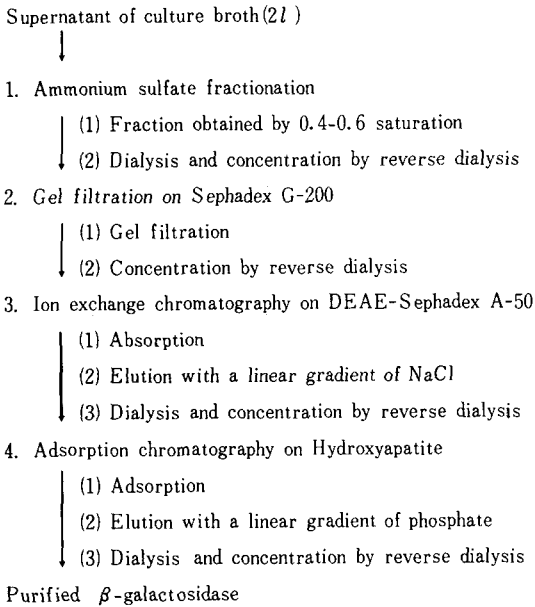


Fig. 1. Procedure of purification.

bisacrylamide, N, N, N', N'-tetramethylene diamine (TEMED), protein molecular weight markers, bovine serum albumin 및 O-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG) 등은 Sigma Chemical Co.; Glucostat reagent kit는 Worthington Biochemical Corp. 제품을 사용하였다.

균주 및 효소생산

유포자 유산균인 *L. sporogenes*로 일동제약 중앙 연구소에 보존된 균주를 사용하였으며 이 균주를 이용한 β -galactosidase 생산은 제 1보⁽⁹⁾에 상술한 방법에 준하였다.

β -Galactosidase 활성의 측정

전보⁽⁹⁾에 기술한 바와 같이 O-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG)를 기질로 하여 효소활성을 측정하였으며, 효소활성의 단위는 1분동안에 1 μ mole의 O-nitrophenol을 유리시키는데 필요한 효소활성량을 1단위로 하였다.

β -Galactosidase의 정제

효소정제는 Fig. 1에 표시된 과정에 따라 ammonium sulfate fractionation, Sephadex G-200 gel filtration, DEAE-Sephadex A-50 ion exchange chromatography 및 hydroxyapatite adsorption chromatography 등의 4 단계를 거쳐 정제하였다. 상세한 정제조건은 실험결과에서 설명하였다.

단백질의 정량

Bovine serum albumin을 표준단백질로 하여 Lo-wry등⁽¹⁰⁾의 방법에 따라 단백질을 정량하였다. Chromatography과정에서는 280nm의 흡광도로 단백질량을 표시하였다.

분자량의 측정

β -Galactosidase의 분자량은 다음 두가지 방법으로 측정하였다.

(1) Sephadex G-200gel filtration 방법⁽¹¹⁾; 5 $^{\circ}$ C에서 0.05M 인산염 완충용액(pH 7.0)으로 평형화한 Sephadex-200 column (1.2 \times 85cm)에 표준 단백질과 정제 효소단백질용액 1ml (각 50 μ g/ml)를 gel 표면에 주입한 후 5ml/hr의 유속으로 1ml씩 fraction 하면서 gel 여과하였다.

표준 단백질과 정제효소는 280nm에서 흡광도 및 효소활성을 측정하여 확인하였으며 표준 단백질 분자량의 대수값과 Void volume (V_0)에 대한 유출액량 (V_e)의 비 (V_e/V_0)와의 표준직선에 의해서 활성을 나타내는 native enzyme의 분자량을 산출하였다.

(2) Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 방법⁽¹²⁾; 표준 단백질 또는 정제효소를 0.1% SDS와 0.1% β -mercaptoethanol을 함유하는 0.01M 인산염 완충용액(pH 7.0)에 용해시킨 후 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 보존 처리하여 subunit를 분리한 다음 실온에서 5% poly-

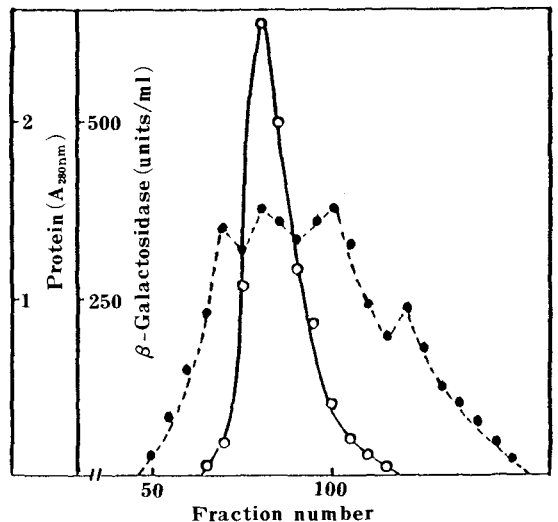


Fig. 2. Gel filtration of crude β -galactosidase on Sephadex G-200. ●, protein (A_{280nm}); ○, β -galactosidase (units/ml).

acrylamide gel(0.6×7cm)위에 주입하고 column 당 8 mA의 전류를 통해 약 5시간 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 polyacrylamide gel은 Coomassie brilliant blue로 염색한 다음 탈색과정을 거쳐 청색 띠로 나타난 표준 단백질의 상대적 이동도와 분자량의 대수값과의 표준직선을 작성하고 이 직선을 이용하여 효소의 분자량을 산출하였다.

이상과 같이 gel 여과법으로 측정한 native enzyme의 분자량과 SDS-PAGE법에 의한 subunit의 분자량을 비교하여 β-galactosidase를 구성한 subunit의 수를 구하였다.

결과 및 고찰

효소정제

제 1 보⁽⁹⁾에 상술한 배양조건으로 진탕 배양하여 얻은 배양액에서 균체를 제거한 상등액 2 l를 균체의 조효소액으로 사용, Fig. 1에 표시되어 있는 과정에 따라 0~5℃의 저온에서 정제하였다.

(1) Ammonium sulfate fractionation; 상등액 2l에 ammonium sulfate를 0.4~0.6 포화농도가 되도록 첨가하여 효소단백질을 침전물로 분획하여 0.005M β-mercaptoethanol을 첨가한 0.01M 인산염 완충용액(pH 7.0) 소량(50ml)에 용해시킨 다음 동일한 완충용액으로 투석하였다. 투석 후에 80%

polyethylene glycol(PEG) 6,000을 사용 역삼투⁽¹³⁾시켜 비활성이 24.77 units/mg인 효소액 20ml를 얻었으며 이때 효소단백질의 회수율은 90%였다.

(2) Sephadex G-200 gel filtration; 상기 효소농축액 20ml를 Sephadex G-200 column(5×40 cm)에 주입하고 0.005M β-mercaptoethanol을 함유한 0.01M 인산염 완충용액(pH 7.0)을 사용하여 유속 30ml/hr와 5ml씩 fraction하여 gel 여과하였다(Fig. 2). Gel 여과한 효소용출액의 β-galactosidase비활성은 557.53 units/mg 이었고 회수율은 75.5%이었다.

(3) DEAE-Sephadex A-50 ion exchange chromatography; Gel 여과에서 얻어진 효소액을 미리 0.01M Tris-acetate 완충용액(pH 7.0)으로 평형화한 DEAE-Sephadex A-50 column(3×25cm)에 흡착시켰다. 흡착시킨 다음 0.005M β-mercaptoethanol이 함유된 0.01M Tris-acetate 완충용액(pH 7.0)으로 세척하고 흡착된 효소는 완충용액 500ml와 0.5M NaCl을 함유한 동일한 완충용액 500ml와의 linear gradient로 용출시켰다. 25ml/hr 유속에서 5ml씩 fraction하여 활성이 있는 용출액 170ml를 얻었다(Fig. 3). 다음, 용출액을 탈염, 농축시켜 얻어진 효소액의 β-galactosidase 비활성은 954units/mg, 효소회수율은 57%였다.

(4) Hydroxyapatite adsorption chromatography; 상기 ion exchange chromatography한 효소액

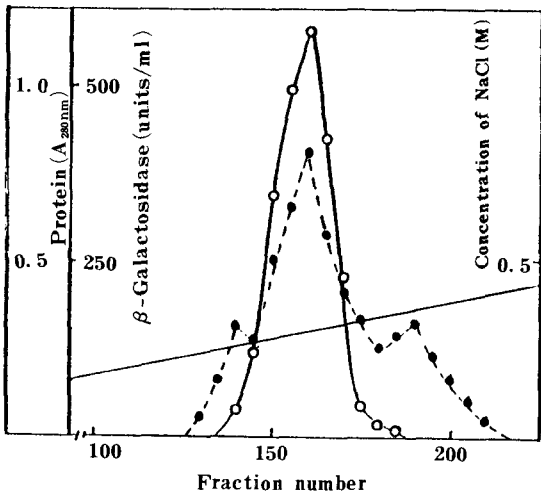


Fig. 3. Ion exchange chromatography of partially purified β-galactosidase on DEAE-Sephadex A-50.

●, protein(A_{280nm});
○, β-galactosidase (units/ml);
—, concentration of NaCl (M).

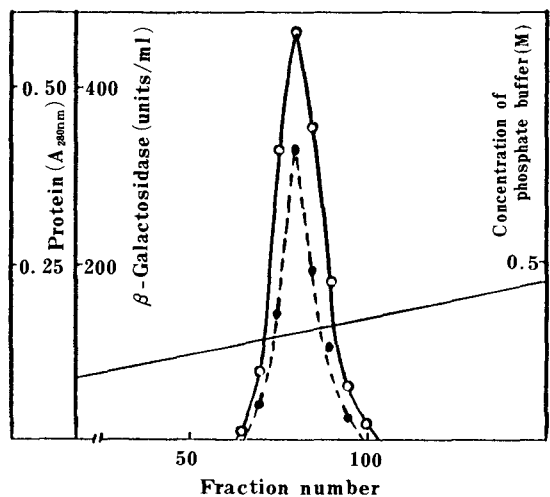


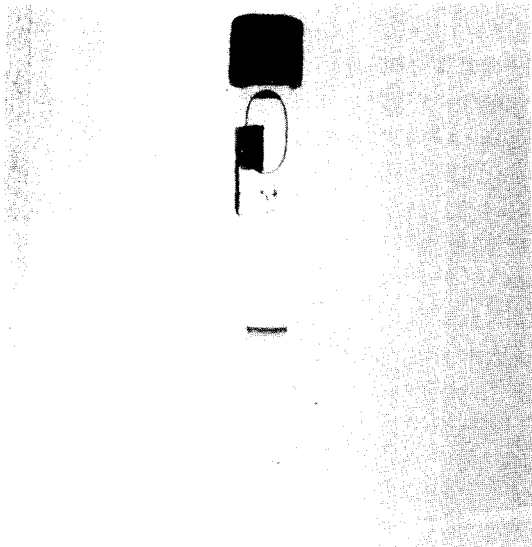
Fig. 4. Adsorption chromatography of purified β-galactosidase on hydroxyapatite.

●, protein(A_{280nm});
○, β-galactosidase (units/ml);
—, concentration of phosphate (M)

Table 1. Summarizes of purification of β -galactosidase from *L. sporogenes*.

Procedure of purification	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)	Fold of purification
Supernatant of culture	15,400	70,240	4.56	100	1
Sup. of 0.4 sat. of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	9,000	64,575	7.18	92	1.57
Sol'n of ppt. 0.6 sat. of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,552	63,220	24.77	90	5.43
Gel filtration on Sephadex G-200	95.1	53,021	557.53	75.5	122.28
Ion exchange chromatography on DEAE-Sephadex A-50	42	40,068	954	57	209.2
Adsorption chromatography on Hydroxyapatite	17.5	27,745	1,585	39.5	347.6

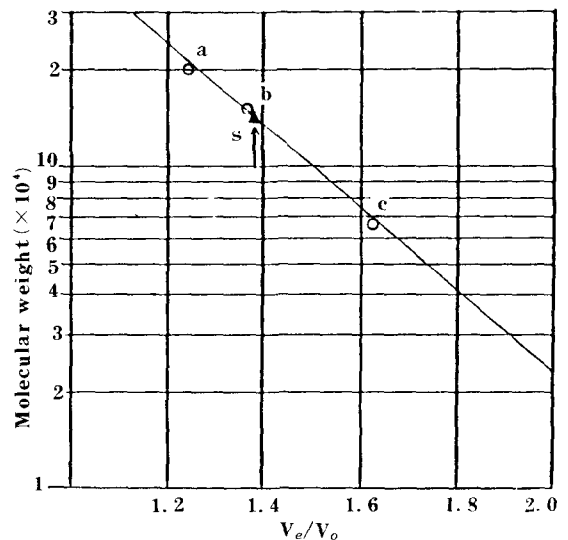
을 다시 hydroxyapatite column ($2 \times 25\text{cm}$)에 흡착시켰다. 흡착시킨 후 0.01M 인산염 완충용액 (pH 7.0)으로 세척하고 0.005M β -mercaptoethanol을 첨가한 0.001M 인산염 완충용액 (pH 7.0) 300ml와 0.5 M 인산염 완충용액 (pH 7.0) 300ml와의 linear gradient로 용출시켰다. 20ml/hr 유속으로 3 ml씩 fraction하여 Fig. 4에 표시되어 있는 바와같이 β -

**Fig. 5. Disc electrophoretic pattern of purified β -galactosidase.**

Analytical disc electrophoresis for homogeneity was carried out in a 7.5% gel ($0.5 \times 6\text{cm}$) with pH 8.3 buffer system containing 0.05M β -mercaptoethanol for 3 hr at 4°C with a current of 2 mA per gel. The protein was stained with Coomassie brilliant blue R 250.

galactosidase 효소활성이 높은 용출액 80ml를 얻었으며 이것을 투석 및 농축시켜 비활성이 1,585units/mg인 정제한 효소액 10ml를 얻었다. 이때 효소화수율은 39.5%이었다.

이상의 각 정제과정의 결과를 Table 1에 요약하였으며 4 단계의 정제공정을 거쳐서 얻은 정제 β -galactosidase는 Fig. 5와 같이 disc electrophoresis¹⁴⁾에서 단일 band를 나타냄으로 순수하게 정

**Fig. 6. Molecular weight determination of the native enzyme by gel filtration on Sephadex G-200.**

Molecular weight markers: a, β -amylase (200,000); b, alcohol dehydrogenase (150,000); c, bovine serum albumin (66,000); s, purified β -galactosidase.

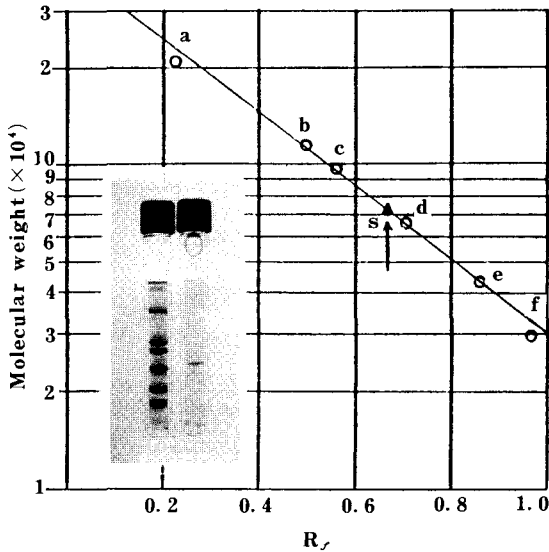


Fig. 7. Molecular weight determination of the subunit of dissociated enzyme by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

Molecular weight markers: a, Myosin (205, 000) ; b, β -galactosidase (116, 000) ; c, phosphorylase B (97, 400) ; d, bovine albumin (66, 000) ; e, egg albumin (45, 000) ; f, carbonic anhydrase (29, 000) ; s, purified β -galactosidase.

제되었음을 확인할 수 있었다.

분자량

Sephadex G-200 gel 여과법에 의한 native enzyme의 분자량은 Fig. 6에서 보는 바와같이 140, 000이고 SDS-PAGE에서는 Fig. 7과 같이 분자량이 72, 000으로 나타났다. 따라서 본 효소는 native enzyme의 분자량은 140, 000이고 분자량이 72, 000인 동일한 subunit 2개로 구성된 dimer인 것으로 추측된다.

이 효소의 분자량 140, 000은 균체내 β -galactosidase로 분자량이 비교적 작다고 보고된 *Bacillus megaterium*⁽¹⁾의 200, 000과 효모인 *Kluyveromyces fragilis*⁽⁷⁾의 200, 000보다는 작고, 균체외 β -galactosidase인 곰팡이에서 분자량이 크다고 보고되어 있는 *Aspergillus foetidus*⁽¹⁸⁾의 126, 000보다는 큰 편이다.

요 약

*L. sporogenes*의 배양여액으로부터 균체외 β -galactosidase를 ammonium sulfate fractionation, Sephadex G-200 gel filtration, DEAE - Sephadex A-50 ion exchange chromatography와 hydroxyapatite adsorption chromatography 등의 4 단계 정제공정을 거쳐 순수하게 정제하였다.

정제효소는 347 배 정제되어 비활성이 1, 585 units /mg이었으며 수율은 39.5% 였다. Sephadex G-200 gel filtration에 의한 native enzyme의 분자량은 140, 000이고 SDS-PAGE에 의해서는 분자량이 72, 000 한가지로 나타났으므로 *L. sporogenes*의 β -galactosidase는 동일한 subunit 2개로 구성된 dimer 효소이다.

References

1. Landman, O.E.: *Biochem. Biophys. Acta*, **23**, 558 (1957)
2. Kuby, S.A. and H.A. Lardy: *J. Amer. Chem. Sci.* **75**, 890 (1952)
3. Hu, A.S.L., R.G. Wolfe and F.J. Reithel: *Arch. Biochem. Biophys.*, **81**, 500 (1959)
4. Craven, G.R., E. Steers, JR. and C.B. Anfinsen: *J. Biol. Chem.*, **240**, 2468 (1965)
5. Tenu, JP., O.M. Viratelle, J. Garnier and J. Yon: *European J. Biochem.*, **20**, 363 (1971)
6. Agrawal, K.M.L. and O.P. Bahl: *J. Biol. Chem.*, **243**, 103 (1968)
7. Mahoney, R.R. and J.R. Whitaker: *J. Food Sci.*, **43**, 584 (1978)
8. Watanabe, Y., Y. Kibesaki, S. Takenichi, K. Sakai and Y. Tsujisaka: *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 943 (1979)
9. Kim, Y.M., J.C. Lee, P.K. Chung, Y.J. Choi and H.C. Yang: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **11**, 59 (1983)
10. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, L.A. Farr and R.J. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
11. Whitaker, J.R.: *Analyt. Chem.*, **35**, 1950 (1963)
12. Weber, K., J. Pringle and M. Osborn: *Methods Enzymol.* **26**, 2 (1972)
13. Arai, K., Y. Sakagishi and K. Nomiyama: *J. Biochem. Japan*, **28**, 88 (1956)
14. Davis, B.J.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **121**, 404 (1964)
15. Borghlum, G.B. and M.Z. Sternberg: *J. Food Sci.*, **37**, 619 (1972)