

Bifidobacterium sp. Int-57 α -galactosidase의 효소 특성

여나임 · 이세경 · 지근억

한림대학교 식품영양학과

Characterization of α -galactosidase from *Bifidobacterium* sp. Int-57

Na-Im Yeo, Se-Kyung Lee and Geun-Eog Ji

Department of Food science and Nutrition, Hallym University

Abstract

α -galactosidase releases galactoside from raffinose and stachyose which are the major sugars in soybean. Although raffinose and stachyose were known as flatulence factors, these sugars were recently claimed as bifidus factors. In this experiment we studied the properties of α -galactosidase and its production from *Bifidobacterium* sp. Int-57. Int-57 produced higher level of α -galactosidase than other intestinal bacteria. The production of α -galactosidase was greater when grown on raffinose compared with other carbohydrates tested. Partially purified α -galactosidase was obtained after sonication of harvested cell pellet followed by DEAE-cellulose chromatography and Sepharose CL-6B gel filtration, and assayed using PNP- α -galactoside as a substrate. Optimum pH for activity was 7.0 and optimum temperature was 40°C. At 5 mM concentration of metal ions, CoCl_2 and CuCl_2 inhibited the enzyme activity by 33% and 21% respectively. The enzyme was shown to hydrolyse genuine substrates, i.e. raffinose and stachyose.

Key words: *Bifidobacterium*, raffinose, stachyose, α -galactosidase

서 론

일본과 유럽 및 우리나라에서는 유산균 음료 제조를 위하여 과거에 *Lactobacillus*와 *Streptococcus*를 주로 이용하다가 최근에는 편성형기성균인 *Bifidobacterium*도 많이 사용하는 추세로 변하였다. 제일 근본적인 이유는 *Bifidobacterium*은 보통 성인의 경우에 *Lactobacillus*와 *Streptococcus*에 비하여 100배 이상의 균수로 존재하고, 모유를 먹는 아기에는 *Bifidobacterium*이 우세하나, 인공유를 먹은 아기는 대장균, *Clostridium* 등의 숫자가 증가하며 병의 이환율, 설사 등이 아울러 증가하는데 있다⁽¹⁻³⁾. 이 외에도 *Bifidobacterium*은 acetic acid와 lactic acid를 3:2로 생산하여 정장효과가 크며, 생산하는 lactic acid도 L(+)-lactic acid만을 생산하기 때문에 D(-)-lactic acid의 위해성이 없다. 일본의 경우, 기능성 식품 시장의 상당부분이 식이섬유, 올리고당 등 변비 완화 및 정장작용에 관련된 소재에 집중되고 있고, 이와 같은 이유에서 *Bifidobacteria* 충식 촉진 작용이 있는 것으로 알려진 fructo 올리고당도 새로운 기능 식품으로 수요가 현저하게 증가되어 많은 판매가 이루어지고 있다^(4,5). 본

논문의 저자는 한국인 장내에서 장내용물 1g당 10¹⁰ CFU(colony forming unit) 이상 존재하는 *Bifidobacterium*에 대하여 효소 패턴을 연구하던 중 우리나라에서 분리된 대부분의 *Bifidobacterium*과 ATCC에서 구입된 대부분의 *Bifidobacterium*이 강한 α -galactosidase를 보유하고 있는 것을 발견하였다. α -galactosidase는 raffinose와 stachyose 등의 α -galactoside 결합을 분해하는 효소로, 인체의 소장과 대장의 상피세포에는 α -galactosidase가 존재하지 않기 때문에 장내에서의 α -galactoside에 대한 분해는 장내 미생물 균총에 의하여 이루어진다. Raffinose와 stachyose는 특히 두류에 다양 존재하는데 이를 당은 복부팽만감의 원인 물질로 발표되었는가 하면^(6,7) 한편으로는 바피더스균 충식인자로 최근에 보고된 바⁽⁸⁾ 있기 때문에 이를 당의 인체 건강에 대한 재평가가 요구되고 있다.

본 연구에서는 이에 대한 기초자료로 사용하기 위하여 한국인으로부터 분리된 *Bifidobacterium* sp. Int-57의 α -galactosidase 생산과 효소 특성을 조사하였다. 앞으로 인체내에서의 α -galactooligosaccharide의 대사와 균총과의 상호관계에 대한 보다 면밀한 조사가 필요할 것이다.

재료 및 방법

재료

사용한 주는 진보⁽⁹⁾에서 발표한 한국인 분변으로부터

Corresponding author: Geun-Eog Ji, Department of Food science and Nutrition, Hallym University, Okchondong, Chunchon, Kangwondo 200-702, Korea

분리된 *Bifidobacterium* sp. Int-57을 이용하였다. *Bifidobacterium* Int-57은 intracellular enzyme으로 여러가지 효소를 생산하였고 특히 α -galactosidase의 역가가 높았다.

배지조성 및 배양조건

α -galactosidase를 생산하기 위한 기본배지로는 *Bifidobacterium*의 혐기성균의 생육배지인 Brain Heart Infusion(BHI)배지를 이용하였다. 그 배지 조성은 BHI 37g, hemin 0.01g, cysteine 0.5g, resazurin 0.001g, vit. K 0.01g, 중류수 1L의 상태에서 pH를 7.0으로 맞추었고 CO₂ 충전으로 혐기성 상태를 조성하여 37°C에서 배양하였다.

효소역가 측정

효소역가는 박 등⁽⁹⁾에 의한 방법으로 측정하였다. 즉 0.2 M phosphate buffer(pH 7.0), 10 mM p-nitrophenyl (PNP)- α -galactoside 및 효소용액을 각각 100 μ l 첨가하여 40°C에서 10분간 반응시킨 후 0.5 M Na₂CO₃ 1ml를 첨가하여 반응을 중지시키고 400 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 역가 1 unit은 1분당 1 μ mole의 PNP를 생산하는 효소의 양으로 정하였다.

조효소액의 조제

0.5%의 raffinose를 첨가한 BHI 배지에 활발하게 자란 Int-57을 30:1의 비율로 침종하고 24시간 배양한 뒤 10,000×g에서 원심분리하여 균체를 회수하였다. 회수된 균체를 음과 파쇄한 뒤 30,000×g에서 다시 원심분리하여 상동액을 ultrafiltration(YM 30, Amicon)한 뒤 sodium phosphate buffer(pH 7.0)에 평형화 시킨 DEAE-cellulose column(3.0×30 cm)에 시료를 loading시킨 후 30 ml/hr의 유속으로 buffer를 흘려주었으며 0~1 M NaCl을 함유한 sodium phosphate buffer(pH 7.0)로 gradient를 걸어주어 fraction당 10 ml/씩 취했다. 이를 중 역가가 있는 분획들을 모아 다시 ultrafiltration으로 농축시킨 뒤 sodium phosphate buffer(pH 7.0)로 평형화 시킨 Sepharose-6B column(1.5×110 cm)에 효소액을 loading하고 15 ml/hr의 유속으로 buffer를 흘려주어 fraction당 4 ml/씩 받았다. 이렇게 gel filtration을 통과시킨 후 역가가 있는 분획들을 모아 조효소액으로 사용하였다.

효소의 최적 pH 및 최적온도와 금속이온의 영향

α -galactosidase의 활성에 대한 온도의 영향은 30°C에서 70°C 까지 10°C 간격으로 조사하였다. pH에 대한 영향은 pH 4~8까지는 0.1 M wide range buffer(citrate-Na₂HPO₄)로, pH 8~9까지는 0.1 M glycine buffer를 사용하여 조사하였다. 금속이온의 첨가에 대한 영향을 조사하기 위하여 각 금속이온을 5 mM이 되게 조정한 뒤 반응시켰다.

효소액에 의한 α -galacto oligomer의 분해

위와 같은 방법으로 부분 정제된 α -galactosidase를 사용하여 1 mg/ml의 raffinose와 stachyose 기질에 대하여 40°C에서 작용시킨 뒤 시간에 따른 분해 정도를 HPLC로 조사하였다. 분석에 사용한 HPLC column으로는 carbohydrate analysis column(Ginsco, USA)이 사용되었으며 용매로는 acetonitrile:water(70:30), detector는 RI detector, flow rate은 2 ml/min으로 조사되었다.

결과 및 고찰

장내세균들의 α -galactosidase 생산 경향

Bacteroides, *Eubacterium*, *Bifidobacterium* 등 인체 대장내에 가장 많이 존재하는 균주들과 본 실험실에서 분리한 *Bifidobacterium*들에 대하여 α -galactosidase의 활성을 조사한 결과 *Bifidobacterium*은 일반적으로 조사된 다른 장내세균에 비하여 높은 α -galactosidase 활성도를 나타냈다(Table 1). 그리고 *Bifidobacterium*의 여러 균 중에서 *Bifidobacterium* sp. Int-57은 α -galactosidase의 효소력이 강한 균주중의 하나였다. BHI 배지에 여과 살균한 여러 종류의 탄소원을 0.5%씩 첨가하였을 때 raffinose 첨가가 제일 높은 수준의 α -galactosidase 생산을 유도하였고 lactose를 첨가하였을 때 α -galactosidase 수준이 가장 낮았다. 전보의 조사⁽⁹⁾에서 lactose는 *Bifidobacterium* sp. Int-57의 α -glucosidase, β -glucosidase, β -xylosidase, α -arabinofuranosidase를 낮춘 것으로 보아 lactose가 여러 종류의 glycosidase 생산에 대하여 공통의 조절을 하고 있는 것으로 생각되고 있다. α -galactosidase는 raffinose와 stachyose 등의 α -galactoside 결합을 분해하는 효소로서 인체의 소화계에서는 생산되지 않기 때문에 α -galactosidase의 기질들은 오직 장내에 있는 미생물 균들을 위하여 대사된다. 그 중에서도 *Bifidobacterium*이 가장 강력한 α -galactosidase 활성을 갖고 있고 raffinose와 stachyose를 인체에 투여하면 *Bifidobacterium*

Table 1. α -galactosidase activity of various intestinal bacteria

Microorganism	Activity
<i>Bifidobacterium</i> sp. Int 57	++
<i>Bif. infantis</i> ATCC 15697	++
<i>Bif. adolescentis</i> ATCC 15703	++
<i>Bif. longum</i> ATCC 15707	++
27 <i>Bif.</i> strains isolated in this lab	+++ pr ++
<i>Bact. fragilis</i> ATCC 25285	++
<i>Cl. butylicum</i> ATCC 19398	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433	-
<i>Eu. limosum</i> ATCC 8486	-
<i>L. acidophilus</i> ATCC 32820	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12600	+

+++ : very strong activity, ++ : strong activity, + : weak activity, - : no activity

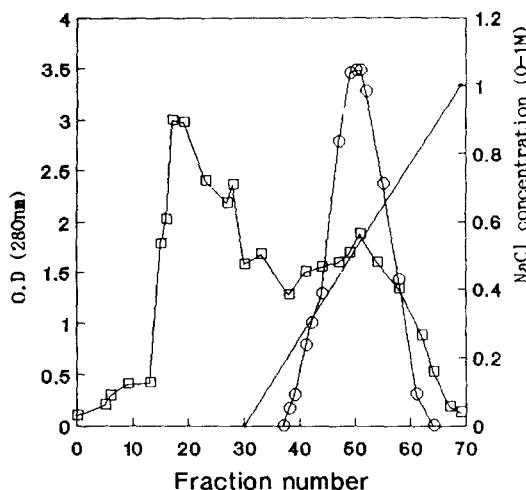


Fig. 1. DEAE-cellulose column chromatography of α -galactosidase from *Bifidobacterium* sp. Int 57

○—○; Relative activity, □—□; A(280 nm), ●—●; NaCl gradient

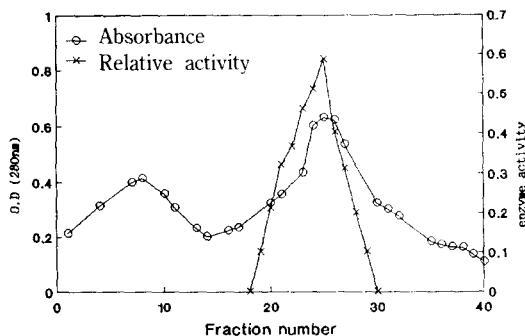


Fig. 2. Sepharose CL-6B gel filtration chromatography of α -galactosidase from *Bifidobacterium* sp. Int 57

*Bifidobacterium*의 증식이 선택적으로 증가한다고 최근에 보고된 바 있다⁽⁸⁾. 그러나 과거에는 raffinose와 stachyose 등의 두류 올리고당이 복부 팽만감의 원인물질이라고 보고^(6,7)되어 왔고 두류의 올리고당을 제거하기 위한 연구들이 진행되어 왔다. 우리나라에서도 공 등⁽¹⁰⁾은 *Lactobacillus*와 *Saccharomyces uvarum*의 혼합배양에 의하여 raffinose와 stachyose가 제거된다고 보고한 바 있으며 이 등⁽¹¹⁾은 *Bifidobacterium*의 단독배양으로 두유중 이들 올리고당이 제거되는 것을 확인하였다. 이들을 제거하는 것이 바람직한 것인지는 아직 더 연구가 필요한 사항이라 할 것이다. 한편 α -galactosidase는 대부분의 *Lactobacillus*에 결여되어 있기 때문에 Lee⁽¹²⁾ 등은 *Bifidobacterium*과 *Lactobacillus*를 신속히 구별하는데 α -galactosidase의 사용이 좋을 것이라고 제안한 바 있으며 최근에 국내에서도 민 등⁽¹³⁾은 α -galactosidase의 활력차이에 의

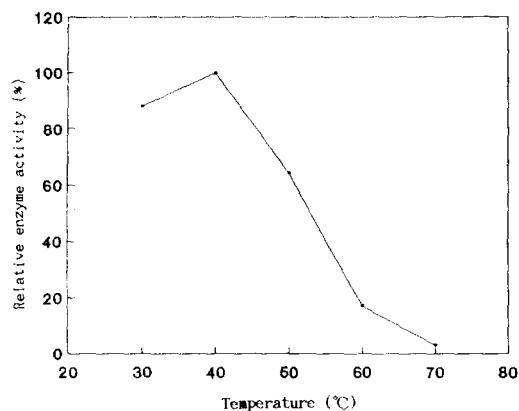


Fig. 3. Optimum temperature of α -galactosidase from *Bifidobacterium* sp. Int-57

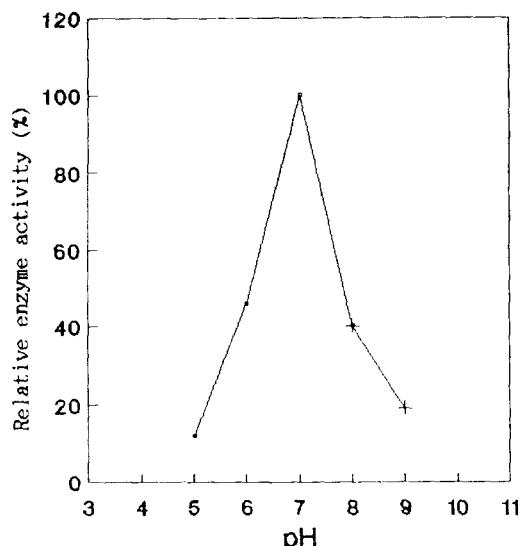


Fig. 4. Optimum pH of α -galactosidase from *Bifidobacterium* sp. Int-57

한 *Bifidobacteria*의 신별법을 보고하였다.

α -galactosidase 조효소액 조제 및 특성

Fig. 1의 ion-exchange(fraction No.40-61)와 Fig. 2의 gel filtration(fraction No.20-28)을 기친 후 얻은 조효소액을 사용하여 최적온도를 조사한 결과는 Fig. 3과 같이 40°C에서 최적 활성을 나타냈고 온도가 증가함에 따라 반응이 급격히 비약해졌다. pH는 7.0에서 최적 활성을 나타내었으며 pH가 7.0에서 올라가거나 내려감에 따라 활성이 급격히 줄어들었다(Fig. 4). CoCl_2 가 5 mM로 처리 하였을 때 CoCl_2 가 33%, CuCl_2 가 21% 효소 활성을 감소시켰다(Table 2). Kenji 등⁽¹⁴⁾은 *Bif. breve* 203의 α -galactosidase를 정제하여 그 성질을 발표한 바 직장

pH가 5.5라고 하였으나 아직은 *Bif. breve* 203과 Int-57의 α -galactosidase가 어느정도 비슷한지는 조사되지 않았다. Int-57은 *Bif. breve* 203과 당 발효성이 상이하며 여러가지

Table 2. Effect of metal ions on α -galactosidase activity

Metal	Relative activity (%)
None	100
BaCl ₂	85
CaCl ₂	89
CuCl ₂	79
CoCl ₂	67
MnCl ₂	93
MgCl ₂	98
AlCl ₃	97

성질이 틀리고 기존의 *Bifidobacterium* 균주들과 명확하게 일치되는 것은 없어 아직은 종의 수준까지는 동정되지 않은 종류로 여러가지의 효소 능력이 강하고 성장이 매우 빠른 균주이다. 위와같이 부분정제된 효소를 raffinose와 stachyose에 작용시켜 이를 실제 기질에 작용하는지 알아본 결과 반응시간이 지남에 따라 raffinose와 stachyose가 분해됨을 확인하였다(Fig. 5). 이 등⁽¹¹⁾은 두유의 raffinose와 stachyose가 α -galactosidase를 보유하고 있는 *Bif. longum*에 의하여는 완전히 이용되나 α -galactosidase가 없거나 약한 *L. acidophilus*, *E. coli*, *Clostridium perfringens*, *Eu. limosum*, *Bac. fragilis* 등에 의해서는 전혀 이용되지 않거나 불완전하게 이용된다고 보고한 바 있다. 위 보고와 본 연구의 결과를 종합하여 볼 때 본 실험에서 얻은 α -galactosidase는 두유중의 raffinose와 stachyose를 실제로 분해하는 효소라고 사료된다.

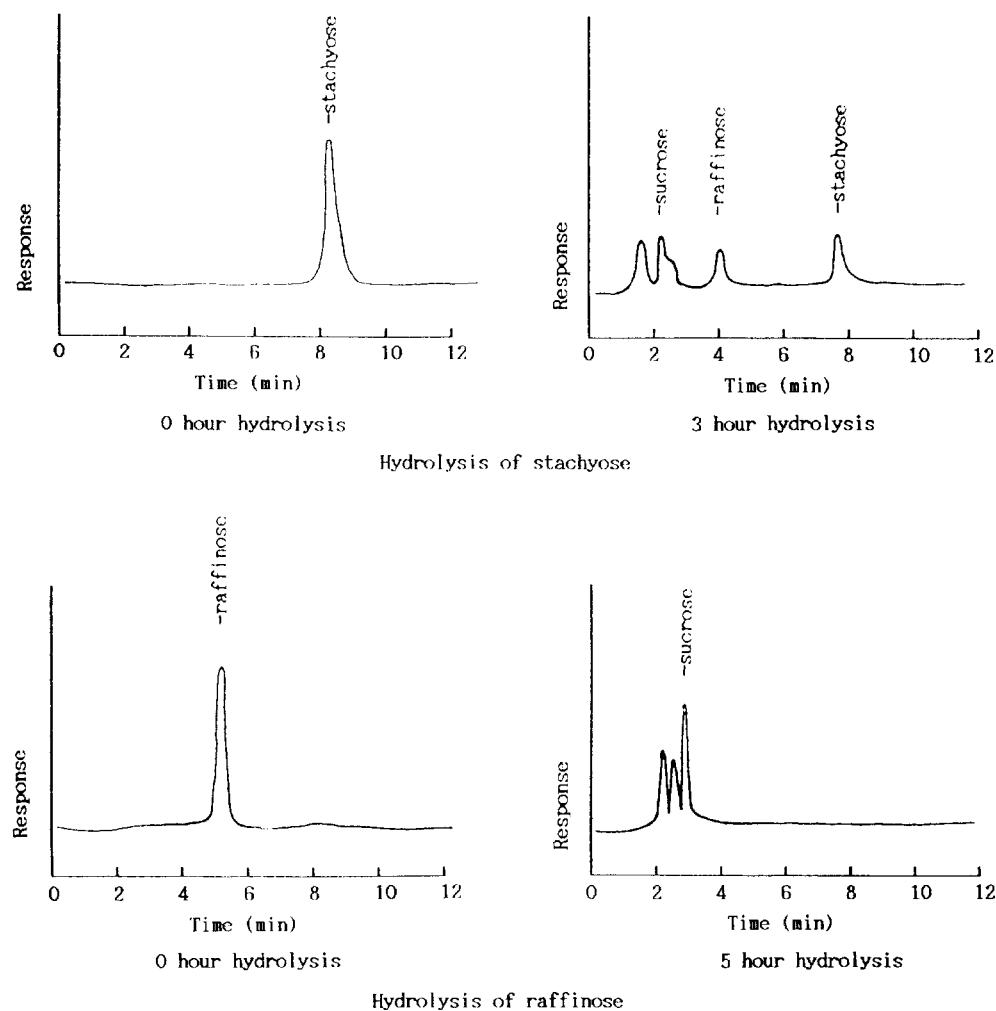


Fig. 5. Hydrolysis patterns of raffinose and stachyose by α -galactosidase from *Bifidobacterium* sp. Int-57

요 약

α -galactosidase는 raffinose와 stachyose 등의 α -galactoside 결합을 분해하는 효소이다. Raffinose와 stachyose는 특히 두류에 다양 존재하는데 이들 당은 섭취후 복부팽만감의 원인 물질로 발표되었는가 하면 한편으로는 비피더스균 종식인자로 최근에 보고된 바 있기 때문에 이들 당의 인체 건강에 대한 재평가가 요구되고 있다. 본 연구에서는 이에 대한 기초 자료로 사용하기 위하여 한국인으로부터 분리된 *Bifidobacterium* sp. Int-57이 생산하는 α -galactosidase의 효소 특성을 조사하였다. *Bifidobacterium* sp. Int-57은 여러 종류의 다른 장내 세균에 비하여 높은 α -galactosidase 활성을 보유하고 있고 raffinose에 의하여 효소 생산이 증진되었다. 세포의 음파 파쇄후 DEAE-cellulose와 Sepharose 6B gel filtration을 거쳐 부분정제한 효소를 사용하여 PNP- α -galactoside에 대한 작용을 분석한 결과 최적 pH는 7.0, 최적온도는 40°C였고 금속이온을 5 mM 농도로 처리하였을 때 효소활성을 CoCl₂는 33%, CuCl₂는 21% 저해하였다. 또한 얻어진 효소는 실제 기질로써 raffinose와 stachyose를 잘 분해하는 것으로 나타났다.

문 현

- Yuhara, T., Isojima, F., Tsuchiya, F. and Mitsuoka, T.: On the intestinal flora of bottle-fed infant. *Bifidobacteria microflora* 2, 33(1983)
- Kouhei, Y. and Zenzo, T.: Search for sugar source for selective increase of *Bifidobacterium*. *Bifidobacteria Microflora* 1, 39(1982)
- Goldin, B., Lichtenstein, A.H. and Gorbach, S.L.: The roles of the intestinal flora in "Modern Nutrition in Health and Disease" ed. by Maurice E. Hills, and Vernon R. Young. pp.500-515(1988)

- Hidaka, H., Eida, T., Takizawa, T., Tokunaga, T., Taschiro, Y.: Effects of fructooligosaccharides on the intestinal flora and human health. *Bifidobacteria Microflora* 5, 37(1986)
- Yumazaki, H. and Dilawri, N.: Measurement of growth of *Bifidobacteria* on inulofructosaccharide. *Letters in applied Microbiology*, 229(1990)
- Steggerdo, F.R., Richards, E.A. and Rackis, J.J.: Effect of various soybean product on flatulence in the adult man. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 121, 1235(1968)
- Reddy, N.R., Salunkhe, D.K. and Sharma, R.P.: Flatulence in rats following ingestion of cooked and germinated black and a fermented product of black gram and rice blend. *J. Food. Sci.* 1161(1980)
- Hayakawa, K., Mizutani, J., Wada, K., Masai, T., Yoshihara, I. and Mitsuoka, T.: Effects of soybean oligosaccharides on human fecal flora. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 3, 293(1990)
- 박현국, 강동현, 윤석환, 이세호, 이세경, 지근역: 한국인으로부터 분리된 *Bifidobacterium* sp.의 효소 pattern. *한국산업미생물학회지*, 20, 647(1991)
- 공인수, 공재열, 유주현: *Lactobacillus acidophilus*와 *saccharomyces uvarum*의 혼합배양에 의한 대두유의 당변화. *한국식품과학회지*, 24, 519(1992)
- 이세경, 지근역: *Bifidobacterium*과 기타 장내세균에 의한 두유 배양 비교. *농업생물신소재연구센터 학술발표회*, (1993)
- Lee, B.H., Hoche, S. and Simard, R.E.: A rapid method for differentiation of dairy lactic acid bacterium by enzyme system. *J. Ind. Microbiol.* 1, 209(1986)
- 민해기, 이시경, 강국희: α -galactosidase의 활력차이에 의한 *Bifidobacteria*의 선별. *한국농화학회지*, 36, 191(1993)
- Kenji, S., Tachiki, T., Kumagai, H. and Tochikurho, T.: Hydrolysis of α -galactosyl oligosaccharides in soy-milk by α -galactosidase of *Bifidobacterium breve* 203. *Agric. Biol. Chem.* 51, 315(1987)

(1993년 9월 6일 접수)