

# 젖산생성균의 $\beta$ -Galactosidase의 생화학 및 분자생물학적 특성

## 민 해 기

서울대학교 농업생명과학대학 축산과학기술 연구소

$\beta$ -Galactosidase ( $\beta$ -D-galactoside galactohydro-lase, EC.3.2.1.23)는 유당의  $\beta$ -1-4-glycosidic linkage를 분해하여 단당류인 glucose와 galactose를 생성하는 효소이다.  $\beta$ -Galactosidase ( $\beta$ -gal)는 인간에게 중요한 식품으로 되어온 우유내의 유당이 낙농 유제품에서 생기는 몇가지 문제점을 해결할 수 있다고 인정되어 왔다. 일반적으로 유당은 낙농 유제품에서 유당소화장애인 lactose intolerance, 우유나 유제품의 풍미와 조직에 영향을 미칠 뿐만 아니라 농축 유제품과 아이스크림에서 생기는 'sandiness' 현상과 낮은 감미도 등의 문제점을 가지고 있다(1-3). 이러한 문제점의 해결방안으로 낙농 유제품에  $\beta$ -gal를 이용함으로써 유당을  $\beta$ -gal에 의해 단당류인 glucose와 galactose로 분해하여 소화장애자들이 우유를 쉽게 섭취할 수 있게 하며, 농축 유제품과 아이스크림에서 유당결정화로 생기는 'sandiness'를 해결하고(1), 설탕의 첨가를 감소시킬 수 있으며(4), 또한 용해도를 향상시켜 유제품의 품질을 향상시키며(3), 유당이 분해된 우유로 요구르트를 제조함으로써 발효 시간을 단축시키며(5), 낙농산업에서 폐기되는 whey 중 유당 함량을 낮춰 BOD 오염량을 줄이는데 사용되기도 한다(6). 이런 목적하에 유제품 및 식품에 사용되는  $\beta$ -gal은 *Aspergillus niger*(7), *Aspergillus oryzae*(8), *Kluyveromyces fragilis*(6,9), *Kluyveromyces lactis*(5,10) 등의 곰팡이와 효모로부터 생성되는 효소가 식품 산업에 널리 사용되고 있다. 이 들 Fungi로부터 생성되는  $\beta$ -gal는 다량 생성되는 반면 미생물에 의해 생성되는  $\beta$ -gal에 비해 효소역가, 열안정성 및 저장안정성이 낮을 뿐만 아니라 유전자 조작이 어려운 단점을 지니고 있다(11). 젖산생성균의  $\beta$ -gal에 관한 연구는 비교적 고온성

젖산생성균으로 알려진 *Str. thermophilus*의  $\beta$ -gal이 산업적 이용에 비교적 적합한 것으로 보고되고 있다(12,13). 젖산생성 간균인 Lactobacilli와 젖산생성 구균인 Streptococci(7,13,14,15)는  $\beta$ -gal이 대부분 생성되는 반면 *Lac.casei*에서는 생성되지 않는다는 보고가 있다(14). 그러나 장내세균인 *Bifidobacteria*는 비교적 높은 수준의  $\beta$ -gal 활성을 가지고 있다고 보고가 있지만 아직 미흡한 실정이다(16-17). 젖산생성균의 유당대사는 유전학, 생화학, 분자생물학과 영양 생리학의 이용에 중요한 역할을 하고 있다. 이런 목적으로 지난 15 여년동안 젖산생성균의 분자생물학은 급속히 발전되어 오고 있다. Kok 등(1985)은 *Str.lactis*의  $\beta$ -gal 유전자를 *E.coli*에 클로닝하는 연구 보고(18) 이후 낙농 산업에서의 발효 공정 개선을 위한 Streptococci 균주의 유전공학 이용 가능성이 제시 되었다. 현재 Streptococci의 표적 유전자를 *E. coli*에 형질전환하는데 이용되는 클로닝 vector들은 항생제에 대한 저항성을 갖고 있는 selective marker들이 사용되고 있다(19-20). 그러나 이 들 selective marker는 식품 미생물에 적합하지 못하기 때문에 보다 변형된 selective marker를 가진 클로닝 vector 개발이 요구되고 있는 실정이다. 이것은 항생제 저항성이 아닌 탄수화물 이용성과 관련되는 것들로 생각할 수 있다. 이와 관련된 연구는 *Str. thermophilus*에 의한  $\beta$ -gal이 plasmid DNA에 의해 생성되지 않고 염색체 DNA에 의해 생성되므로, 이 균의  $\beta$ -gal 유전자를 식품 미생물의 plasmid DNA selective marker로 이용될 수 있다고 하였다(21). 이외에도 분자유전학의 발달로 젖산생성균은 발효에 사용되는 식품재료, 발효나 제품 저장시에 오염과 부패방지 등 여러 식품의

생산과정과 제품 개선을 위한 목적으로 이용될 수 있다. 따라서 본 총설은 젖산생성균에 의한  $\beta$ -gal 활성을 조사하고, 이 효소의 생성조건, 정제, 이화학적 및 효소학적 특성을 조사 하였다. 또한 이들 유전자를 *E. coli*에 클로닝하여 유전자 제한효소 지도작성, subcloning과 DNA sequencing을 통한 *Lac Z* 유전자를 비교 분석 하였다.

### 젖산생성균의 생육에 따른 $\beta$ -Galactosidase의 specific 활성 비교

젖산생성균의 생육에 따른  $\beta$ -gal의 specific 활성 측정 결과는 Table 1과 같다. Streptococci 균주간의  $\beta$ -gal specific 활성은 *Str.thermophilus* SKD 1006의 경우 late-log phase에서 30.97 unit/mg protein으로 가장 높게 나타났다. 강과 박 (1989)의 보고에 의하면 비교적 고온성 젖산균인 *Str. thermophilus*의 경우

에는 매우 활성이 높은  $\beta$ -gal를 생성하였으며, 젖산 생성균주들 중에서는 열에 대한 안정성이 높은 것으로 알려져 있다 (12,14,22). 그러나 *Lac.cremoris* SKD 1003, *Str.faecalis* SKD 1007과 *Lac.lactis* SKD 1001 균주에서는 매우 낮은  $\beta$ -gal specific 활성을 보였다. *Lactococcus lactis*(23)와 *Lac. cremoris*(24)는 매우 낮은  $\beta$ -gal 활성을 보였다는 보고와 유사하였다. 또한 Lactobacilli 균주에 의한  $\beta$ -gal specific 활성 비교 결과는 *Lac.casei* SKD 0007에서는 매우 낮은 활성을 보인 반면 *Lac. helveticus* SKD 0009는 specific 활성이 14.29 unit/mg protein으로 높게 나타났다. 본 실험 결과는 대부분 Lactobacilli 균종과 유사 하였으나(14,25), *Lac. bulgaricus* SKD 0001의 경우 높은 활성을 보인 반면 본 실험 균주에서는 활성이 낮게 나타났다. 최근에 발효 유제품의 starter로 많이 이용되는 *Bifidobacteria*의 경우 *Bif. infantis*의  $\beta$ -gal specific 활성은 late-log phase 단계에서

Table 1. Specific activity of  $\beta$ -galactosidase of lactic acid bacteria\*

Strains	Enzyme activity (unit/ ml)	Protein (mg/ml)	Specific activity (unit/mg protein)
Lactococcus			
<i>Lac.lactis</i> SKD <sup>1</sup> 1001	1.04	1.07	0.98
<i>Lac.cremoris</i> SKD 1003	1.22	1.21	1.01
Streptococcus			
<i>Str.thermophilus</i> SKD 1006	31.28	1.01	30.97
<i>Str.faecalis</i> SKD 1007	2.43	1.26	1.98
Lactobacillus			
<i>Lac.bulgaricus</i> SKD 0001	0.76	1.03	0.74
<i>Lac.casei</i> SKD 0007	0.66	1.07	0.62
<i>Lac.helveticus</i> SKD 0009	16.29	1.14	14.29
<i>Lac.acidophilus</i> SKD 0010	1.13	1.10	1.03
Bifidobacterium			
<i>Bif. bifidum</i> KCTC <sup>2</sup> 3202	5.40	1.09	4.96
<i>Bif. longum</i> KCTC 3215	7.24	1.16	6.02
<i>Bif. adolescentis</i> KCTC 3216	2.75	1.11	2.48
<i>Bif. breve</i> KCTC 3220	3.45	1.18	2.93
<i>Bif. infantis</i> KCTC 3221	7.53	1.08	6.98

\* Lactococci and Streptococci strains in M17 broth, Lactobacilli strains in ILS broth, Bifidobacterium strains in Tochikura broth medium.

<sup>1</sup> Dept. of Dairy Science, Sung Kyun Kwan University, Korea.

<sup>2</sup> Korean collection for type cultures, Korea.

6.98 unit/mg protein으로 다른 *Bifidobacteria* 보다 높은 활성을 가지고 있으나 배양시간이 경과함에 따라 활성이 감소하였다. 그러나 *Bifidobacterium longum*의  $\beta$ -gal specific 활성은 late-log phase에서 보면 *Bif. infantis* 보다는 활성이 약간 낮았으나 정지기 이후까지도 비교적  $\beta$ -gal 활성을 유지한 것으로 나타났다. 이는 *Bif. longum* ATCC 15707를 skim milk 배지에 배양을 할 경우 제 1단계로 exponential phase에서  $\beta$ -gal이 유도되며, 제 2단계로 stationary phase 일때 lactase가 유도된 것으로 생각된다(16). *Bifidobacterium adolescentis*의 specific 활성은 다른 *Bifidobacterium* 보다 낮은 활력을 가지고 있었다. 이상의 연구결과를 종합해 보면 *Bif. infantis*는 *Bif. longum* 보다 약간 높은 활성을 가진 반면 균의 생육속도가 느리고 배양시간이 경과함에 따라  $\beta$ -gal 활성이 저하되는 단점을 가지고 있다. 따라서 *Bif. longum*을 유제품의 starter로 사용할 경우 세대시간이 짧고, 정지기 이후에도  $\beta$ -gal 활성이 유지되어 우유내 유당을 분해함으로써 품질 개선을 향상시킬 수 있을 것으로 생각된다. 일반적으로 균주간에 의한  $\beta$ -gal 생성은 분리원, 배지의 종류, pH, 배양시간과 배양온도등 여러 요인에 의해서 영향을 받는 것으로 보고되고 있다(13,14).

### *Bifidobacterium longum* KCTC 3215의 $\beta$ -Galactosidase의 생산, 정제 및 특성

#### 1) 효소의 최적 생산조건

**탄소원의 영향:** 탄소원에 따른 배양액의 최종 pH와 효소활성은 lactose를 탄소원으로 사용했을 때가 가장 좋았으며, glucose, galactose 첨가시는 lactose에 비해 낮게 나타났다. Citti 등 (1965)은 *Str. lactis*의 경우 galactose는 lactose 비해 효과적이지는 못하지만  $\beta$ -gal의 inducer가 될 수 있다고 하였다 (26). Lactose를 0.5-3.0% 농도 범위로 첨가시 균체 증식은 1.5% 농도에서 가장 좋았으며, 효소활성은 1.0%에서 가장 높게 나타났다.

**pH, 배양온도 및 시간의 영향:** 본 균주의 효소 생산 및 균체증식을 위한 최적배지의 초기 pH는 pH 7.0~8.0 사이에서 균체증식이 높게 나타났으며, 효소의 최대활성은 초기 pH 7.0이었다. 배양온도가 효소생산에 미치는 영향을 조사한 결과, 균체증식과 효소생산은 37°C 에서 가장 좋았으며, 배양온도가 상승함에 따라 급격하게 감소하는 경향을 나타내었다. 또한 37°C 에서 24시간 동안 배양한 결과, 균체증식과 효소활성은 배양 후 17시간이 경과하였을 때 효소의 활성이 가장 좋았다. 본 실험에 사용된 *Bif. longum* KCTC 3215은 혐기성 세균인데도 불구하고 강과 박(1989)이 보고한 *Str. thermophilus*의  $\beta$ -gal 생성조건과 유사하였다(13). 따라서 대수기 후반인 배양 17시간 후에 균체증식을 정지시킴으로써 최대활성을 유지시킬 수 있었다.

#### 2) 효소의 정제

**Table 2.** Summary of purification of  $\beta$ -galactosidase from *Bif. longum* KCTC 3215

Procedure	Total activity (unit)	Total protein (mg)	Specific activity (unit/mg)	Yield (%)	Purification Fold
Cell free extract	662.56	108.74	6.09	100.00	1.00
Protamine sulfate fractionation	585.30	84.99	6.88	88.33	1.13
Ammonium sulfate (0-70% saturation)	472.58	51.23	9.22	71.32	1.51
DEAE-Sephadex A-50 ion exchange chromatography	406.61	14.58	27.87	61.36	4.57
Sephadex G-150 gel filtration	373.58	6.62	56.40	56.38	9.25

조효소액을 ammonium sulfate fractionation, protamine sulfate 처리에 의한 핵산 제거, DEAE-Sephadex A-50 ion exchange chromatography, Sephadex G-150 gel filtration 단계로 정제한 결과 cell-free extract에 비해 9.25배 증가하였고, 수율은 56.38%이었으며 정제과정의 결과는 Table 2에 요약하였다.

### 3) 정제효소의 특성

**정제효소에 대한 pH와 온도의 영향:** 정제 효소에 대한 pH 4.0~10.0 범위에서의 최적 pH는 6.5에서 최대활성을 보였다. pH 6.0과 pH 8.0 사이에서 70% 이상의 효소활력이 유지되는 반면 pH 5.5 이하와 pH 9.0 이상에서는 불활성화 현상이 뚜렷하였다. 이것은 분리원이 인체 장내 (pH 5.5-6.5) 서식균으로써 강산성과 강알칼리에 대한 안정성이 낮은 것으로 생각된다. *Streptococcus thermophilus*의 경우 pH 5.5 이하에서는 효소의 불활성화 현상이 뚜렷한 반면 pH 9.0-10.0에서는 약 48%의 활성이 잔존하였다(13). 또한 30-70°C에서의 정제효소의 효소활성은 30-45°C에서 비교적 높은 활성을 보였으나, 40°C에서 가장 좋았다. 그러나 50°C 이상에서는 활성이 급격히 감소하였으며 열에 대한 안정성은 37°C와 45°C에서는 60 분간 정치한 후에도 각각 98%, 51%의 효소활성이 잔존하였다. 그러나 50°C와 55°C에서는 10분 이내에 거의 불활성화 되었다. 이것은 *Aspergillus oryzae*의  $\beta$ -gal 최적온도와 유사한 경향을 보였다(27). *Streptococcus thermophilus*는 30-50°C로 본 효소 비해 약간 높은 것으로 나타났으며, 55°C에서 60분간 정치 후에도 5% 정도의 활성을 유지하였다(13,27). *Kluyveromyces fragilis*의 경우 40°C까지는 안정성을 유지하였고, 51°C에서 10분간 정치하면 36°C 활성을 존재한다(9). 본 실험 균주의 열에 대한 안정성은 *Kluyveromyces fragilis*와 *Str. thermophilus*보다 열에 대한 안정성이 다소 낮게 나타났다.

**정제효소에 대한 금속이온 및 저해제의 영향:** 여러 종류의 금속이온들과 저해제들을 각각 1 mM 농도로 첨가시  $Ca^{2+}$ 와  $Co^{2+}$ 의 경우에는 활성이 촉진시킨 반면  $Fe^{2+}$ ,  $Cs^{+}$ ,  $Li^{+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Rb^{+}$  이온들과  $p$ -chloromercuribenzoic acid와 ethylenediamine tetraacetate (EDTA)에 의해서 억제력을 받은 것으로

나타났다. 그러나 cysteine, glutathione과 2-mercaptoethanol에 의해서 촉진 되었는데 이는 효소에 있는 많은 sulfhydryl 기들이 산화되어 disulfide 결합을 형성함으로써 효소활성이 촉진된 것으로 생각된다. *Streptococcus thermophilus*의  $\beta$ -gal은 최대활성을 위해서는  $K^{+}$ 와  $Mn^{2+}$  이온을 요구하며,  $Mg^{2+}$ 와  $Na^{+}$  이온도 활력을 유지시켰으며(13) Wendorff와 Amundson (1971)은 *Kluyveromyces fragilis*의  $\beta$ -gal은  $K^{+}$ 과  $Mn^{2+}$  이온에 의해 효소활성이 촉진되었으며, 특히  $Mn^{2+}$  이온은 효소의 보조인자로 작용하여 효소 단백질의 2차 구조와 3차 구조를 유지하는데 중요한 역할을 한다고 보고하였다(28). *Kluyveromyces lactis*의  $\beta$ -gal은  $Ca^{2+}$ 이온에 의해 억제 받은 것으로 알려져 있다(29).

**정제효소에 대한 탄수화물의 영향:** 1 mM과 10 mM 농도의 탄수화물이  $\beta$ -gal 활성에 미치는 영향은 galactose, ribose, lactose, xylose, fructose, mannose 등을 첨가하였을때 *O*-nitrophenylpyranogalactoside (ONPG) 가수분해가 저해되었으며 galactose에 의한 저해 효과가 가장 큰 것으로 나타났다. 이것은 galactose가 다른 당류 보다 활성부위에 결합하는 친화력이 강한 competitive inhibitor로 작용한 것으로 생각된다(27). 그러나 glucose, sucrose, methyl-D-glucoside 등에 의해 효소의 활성이 유지되었다. 본 정제 효소는 *Streptococcus thermophilus*의  $\beta$ -gal과 유사하였으며 Itoh 등(1980)은 *Lac. bulgaricus*의  $\beta$ -gal은 glucose, galactose, xylose, fructose, sucrose, maltose 등에 의해 저해된다고 보고하였다(25). Goncalves와 Castillo (1982)는 *Kluyveromyces marxianus*의  $\beta$ -gal 경우 lactose, ribose, galactose, galactosamine, methyl- $\beta$ -D-galactoside 등의 효소에 의해 ONPG가 가수분해되는 것을 저해되었으나 glucose, methyl- $\beta$ -D-lucoside, fucose, melibiose 등은 저해되지 않았다(30).

**정제효소의  $K_m$  및  $V_{max}$  값:** 기질농도에 따른 반응속도를 Lineweaver-Burk Plot(31)로 Michaelis-Menten 상수( $K_m$ )와 최대 반응속도( $V_{max}$ )는 기질이 ONPG 경우  $K_m$ 은 1.66 mM이고,  $V_{max}$ 는 0.30 mmole/min.mg.protein 이었으며, Lactose의 경우에는 각각 3.18 mM과 0.42 mmole/min.mg.protein 이었다(Fig. 1). *Streptococcus thermophilus*의  $\beta$ -gal은 ONPG와 lactose의 기질에 대한 반응은  $K_m$ 은 각각

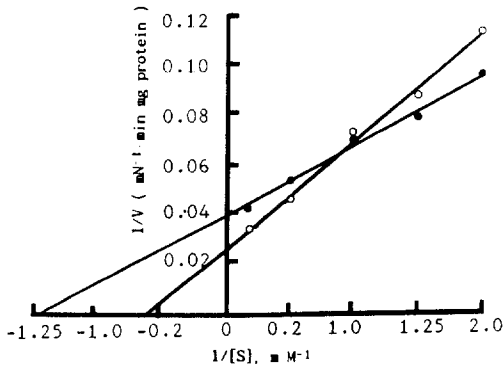


Fig. 1. Effect of substrate concentration on  $\beta$ -galactosidase activity from *Bif. longum* KCTC 3215. ●, ONPG; ○, Lactose.

1.25 mM과 7.23 mM,  $V_{max}$ 는 각각 88.50  $\mu$ mole/min mg protein과 308.64  $\mu$ mole/min mg protein 이었다. 두 젖산생성균의 경우 기질이 lactose에 비해 ONPG에 대한 친화력과 분해속도가 높게 나타났다. 이것은  $\beta$ -gal에 대한 lactose의 aglycone moiety를 aryl compound로 치환하였을 때 반응성이 더 높게 나타나는 것으로 알려져 있다(32).

정제효소의 분자량 : Sephadex G-200 gel filtration를 이용한 native  $\beta$ -gal의 분자량은 340,000 dalton 정도로 추정되었다. 또한 SDS-PAGE 상의 이동도와 표준단백질과의 이동도를 비교한 결과 170,000 dalton으로, native enzyme은 동일한 크기의 subunit로 구성된 dimer로 추정되었다. 강과 박(1989)은 *Str. thermophilus*가 생성하는  $\beta$ -gal 분자량이 약 520,000 dalton 이고 분자량이 130,000인 동일한 subunit 4개로 구성된 tetramer라고 하였으며(13), 이것은 *E.coli*의  $\beta$ -gal과 동일한 것으로 보고되고 있다(33). Uwajima 등(1972)은 *S. fragilis*의  $\beta$ -gal 분자량은 203,000 dalton 이었다(9). 세균, 효모, 곰팡이로부터 생성되는  $\beta$ -gal는 크기가 일정하지 않으나, 일반적으로 dimer 혹은 tetramer 두 종류의 subunit로 구성되어 있는 것으로 알려져 있다.

### 젖산생성균에 의한 $\beta$ -Galactosidase 유전자의 클로닝 및 대장균에의 발현과 Lac Z 유전자 비교

#### 1) $\beta$ -Galactosidase 유전자의 클로닝

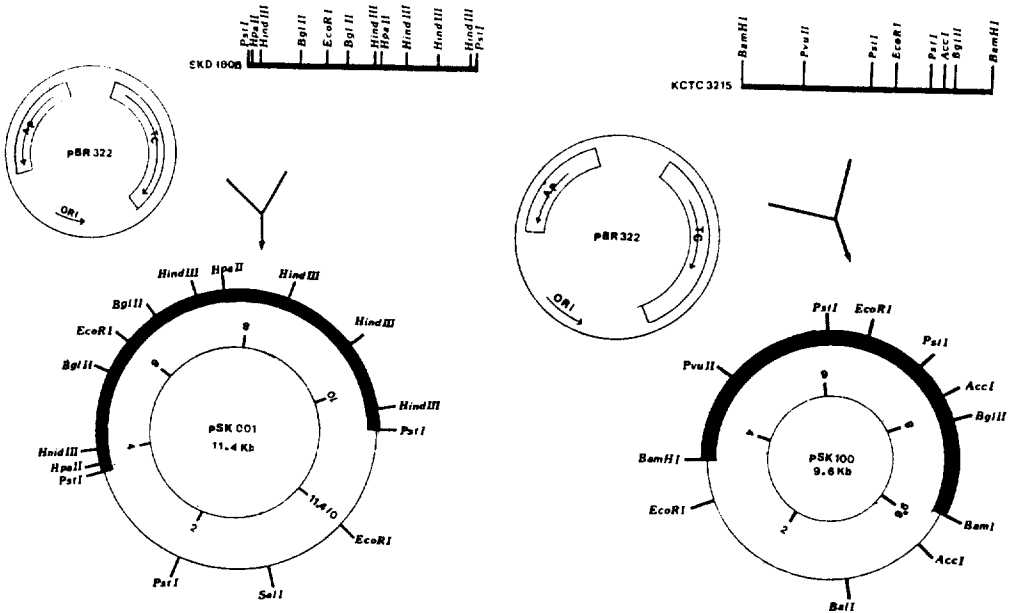


Fig. 2. Restriction endonuclease map of the recombinant plasmid pSK 001 and pSK 100. On the outer circle, 7.0 Kb *PstI* fragment from *Str. thermophilus* SKD 1006 and 5.2 Kb *BamHI* fragment from *Bif. longum* KCTC 3215 are indicated by the heavy line, and the vector plasmid pBR 322 is indicated by the thin line.

*Escherchia coli* JM 109의 형질전환체중에서  $\beta$ -gal 활성이 있는 클론체의 선별은 tetracycline (40  $\mu$ g/ml)과 X-gal(40  $\mu$ g/ml)이 포함된 LB 한천 배지에서 푸른색으로 발색되는 균주를 선별하였는데, 제한효소인 *EcoRI*을 사용한 경우에는  $10^6$ /ml개의 colony 중 푸른색을 띤 colony는 나타나지 않았다. 그러나 *PstI*인 경우에는  $10^6$ /ml개의 colony 중에서 2 개의 클론체는 푸른색으로 나타났다. 이것은 *Str.thermophilus* SKD 1006의  $\beta$ -gal 유전자내에 *EcoRI* 인식 부위가 존재함을 추측할 수 있다. 선별된 클론체는 재 transformation을 하였으며, 이 재조합된 plasmid DNA를 pSK 001로 명명하였다(Fig. 2). 2개의 colony로부터 분리된 recombinant plasmid DNA는 제한효소 *Pst I*으로 절단하여 비교를 한 결과 동일한 크기의 외래 DNA로 나타났으며, 크기는 약 7 Kb로 나타났다. *Bifidobacterium longum*의  $\beta$ -gal 유전자의 클로닝은 염색체 DNA를 *Sau3AI*으로 부분 절단하여 cloning vector인 pBR 322와 재조합 DNA를 만들어 위의 동일한 방법으로 선별하였다. 그 결과  $10^6$ /ml 형질전환체중 1개의 colony는  $\beta$ -gal 활성이 있는 것으로 나타났으며, 이 재조합된 plasmid DNA를 pSK 100으로 명명하였다(Fig. 2). Lec 등 (1982)의 방법에 따라 origin.으로부터 유래된 DNA를 확인한 결과  $\beta$ -gal 전기이동도가 동일한 것으로 나타났다(34).

## 2) 재조합 plasmid DNA (pSK 001, pSK 100)의 제한효소지도

삽입된 외래 염색체 DNA (pSK 001)의 제한효소 지도를 작성한 결과는 Fig. 2와 같다. 삽입된 외래의 염색체 DNA 단편에는 *Hind III* 인식부위가 6개로 가장 많았으며, 그밖에 *EcoRI*, *BglII*, *Sall*, *PvuII*의 인식부위가 존재하였다. 그러나 *AccI*, *BamHI* 인식 부위는 존재하지 않았으며 제한효소지도 분석결과, Herman과 McKay (1986)가 보고한 *Str.thermophilus*로부터 클로닝한  $\beta$ -gal 유전자의 제한효소지도와는 유사하였다(21). *Bifidobacterium longum*으로부터 삽입된 염색체 DNA(pSK100)의 제한효소지도는 *PvuII* 인식부위가 4개로 가장 많이 존재하였으며, 그밖에 *HincII*, *PstI*, *AccI*, *EcoRI*, *BglII*의 인식부위가 존재하였다. 그러나 *HindIII*, *XhoI*, *MluI*, *KpnI*, *Small* 인식부위는 존재하지 않은 것으로 나타났다.

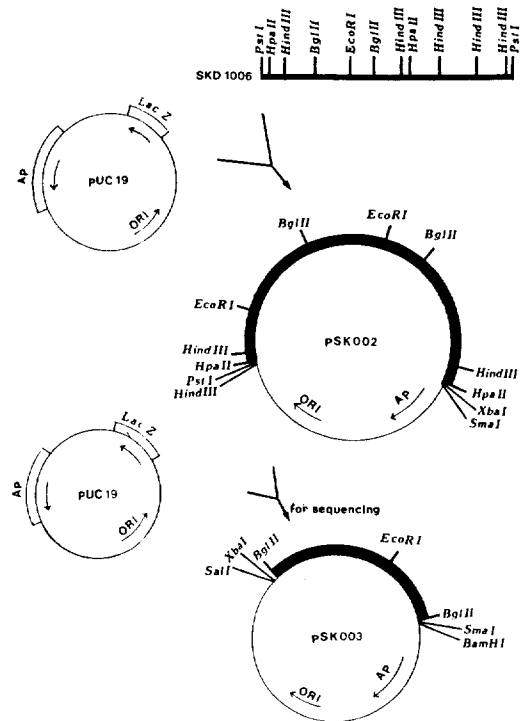


Fig. 3. Subcloning of the *HpaII-HpaII* *Lac Z* fragment from *Str.thermophilus* SKD 1006 and construction of pSK 002 and pSK 003. A linear map of the *PstI-PstI* fragment from *Str. thermophilus* SKD 1006 is also included.

## 3) Recombinant plasmid DNA (pSK 001)의 subcloning과 DNA 염기배열 결정

강과 박(1989)이 보고한 *Str.thermophilus* SKD 1006에 의한  $\beta$ -gal의 분자량은 약 130,000 dalton으로(13), 이 enzyme protein을 암호화 하는데 약 3.0 Kb로 추측 되었다. 그러나 클로닝된  $\beta$ -gal 유전자는 약 7.0 Kb로,  $\beta$ -gal 유전자를 암호화 하는데 최소한 DNA 크기로 subcloning를 하고자 제한효소인 *Hpa II*로 절단시켜 약 4.2 Kb DNA 단편을 회수하여 *AccI*으로 절단한 subcloning vector *pUC 19*과 ligation하여 transformation을 하였다. 그 결과  $\beta$ -Gal이 포함된 LB 한천 배지에서 blue colony를 형성하였다. 이 재조합 plasmid DNA를 pSK 002로 명명하였다(Fig. 3). *Streptococcus thermophilus* SKD 1006에 의한  $\beta$ -gal 유전자의 제한효소지도와 subcloning를 한 결과 재조합 plasmid pRH 172와

(A). Nucleotides sequences(222bp) of 5' region from 1.2 Kb BglII-BglII fragment.

SKD	GGTGATGCATCTGTTAAT	
A054	TATGAAGACAAGAAGATTAATATGTTCTTTTCAGATTATGAAGGCATCGTTACAGAAGGTGATGCATCTGTTAAT	1075
.....		
SKD	GGTGACGGTGAACCTATCTGTAAGTCTTAAAAATCTAAAATCAAACCTTGGAGTGTGAAAGTCTAAACTTTAC	
A054	GGTGACGGTGAACCTATCTGTAAGTCTTAAAAATCTAAAATCAAACCTTGGAGTGTGAAAGTCTAAACTTTAC	1150
.....		
SKD	GATTTGATCCTTCATGTTTTGGATGATGACCAAGTTGTTGAAGTCGTTCCAGTTAAAGTTGGATTTAGACGCTTT	
A054	GATTTGATCCTTCATGTTTTGGATGATGACCAAGTTGTTGAAGTCGTTCCAGTTAAAGTTGGATTTAGACGCTTT	1225
.....		
SKD	GAAATTAAGATAAACTTATGCTTTTGAATGGTAAGAGAATTGTCTTTAAAGGG	
A054	GAAATTAAGATAAACTTTTGAATGGTAAGAGAATTGTCTTTAAAGGGGTTAACAGACACGAATTTAAC	1225
.....		
	e i k d k l m l l n g k r i v f k g v n r h e f n	

(1B). Nucleotides sequences(143bp) of 3' region from 1.2 Kb BglII-BglII fragment.

SKD	CTCTACACTGACTTAGAGAAATATCCAGAATACCAAGGTGGATT	
A054	ACAATGGGTAACCTCTGGTGGTGGATTGCAACTTACACTGACTTAGAGAAATATCCAGAATACCAAGGTGGATT	1875
.....		
SKD	ATTTGGGACTTCATTGACCAAGCTATTACAAAACACTTCCAATGGTAGCGAATTCCTATCATATGGTGGTGAC	
A054	ATTTGGGACTTCATTGACCAAGCTATTACAAAACACTTCCAATGGTAGCGAATTCCTATCATATGGTGGTGAC	1950
.....		
	i w d f i d q a i y k t l p n g s e f l s y g g d	
SKD	TGGCATGATAGACCTTCTGACTA	
A054	TGGCATGATAGACCTTCTGACTACGAATTTTGTGGAATGGTATCGTCTTTCAGATCGTACCCTAACTCCAAAA	2025
.....		
	w h d r p s d y e f c g n g i v f a d	

**Fig. 4.** Partial nucleotide sequences of  $\beta$ -galactosidase structural gene of *Str.thermophilus* SKD 1006 and A054. Nucleotides were number at the right of each line. All the sequences of SKD 1006 determined in this research, are identical to those of A054. Upper line indicates the sequences SKD 1006. Lower line indicates the sequences of A054.

동일하였다(21). 따라서 DNA sequencing에 의한 DNA homology를 비교하였다. Double-stranded DNA sequencing은 *Bam*HI으로 절단한 pUC 19과 pSK 002를 *Bgl* II로 절단한 단편(1.2 Kb)을 ligation하여 생성된 재조합 plasmid DNA를 pSK 003으로 명명하였다(Fig. 3). Recombinant DNA (pSK 003) sequencing을 한 결과는 Fig. 4와 같다. Fig. 4에서 본 바와 같이 *Str. thermophilus* A 054 (*lac Z* pRH116)와 *Str. thermophilus* SKD 1006 (*lac Z* pSK 003)으로부터 N-terminal 부근과 C-terminal 부근 DNA 염기배열(365 bp)을 비교한 결과, 두 균주간 DNA 염기배열은 동일하였다. Schroeder 등(1991) 보고에 의하면 *Str. thermophilus* A 054 와 ATCC 19254의 *lac Z* 구조 유전자는 3071 bp로, 1026개의

아미노산 잔기로 구성되었으며 이들 균주로부터  $\beta$ -gal의 pI 값은 5.90 이었으며 분자량은 116,860 dalton 이었다(35). 같은 species인 *Str.thermophilus*의 *lac Z* ( ATCC 19258)와 *lac Z* (A054)의 DNA 염기배열은 구조 유전자 중에서 단지 21 bp 만이 차이가 있었다(35). 또한 *Lactobacillus bulgaricus*, *E. coli*와 *Klebsiella pneumoniae*로부터  $\beta$ -gal amino acid 배열은 *Str.thermophilus*의 enzyme protein과 비교하면 각 각 48, 35와 32.5%가 동일한 것으로 보고되고 있다(36).

#### 4) *Escherchia coli* 형질전환체의 $\beta$ -Galactosidase specific 활성 측정

*Streptococcus thermophilus* SKD 1006, *Bif. lo-*

**Table 3.** Comparison of the specific activity of the  $\beta$ -galactosidase in *E.coli* JM 109 containing recombinant plasmid DNA

Strains	Enzyme activity (unit/ ml)	Protein (mg/ml)	Specific activity (unit/mg protein)
<i>Str.thermophilus</i>	31.28	1.02	30.53
<i>Bif. longum</i>	7.24	1.16	6.02
<i>E.coli</i> JM 109 (pBR 322)	0.00	1.81	0.00
<i>E.coli</i> JM 109 (pUC 19)	0.09	2.10	0.04
<i>E.coli</i> JM 109 (pUC19+1mM IPTG)	7.60	1.13	6.72
<i>E.coli</i> JM 109 (pSK 001)	9.93	1.56	6.36
<i>E.coli</i> JM 109 (pSK 002)	23.19	1.86	12.46
<i>E.coli</i> JM 109 (pSK 100)	12.60	1.53	8.24

*ngum* KCTC 3215, *E.coli* JM 109 (pBR 322), *E. coli* JM 109(pUC 19), *E. coli* JM 109 (pUC 19+1 mM IPTG), 형질전환체 *E. coli* JM 109(pSK 001), *E. coli* JM 109(pSK 002) 및 *E. coli* JM 109 (pSK 100)로부터  $\beta$ -gal specific 활성 측정결과는 Table 3과 같다. *Lac Z*가 없는 *E. coli* JM 109(pBR 322)의  $\beta$ -gal 활성은 없었으며 *E. coli* JM 109 (pUC 19+1 mM IPTG)의  $\beta$ -gal specific 활성은 6.72 unit/mg protein으로 *E.coli* JM 109(pUC 19)에 비해 높게 나타났다. 이것은 배지내 IPTG로 인한  $\beta$ -gal이 유도되기 때문이다. 형질전환체 *E. coli* JM 109 (pSK 002)에 의한 조효소액의  $\beta$ -gal specific 활성은 12.46 unit/mg protein으로, *E. coli* JM 109 (pSK001) 보다 높은 활성을 보인 반면 *Str. thermophilus* SKD 1006의 specific 활성 보다는 낮게 나타났다. 또한 *Bif. longum*의 염색체 DNA으로부터 삽입된 형질전환체 *E. coli* JM 109 (pSK 100)의  $\beta$ -gal specific 활성은 8.24 unit/mg protein으로 *Bif. longum* 보다 활성이 높게 나타났다. 이상의 결과를 볼때 *E.coli* 내의 특정

유전자 발현과 활성을 높이는 연구, promoter 개발과 *E. coli*-젖산균의 shuttle vector 개발에 관한 연구를 할 계획이다.

## 요 약

젖산생성균의  $\beta$ -gal의 생성과 *Bif. longum* KCTC 3215에 의한  $\beta$ -gal 생산, 정제 및 특성에 관한 연구와 젖산생성균의  $\beta$ -gal 유전자의 클로닝 및 대장균에의 발현과 *Str.thermophilus* SKD 1006의 *Lac Z* 유전자를 비교 분석하였다.

### 1. 젖산생성균의 $\beta$ -Galactosidase의 생성

Genus 별에 따른 젖산균의  $\beta$ -gal specific 활성은 다양하였다. 그러나 모든 genus에 대한  $\beta$ -gal 활성은 late-log phase 일때 가장 높은 것으로 나타났다. *Streptococci*와 *Lactobacilli* 균주간의 specific 활성 비교를 한 결과, *Str. thermophilus* SKD 1006의 경우 31.13 unit/mg protein으로 가장 높았으며, *Lactobacilli* 균주중에서는 *Lac. helveticus*가 14.29 unit/mg protein으로 가장 높게 나타났다. 또한 *Bifidobacterium* 균주에 대한 균 생육과  $\beta$ -gal specific 활성 비교 결과, *Bif. infants*와 *Bif. longum*의 경우 세대 시간이 다른 균주에 비해 짧은 반면  $\beta$ -gal specific 활성은 높게 나타났다.

### 2. *Bifidobacterium longum* KCTC 3215에 의한 $\beta$ -Galactosidase의 생산, 정제 및 특성

*Bifidobacterium longum* KCTC 3215에 의한  $\beta$ -gal의 최적 생성조건은 탄소원으로 1.0% lactose, 초기 pH 7.0, 배양온도 37°C 및 배양시간 17시간 후 이었다. 이 효소는 protamine sulfate, ammonium sulfate, DEAE-Sephadex A-50 ion exchange chromatography 및 Sephadex G-150 gel filtration 등 4 단계 정제과정을 거쳐 9.25배 정제되었다. 정제 효소의 활성 최저온도는 40°C, 최적 pH는 6.5이었으며, 효소활성이  $Ca^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ , 2-mercaptoethanol, cysteine, 그리고 glutathione에 의해 촉진되는 반면,  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Cs^{1+}$ ,  $Li^{1+}$ ,  $p$ -chloromercuribenzoic acid, EDTA와 galactose에 의해서는 저해되었다. 효소의 Kinetics는 ONPG를 기질로 했을 때  $K_m=1.66$  mM,  $V_{max}=0.30$  mM/min mg protein이



었으며, 분자량은 340,000 dalton으로 분자량이 동일한 두 개의 subunit로 구성되어 있다.

### 3. 젖산생성균에 의한 $\beta$ -galactosidase 유전자의 클로닝 및 대장균에의 발현과 *Streptococcus thermophilus*의 Lac Z 구조유전자 비교 분석

*Streptococcus thermophilus*의  $\beta$ -gal 유전자를 형질전환시킨 *E.coli* JM 109 (pSK001)는 한개의 plasmid를 갖고 있었으며, 이 재조합 plasmid를 pSK 001로 명명하였으며, 삽입된 DNA 크기는 약 7.0 Kb이었다. 재조합 plasmid DNA(pSK 001)의 제한 효소지도는 *HindIII*, *EcoRI*, *BglII*, *Sall*, *PvuII* 등의 인식부위를 갖고 있었다. *Bifidobacterium longum*의  $\beta$ -gal 유전자를 형질전환시킨 *E.coli* JM 109 (pSK 100)의 삽입된 DNA 크기는 약 5.2 Kb 이었으며, 제한효소인 *PvuII*, *HincII*, *AccI*, *EcoRI*, *BglII*의 인식부위가 존재하였다. *Streptococcus thermophilus* 균주간 Lac Z 구조 유전자의 N-terminal(222bp)부근과 C-terminal(143 bp)부근을 비교한 결과 DNA 염기배열은 동일하였다. 젖산생성균의  $\beta$ -gal 유전자 이외에도 유당대사경로에 관여하는 단백질 유전자의 분리와 특성 및 우수한 형질의 젖산균주 개발을 위한 Host-Vector 체계 개발에 관한 연구는 계속 진행되어야 할 것으로 생각된다.

### 참고문헌

1. Tumerman, L., H. Fram, and K.W. Cornely, 1954. The effect of lactose crystallization on protein stability in frozen concentrated milk. *J. Dairy Sci.* **37**: 830.
2. Rosensweig, N.S., 1969. Adult human milk intolerance and intestinal lactase deficiency. A review. *J. Dairy Sci.* **52**: 585.
3. Young, C.K., J.W. Stull, R.R. Taylor, R.C. Angus, and T.C. Daniel, 1980. Acceptability of frozen desserts made with neutralized, hydrolyzed, fluid cottage cheese whey. *J. Food Sci.* **45**: 805.
4. Bouvy, F.A.M., 1975. Applications for lactase-treated whey. *Food Prod. Develop.* **9**: 10.
5. O'leary, V.S. and J.H. Woychick, 1976. A comparison of some chemical properties of yogurts made from control and lactase treated milks. *J. Food Sci.* **41**: 791.
6. Mahoney, R.R. and J.R. Whitaker, 1978. Purification and physico-chemical properties of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *J. food Sci.* **43**: 584.
7. Wierzbicki, L.E. and F.V. Kosikowski, 1973. Kinetics of lactose hydrolysis in acid whey by  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus niger*. *J. Dairy Sci.* **56**: 1396.
8. Park, Y.K., M.S.S.D. Santi, and G.M. Pastore, 1979. Production and characterization of  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *J. Food Sci.* **44**: 100.
9. Uwajima, T., H. Yagi, and O. Terada, 1972. Purification crystallization and some properties of  $\beta$ -galactosidase from *Saccharomyces fragilis*. *Agric. Biol. Chem.* **36**: 570.
10. Baer, R.J. and M. Loewenstein, 1979. Activity of  $\beta$ -galactosidase from *Saccharomyces lactis* at temperatures below 0°C. *J. Dairy Sci.* **62**: 1041.
11. Blankenship, L.C. and P.A. Wells, 1974. Microbial  $\beta$ -galactosidase: A survey for neutral pH optimum enzymes. *J. Milk Food Technol.* **37**: 199.
12. Deeth, H.C. 1984. Yoghurt and cultured products. *Austral. J. Dairy Technol.* **39**: 111.
13. Kang, K.H. and S.I. Park, 1989. *Streptococcus thermophilus* 510에 의한  $\beta$ -gal-actosidase의 생산, 정제 및 특성. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **17**: 35.
14. Toba, T., Y. Tomita, T. Itoh, and S. Adachi, 1981.  $\beta$ -Galactosidases of lactic acid bacteria: Characterization by oligosaccharides formed during hydrolysis of lactose. *J. Dairy Sci.* **64**: 185.
15. Ramana Rao, M.V. and S.M. Dutta, 1977. Production of  $\beta$ -galactosidase from *Streptococcus thermophilus* grown in whey. *Appl. Environ. Microbiol.* **34**: 185.
16. Desjardins, M.L., D. Roy, and J. Goulet, 1991.  $\beta$ -Galactosidase and proteolytic activities of *Bifidobacteria* in milk: A preliminary study. *Milchwissenschaft*, **46**: 11.
17. Tochikura, T., K. Sakai, T. Fujiyoshi, T. To-

- chiti, and H. Kumagai, 1986. P-Nitrophenyl glycoside-hydrolyzing activities in *Bifidobacteria* and characterization of  $\beta$ -galactosidase of *Bifidobacterium longum* 401. *Agric. Biol. Chem.* **50**: 2279.
18. Kok, J., J.M. van Diji, J.M.B.M. vander Vossen, and G. Venema, 1985. Cloning and expression of a *Str. cremoris* proteinase in *Bacillus subtilis* and *Str.lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**: 94.
  19. Gasson, M.J., and P.H. Anderson, 1985. High copy number plasmid vectors for use in lactic Streptococci. *FEMS Microbiol. Lett.* **30**: 193.
  20. Kok, J., J.M.B.M. Van der Vossen, and G.Venema, 1984. Construction of plasmid cloning vectors for lactic streptococci which also replicate in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 94.
  21. Herman, R.E. and L.L. McKay, 1986. Cloning and expression of the  $\beta$ -D-galactosidase gene from *Streptococcus thermophilus* in *Eschechia coli*. *Appl. Environ Microbiol.* **52**: 45.
  22. Ramana Rao, M.V. and S.M. Dutta, 1981. Purification and properties of  $\beta$ -galactosidase from *Streptococcus thermophilus*. *J. Food Sci.* **46**: 1419.
  23. Wierzbicki, L.E. and F.V. Kosikowski, 1973<sup>a</sup>. Lactase potential of various microorganims grown in whey. *J. Dairy Sci.* **56**: 26.
  24. Jagota, S.K., M.V. Ramana Rao, and S.M. Dutta, 1981.  $\beta$ -Galactosidase of *Streptococcus cremoris*. *J. Food Sci.* **46**: 161.
  25. Itoh, T., M. Suzuki, and S. Adachi, 1982. Production and characterization of  $\beta$ -galactosidase from lactose-fermenting yeasts. *Agric. Biol. Chem.* **46**: 899.
  26. Citti, J.E., W.E. Sandine, and P.R. Elliker, 1965.  $\beta$ -Galactosidase of *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.* **89**: 937.
  27. Wierzbicki, L.E. and F.V. Kosikowski, 1971. Preparation and characterization of lactase( $\beta$ -galactosidase) for microbial. *J. Dairy Sci.* **54**: 763.
  28. Wendorff, W.L. and C.H. Amundson, 1971. Characterization of  $\beta$ -galactosidase from *Saccharomyces fragilis*. *J. Milk Food Technol.* **34**: 300.
  29. Kuby, S.A. and H.A. Lardy, 1952. Purification and Kinetics of  $\beta$ -galactosidase from *Escherichia coli* strain K-12. *J. Amer. Chem. Sci.* **75**: 890.
  30. Goncalves, J.A. and F.J. Castillo, 1982. Partial purification and characterization of  $\beta$ -D-galactosidase from *Kluyveromyces marxianus*. *J. Dairy Sci.* **65**: 2088.
  31. Lineweaver, H. and D. Burk, 1934. The determination of enzyme dissociaion constants. *J. Amer. Chem. Soc.* **56**: 658.
  32. Colby, C.JR. and A.S.L. Hu, 1968. Purification and comparsion of the  $\beta$ -galactosidase synthesized by *Escherichia coli* F-LAC+ and *Proteus mirabilis* F-Lac+. *Biochem. Biophys. Acta.* **157**: 167.
  33. Craven, G.R.,JR. Steers, and C.B. Anfinsen, 1965. Purification, composition and molecular weight of the  $\beta$ -galactosidase of *Escherichia coli* K-12. *J. Biol. Chem.* **24**: 2468.
  34. Lee, Y.J., J.B. Hansen, E.K. Jangusztyń-Krynicka, and B.M. Chassy, 1982. *J.Bacteriol.* **152**: 1138.
  35. Schroeder, C.J., C. Robert, G. Lenzen, L.L. McKay, and A. Mercenier, 1991. Analysis of the lac Z sequences from two *Streptococcus thermophilus* strains: Comparison with the *Escherichia coli* and *Lactobacillus bulgaricus*  $\beta$ -galactosidase sequences. *J. General. Microbiol.* **137**: 369.
  36. Schmidt, B.F., R.M. Adams, C. Requadt, S. Power, and S. Mainzer, 1989. Expression and nucleotide sequence of the *Lactobacillus bulgaricus*  $\beta$ -galactosidase gene cloned in *E. coli*. *J. Bacteriol.* **171**: 625.