

김치에서 분리한 유산균 *Lactobacillus plantarum*의 β -galactosidase 특성에 관한 연구

이영환* · 강미선

전남대학교 농과대학 농화학과

초록 : 김치에서 분리한 유산균 *Lactobacillus(L.) plantarum* 3 균주(strain No. 49, No. 61, No. 75)의 β -galactosidase의 생성을 위한 최적 조건을 검토하고, 효소학적 특성을 조사하였다. 효소 β -galactosidase의 최적 생성 조건은 strain No. 49의 경우 탄소원을 dextrose대신에 lactose를, strain No. 75 균주는 galactose를 1.0% 함유한 MRS broth에서, 초기 pH를 6.5로 하여 30°C에서 48시간 배양하였을 때로 판명되었다. Strain No. 61 균주의 경우는 lactose를 3.0% 함유한 MRS 배지의 초기 pH를 7.5로 하여 실온에서 48시간 배양하였을 때가 최적 생성조건이었다. 효소의 최적 활성 온도는 60°C, 37°C, 50°C로 3균주 모두 *L. plantarum*임에도 불구하고 각각 다른 온도에서 최고 활성을 보였다. 특히, strain No. 61, No. 75는 반응 온도가 상승함에 따라 활성의 감소가 관찰된 반면 strain No. 49는 60°C의 높은 온도에서 가장 높은 활성을 보여 높은 온도에서도 효소활성이 유지되는 점은 주목할 만하였으며, 3균주 모두 45°C까지 90% 이상의 안정성을 나타내었다. 한편 효소의 최적 pH는 3 균주 모두 pH 6.5이었으며, pH 6.0에서 효소활성이 가장 안정하였다(1995년 12월 26일 접수, 1996년 1월 25일 수리).

서 론

김치의 발효 과정에서 나타나는 미생물은 호기성 세균과 혐기성 세균의 유산균 및 효모가 주류를 이루고 있으며, 발효 초기에는 호기성 및 혐기성 세균의 성장이 함께 증가하고 발효가 진행됨에 따라 젖산을 비롯한 각종 유기산이 생성되어 pH가 감소하고 내산성 혐기성 세균이 주를 이루게 되며, 산패이후에는 호기성 세균이 다시 증가하는 것으로 보고된 바 있다.^{1,2)} 이때 유산균은 초기에 *Leuconostoc mesenteroides*가 우세 균종으로 김치 내용물을 산성화하여 혐기적 상태로 유지하며 호기성 세균의 성장을 억제하나 그 이후에는 *L. plantarum* 균종이 나타나는 것으로 알려져 있다.^{3,4)} 김치 발효 과정에 작용하는 유산균은 젖산과 단백질 분해효소에 의해 쉽게 분해되는 안정성이 높은 bacteriocin 그리고 H₂O₂ 및 diacetyl 생성으로 인한 항균 작용과 약물 대사, 항돌연변이성, 항암성, 위액 분비 촉진, 그리고 방사선 저항성 등의 특성이 있다.⁵⁾

한편, 유산균은 Gram 양성이며 탄수화물을 발효에 의한 에너지원으로 사용하여 최종산물로 lactic acid와 acetic acid를 생성하고, glucose 발효시 젖산만을 생산하는 호모 발효 유산균 (homo fermentative lactic bacteria)과 젖산 이외 알콜과 CO₂, 초산 등을 같이 생성하는 헤테로 발효 유산균 (hetero fermentative lactic bacteria)으로 대별 되며 일반적으로 통성 혐기성 세균이다. 이러한 유산균이 생성하는 β -galactosidase(β -galactoside galactohydrolase, EC. 3.2.1.23)는 lactose의 β -1-4-glycosi-

dic 결합을 분해하여 glucose와 galactose를 생성하는 endoenzyme으로, 장내에 이 효소가 결핍되면 lactose intolerance(소화 장애증)을 일으키며 식품에 있어서 lactose에 의한 농축 유제품과 아이스크림에 생기는 砂狀(sandiness), 그리고 낮은 감미도를 해결하는 방안으로 연구되어 왔다.⁶⁻¹⁰⁾

따라서 본 연구에서는 우리의 전통 발효 식품인 김치로 부터 발효에 관여하는 유산균을 유제품 등 발효 식품산업에 사용 가능한지의 여부를 검토하고자 우선 탄소원에 따른 β -galactosidase의 생성 조건과 여러 조건에서 이들 효소의 활성을 측정하였다.

재료 및 방법

균주의 배양 및 보관

김치에서 분리한 *L. plantarum* 3 균주¹¹⁾(strain No. 49, No. 61, No. 75)를 MRS agar 배지에 접종 배양한 후 4°C에 보관하며 사용하거나, 필요에 따라 MRS broth¹²⁾(pH 6.5)에 배양하여 glycerol의 최종농도가 20% (W/V) 되도록 첨가하여 -70°C에 냉동 보관하며 사용하였다.

β -Galactosidase의 생성조사

균주간의 β -galactosidase 생성에 영향을 주는 요인으로는 배지의 종류, 배양시간, pH 그리고 배양온도 등이 있는 것으로 보고되고 있다.^{13,14)}

따라서 탄소원의 종류에 따른 β -galactosidase의 생성 정도를 조사하고자 여러 종류의 탄소원을 최종 농도가

찾는말 : *Lactobacillus plantarum*, lactic acid bacteria, β -galactosidase, yogurt

*연락처

1.0% 되도록 첨가한 MRS broth에서 48시간 배양한 후 조효소액을 조제하고 기질(ONPG)과 반응시켰다. 이 반응액을 420 nm의 파장에서 spectrophotometry(UV-1201 spectrophotometer)로 β -galactosidase activity를 측정, 비교하였다. 탄소원의 농도에 따른 β -galactosidase의 생성은 선택한 탄소원의 최종농도가 1.0~3.0% 수준이 되도록 제조한 배지에 상기의 방법으로 배양한 후 조사하였다. 한편, 초기 pH에 따른 효소 생성 조건은 pH 5.5, pH 6.5, pH 7.5 에서, 배양온도에 따른 효소생성 조건은 22.5°C, 30.0°C, 37.0°C, 45.0°C에서 각각 배양하여 효소 활성도를 측정 비교하였으며, 균체생육은 660 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 나타내었다.

β -Galactosidase 활성 측정

조효소액의 조제를 위하여 탄소원이 첨가된 MRS배지 20 ml에 유산균을 배양한 후 균체를 회수(4°C, 9,500 rpm, 10 min.)하여 0.1M potassium phosphate buffer (pH 7.0)로 세척한 후, 동일한 buffer 2 ml에 현탁하여 ice-bath상에서 초음파 처리(50 sec, 90 mA)하고 이를 원심분리 (4°C, 12,000 rpm, 20 min.)하여 얻어진 상등액을 조효소액으로 사용하였다. 기질은 0.1M potassium phosphate buffer (pH 7.0)에 o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside(ONPG)를 5 mM되게 용해시켜 2 ml씩 4°C에 보관하면서 사용하였다.

효소활성은 기질 2 ml에 조효소액 0.5 ml를 첨가하여 37°C에서 15분간 반응시키고 4°C에 보관된 0.5M Na₂CO₃ 반응정지액 2.5 ml를 가하여 급냉시키면서 반응을 정지시킨 다음 유리된 o-nitrophenol을 420 nm의 파장에서 비색 정량하였다. 이때 blank는 기질액만을 37°C에서 15분간 반응시킨 후 여기에 반응정지액, 조효소액을 차례로 첨가 하였다.¹⁵⁾ 한편, 효소 활성단위(U)는 1g의 시료에서 1분간 ONPG로부터 1 μ mol의 o-nitrophenol을 유리할 때 1 unit로 하였으며,^{16,17)} o-nitrophenol의 유리량은 표준 정량 곡선으로 부터 산출하여 표시하였다.

효소 활성의 최적 온도를 조사하기 위하여 조효소액과 5 mM ONPG 기질을 30~60°C에서 15분간 반응시켜 활성을 측정하였으며, 35~55°C에서 각각 조효소액을 10분간 열처리한 후 37°C에서 ONPG를 기질로 하여 효소 활성을 측정하여 열에 대한 안정성을 구하였다. 효소의 최적 pH와 pH 안정성은 ONPG의 pH를 pH 3.0~7.5로, 조효소액의 pH를 pH 5.0~8.0으로 각각 달리하여 37°C에서 15분간 반응시킨 후 효소 활성을 측정하였다. 이때 기질과 조효소액의 pH 조정을 위하여 pH 3.0~5.5는 McIlvaine buffer를, pH 6.0~8.0은 0.4M potassium phosphate buffer를 사용하였다.

단백질 정량

최종선발한 유산균을 MRS broth에 접종한 후 30°C에서 배양하고 대수증식기 말기에 회수하여 Bovine serum albumin(BSA)을 표준 단백질로 하고 Bradford 방법¹⁹⁾에 의하여 단백질 함량을 정량하였다. 조효소액 100

μ 에 Bradford 시약 5 ml를 가하여 거품이 생기지 않도록 주의하면서 잘 섞은 후 1시간내에 595 nm의 파장에서 비색 정량하였다. Bradford 시약은 95% ethanol 50 ml에 Coomassie Blue G-250 100 mg을 녹인 후 이것을 다시 85% 인산 100 ml에 섞어 증류수로 최종 volume을 1 l로 하여 Whatman No. 1로 여과한 것을 사용하였다.

결과 및 고찰

β -Galactosidase의 생성조건

(1) 탄소원의 영향

탄소원을 dextrose 대신에 1.0%의 lactose를 비롯한 5종의 탄소원을 각각 첨가한 MRS broth에 *L. plantarum* 3 균주¹¹⁾(Fig. 1)를 30°C에서 48시간 동안 배양한 결과 strain No. 49, No. 61은 lactose가 효소활성에 가장 효과적이며, galactose는 strain No. 75에 가장 좋은 활성을 나타내었다 (Fig. 2). 그러나, glucose 등 다른 탄소원에서는 효소활성이 거의 없었다. 이는 Citti 등²⁰⁾의 *Streptococcus lactis* 경우 galactose는 lactose에 비해 효과적이지 못하지만 β -galactosidase의 좋은 유도제가 될 수 있다는 보고와 유사하였다.

따라서, glucose나 fructose 등에서 현저히 낮은 활성을 나타낸 것으로 미루어 lactose, galactose는 *L. plantarum*으로 부터 β -galactosidase를 생산하는 유도제로서 가장 적합하지만 glucose와 fructose 등은 부적합한 것으로 관찰되었다.

(2) 탄소원 농도의 영향

최적 탄소원인 lactose의 농도를 1.0~3.0%의 수준으로 첨가하여 30°C에서 48시간 배양한 결과 Fig. 3과 같이 strain No. 49, No. 75는 1.0%에서 가장 높은 효소활성을 나타내었으나 1.5~2.0%에서는 효소활성이 현저히 낮았고, strain No. 61은 3.0%에서 가장 높은 효소활성을 나타내었으며 1.0%에서는 65% 정도의 활성을 나타내

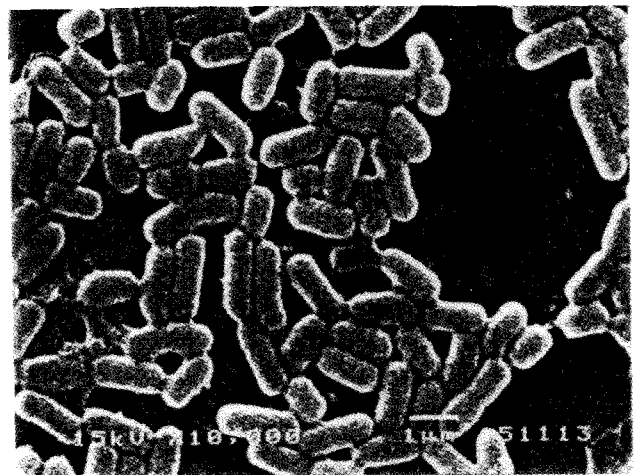


Fig. 1. Scanning electron micrographs(JEOL; Model JSM-5400) showing cell morphology(size 0.5~0.9 \times 0.6~2.7 μ m) of *L. plantarum* (No. 75) isolated from kimchi.

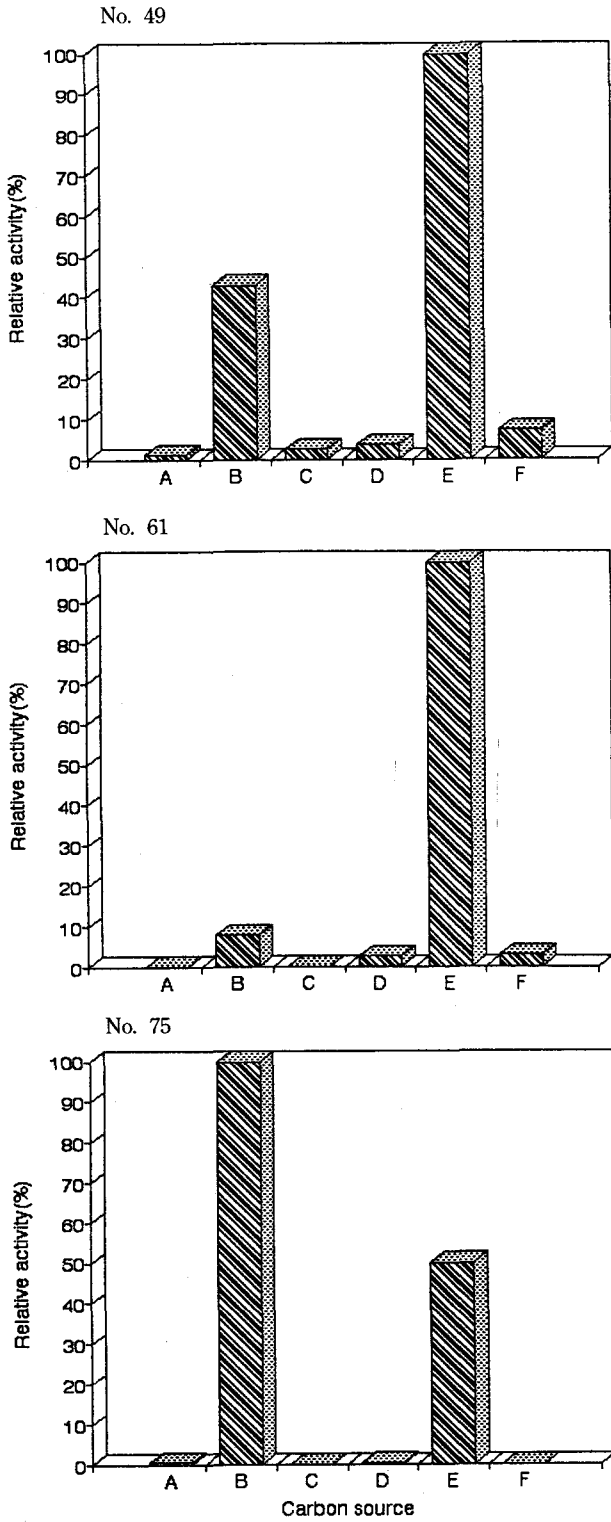


Fig. 2. Effect of various carbon sources in broth medium on the β -galactosidase production from *L. plantarum* after 48 hrs at 30°C. A, Fructose; B, Galactose; C, Glucose; D, Maltose; E, Lactose; F, Sucrose.

었다. 한편 균체성장은 농도와는 무관하게 모든 균주가 비교적 좋았으나 2.0%에서 가장 생육이 왕성하였다.

(3) 배양시간의 영향

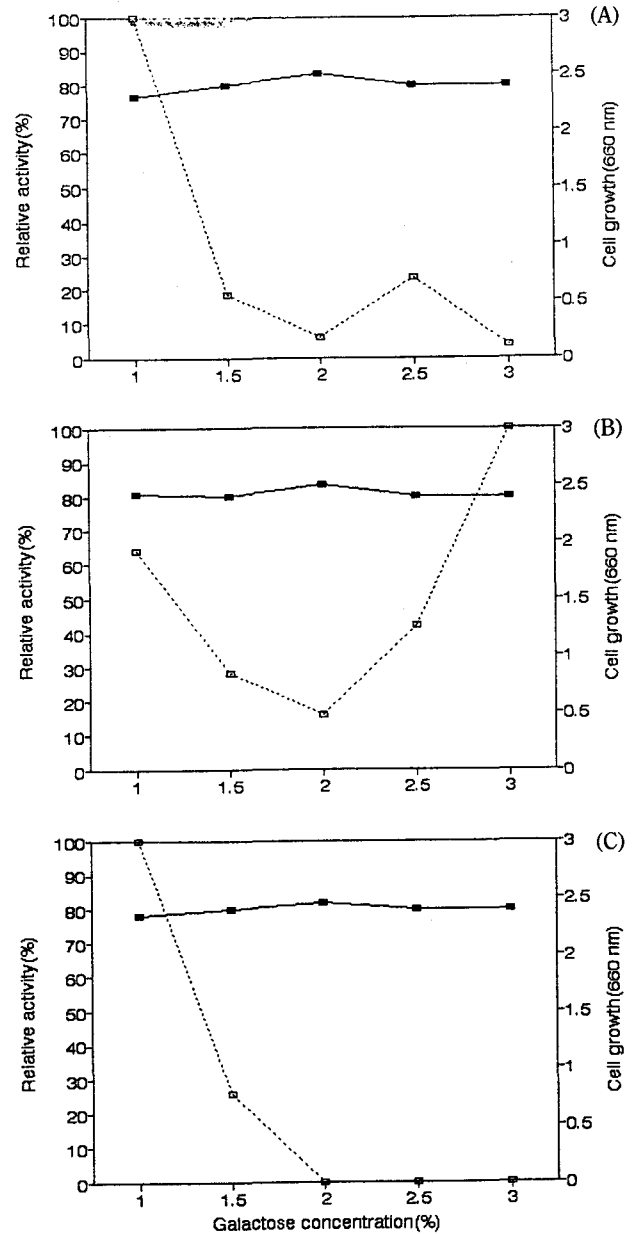


Fig. 3. Effect of lactose or galactose concentration(% W/V) in broth medium on β -galactosidase production from *L. plantarum* after 48 hrs at 30°C. A, No. 49; B, No. 61; C, No. 75.

최적 탄소원의 농도로 조정된 배지에 유산균을 접종한 후 72시간 동안 배양하면서 경시적으로 효소역가와 균체생육도를 측정 한 결과 배양 48시간에서 가장 높은 효소활성을 나타내었으며, 시간에 따른 균체생육도는 거의 일정하였다.

(4) 초기 pH의 영향

배지의 초기 pH를 5.5~7.5까지 조정하여 30°C에서 48 시간 배양한 결과 Fig. 4에서 처럼 strain No. 49, No. 75는 초기 pH 6.5에서, strain No 61은 초기 pH 7.5에서 가장 높은 효소활성을 보였으며, 모든 균주가 pH 5.5에서 가장 낮은 activity를 나타내었다. pH변화에 따른 균체생육도는 strain No. 49의 경우 거의 일정하게 유

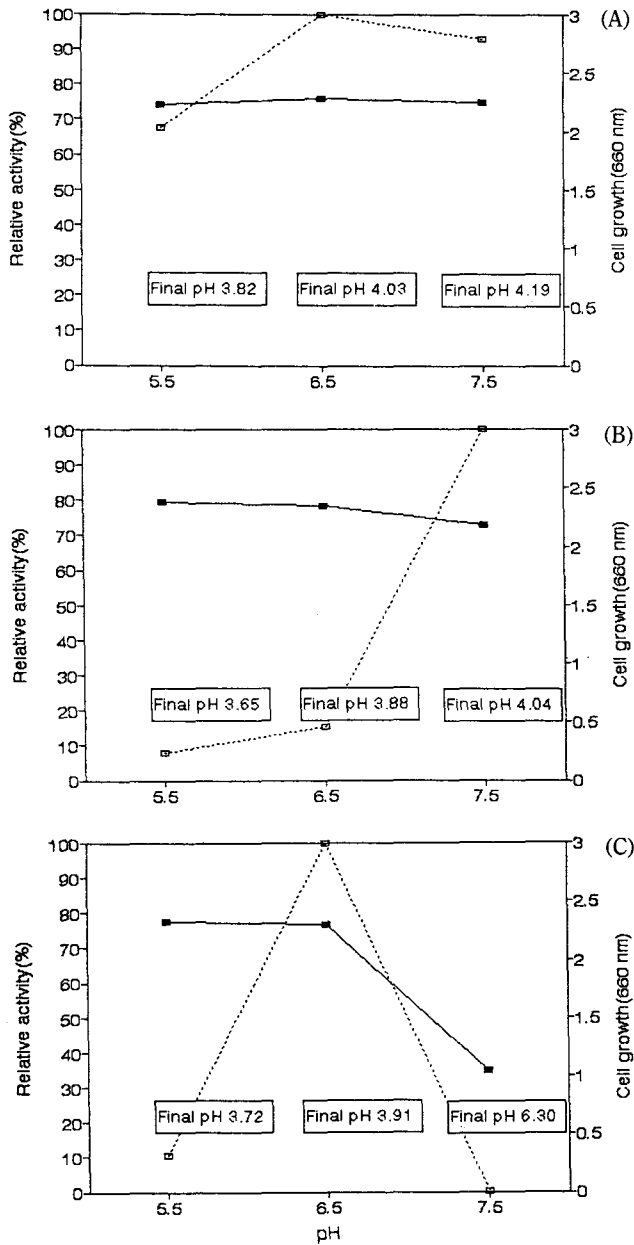


Fig. 4. Effect of initial pH in optimal broth medium on the β -galactosidase production from *L. plantarum* after 48 hrs at 30°C. A, No. 49; B, No. 61; C, No. 75.

지되었으며, strain No. 61, No. 75는 pH 6.5까지 일정하게 유지되다가 pH 7.5에서 감소하였다.

(5) 배양온도의 영향

최적 조건으로 조정된 배지를 22.5°C, 30.0°C, 37.0°C, 45.0°C에서 배양한 결과 strain No. 49, No. 75는 30°C에서 효소활성이 가장 높았으며, 균체 생육은 37°C에서 가장 높았다. Strain No. 61은 22.5°C에서 가장 높은 효소 활성을, 30°C에서 가장 높은 균체생육을 나타내었다. 45°C에서는 모든 균주가 거의 성장을 못하여 효소활성이 거의 없었다. 한편 배양액의 최종 pH는 3균주 모두 균체생육이 가장 왕성한 37°C에서 가장 낮았다(Fig. 5).

이상의 결과로써 strain No. 49의 최적 효소 생성조

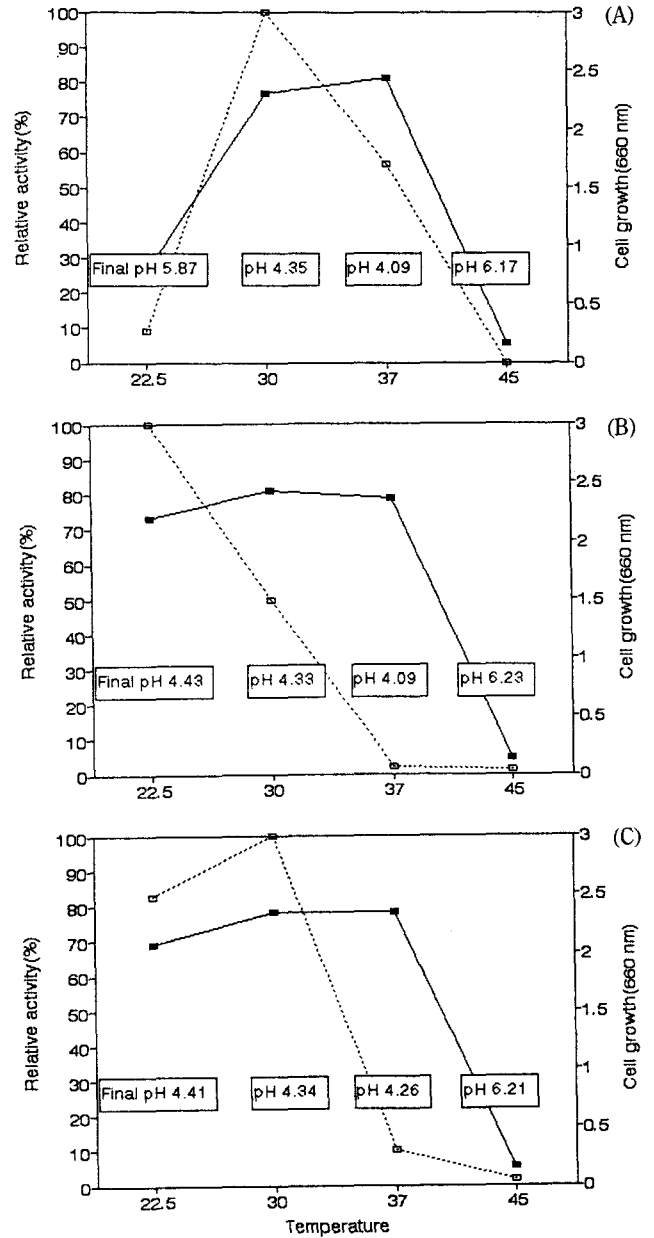


Fig. 5. Effect of cultural temperature on β -galactosidase production from *L. plantarum* after 48 hrs. A, No. 49; B, No. 61; C, No. 75.

건은 1.0% lactose 가, strain No. 75는 1.0% galactose가 첨가된 broth를 pH 6.5로 조정하여 30°C에서 48시간 배양하는 것으로 결정하였으며, strain No. 61은 3.0% lactose가 첨가된 broth를 pH 7.5로 하여 22.5°C에서 48 시간 배양하는 것으로 결정하였다.

유산균의 β -galactosidase 활성

(1) 효소의 specific 활성

β -Galactosidase의 specific 활성을 측정 비교하기 위하여 대수증식 말기에서 단백질을 정량하고 효소 활성을 측정한 결과 *L. plantarum*간의 β -galactosidase specific 활성은 strain No. 75의 경우 11.44 unit/mg protein으로

Table 1. β -Galactosidase activity of *L. plantarum* cultured in MRS broth at the late log phase

Strain No.	Protein (mg/ml)	Enzyme activity (u/ml)	Specific activity (u/mg)	Total enzyme activity (u)	Cell growth (OD ₆₆₀)
49	0.034	0.267	7.583	5.34	1.803
61	0.059	0.293	5.140	5.86	1.724
75	0.058	0.667	11.440	13.34	1.549

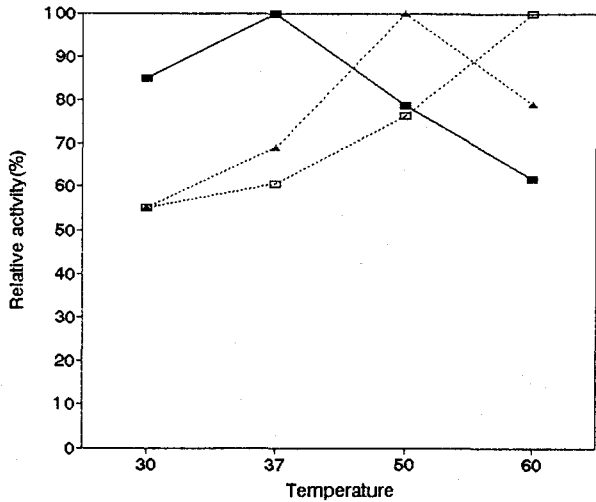


Fig. 6. Effect of temperature on the activity of β -galactosidase.

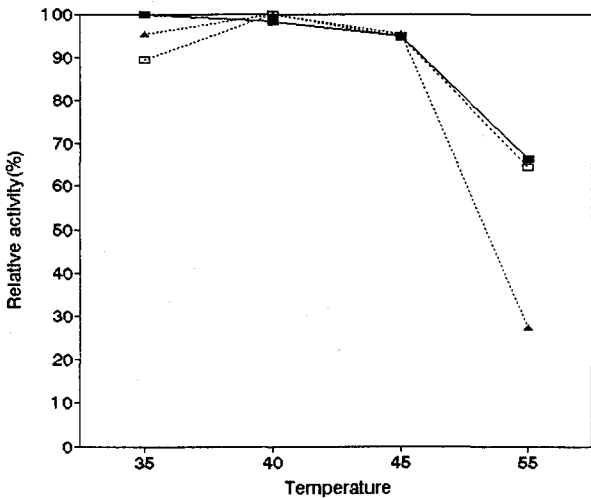


Fig. 7. Effect of heat treatment on the stability of β -galactosidase.

가장 높게 나타났으며, strain No. 61이 5.14 unit/mg protein으로 가장 낮았다(Table 1). 따라서 본 실험 결과는 대부분의 *Lactobacilli* 균종과 유사하였다.^{13,21)}

(2) 반응온도의 영향 및 열안정성

효소반응의 최적 온도조건을 조사하기 위하여 조효소액과 기질인 ONPG를 30~60°C에서 15분간 반응시킨 결과 strain No. 49는 60°C에서, strain No. 61은 37°C에서, 그리고 strain No. 75는 50°C에서 가장 높은 활성을 나타내어 3 균주 모두 *L. plantarum*으로 동정되었지만

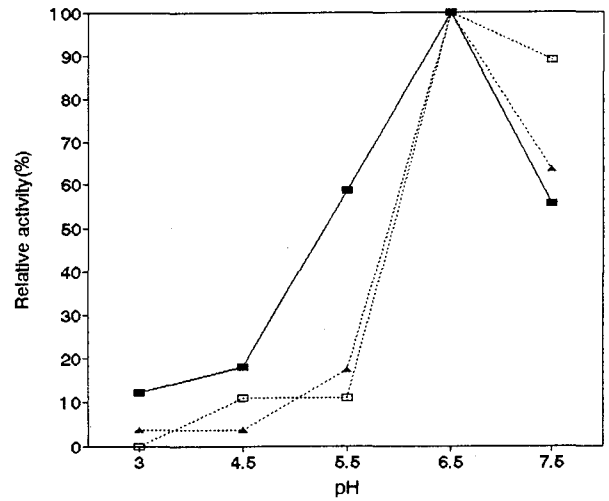


Fig. 8. Effect of pH on the activity of β -galactosidase.

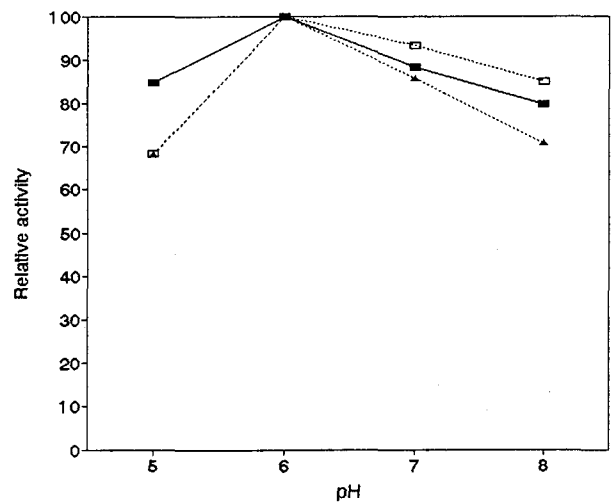


Fig. 9. Effect of pH on the stability of β -galactosidase.

각각 다른 온도에서 최고 활성이 관찰되었다(Fig. 6). 특히, strain No. 61, No. 75는 반응온도가 상승함에 따라 활성의 감소가 관찰된 반면 strain No. 49는 60°C의 높은 온도에서 가장 높은 활성을 보여 높은 온도에서도 효소활성이 소멸되지 않은 점은 주목할 만하였다. 이는 Wierzbicki 등²²⁾이 *Str. thermophilus*의 β -galactosidase 최적 온도가 30~50°C였다고 보고한 바와 유사하였다.

한편, 열에 대한 효소의 안정성을 검토하기 위하여 조효소액을 35~55°C에서 각각 10분간 열처리한 후 기질인 ONPG와 37°C에서 15분간 반응시켜 활성을 측정할 결과 3 균주 모두 35~45°C에서 비교적 높은 안정성을 유지하였으나 strain No. 49, No. 75는 40°C에서 가장 좋았다. 그러나 55°C에서 64%의 효소활성이 잔존하였고, strain No. 61은 45°C까지 안정성을 유지하다가 55°C에서 활성이 현저히 감소하여 27%의 활성이 존재하였다 (Fig. 7). 따라서 이들 세균주 모두 45°C까지 90% 이상의 안정성을 갖는 것으로 관찰되었으며, 이는 효모나 세균이 생산하는 β -galactosidase가 중온성이라는 보고와 유사

하였다.²³⁾

(3) pH의 영향 및 안정성

McIlvaine buffer와 potassium phosphate buffer를 이용하여 기질인 ONPG의 pH를 3.0~7.5까지 각각 조절한 후 37°C에서 조효소액과 15분간 반응시켜 효소의 최적 pH를 조사한 결과 3균주 모두 pH 6.5에서 최고 활성을 나타내었으며, pH 5.5에서 strain No. 61은 60%의 효소 활성을 보인 반면 strain No. 49와 strain No. 75는 20% 이하의 활성을 나타내었다. 이는 *Str. thermophilus*의 경우 pH 5.5 이하에서 효소의 활성이 현저히 저하되었다는 보고¹⁴⁾와 유사하였다. 한편, pH 7.5 이상에서는 3균주 모두 효소활성이 감소하였다(Fig. 8).

또한 효소의 pH 안정성을 구하기 위하여 pH 5.0~8.0까지의 McIlvaine buffer, potassium phosphate buffer와 조효소액(0.5 mg protein)을 1:1 비율로 혼합한 후 37°C에서 15분간 반응시킨 결과 Fig. 9에서와 같이 3균주 모두 pH 6.0에서 가장 안정하였고 그 이상의 pH에서는 점차 안정성이 감소하였으나 pH 5.0~8.0까지 비교적 안정하였다.

참 고 문 헌

- 이성우 (1975) 중·한·일에서 김치류의 변천과 교류에 21111 관한 연구. 한국영양식품학회지 **4**(1), 71-95.
- 이서래 (1989) 김치의 맛과 영양. 식품과 영양 **8**(2), 20-22.
- Mheen, T. I. and T. W. Kwon (1984) Effect of temperature and salt concentration on kimchi fermentation. *Korean J. Food Sci. Technol.* **16**(4), 443-450.
- 민태익, 권태완 (1984) 김치발효에 미치는 온도 및 식염 농도의 영향. 한국식품과학회지 **16**, 443.
- 김치의 과학(1994) 한국식품과학회, 226-245.
- Tumerman, L., H. Fram and K. W. Conely (1954) The effect of lactose crystallization on protein stability in frozen concentrated milk. *J. Dairy Sci.* **37**, 830.
- Rosensweig, N. S. (1969) Adult human milk intolerance and intestinal lactose deficiency. A review. *J. Dairy Sci.* **52**, 585.
- Young, C. K., J. W. Stull, R. R. Tayler, 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.
- Goncalves, J. A. and F. J. coetillo. (1982) Partial purification and characterization of β -D-galactosidase from *Kluyveromyces marxianus*. *J. Dairy Sci.* **65**, 2088.
- Alpers, D. H (1969) Separation and isolation of rat and human intestinal β -galactosidase. *J. Biol. Chem.* **224**, 1238-1246.
- 이영환, 강미선 (1996) 김치에서 분리한 유산균 *Lactobacillus plantarum*의 이화학적 특성 및 β -galactosidase 활성. 한국농화학회지, **39**(1), 54-59.
- Demam, J. C., M. Rogosa and M. E. Shape (1960) A medium for the cultivation of *lactobacilli*. *J. Appl. Bacteriol.* **23**, 130.
- Toba, T., Y. Tomita, T. Itoh, and S. Adachi (1981) β -Galactosidase of lactic acid bacteria: Characterization by oligosaccharides formed during hydrolysis of lactose. *J. Dairy Science*, 185.
- Wierzbicki, L. E. and F. V. Kosikowski (1971) Preparation and characterization of lactase(β -galactosidase) for microbial. *J. Dairy Sci.* **54**, 763.
- Lederberg, J. (1950) The β -D-galactosidase of *E. coli* strain K-12. *J. Bacteriol.* **60**, 381.
- Ramana Rao, M. V. and S. M. Dutta (1981) Purification and properties of beta-galactosidase from *Streptococcus thermophilus*. *J. Food Sci.* **46**, 1419-1423.
- Shan, N. and P. Jelen (1990) Survival of lactic acid bacteria and their lactases under acidic conditions. *J. Food Sci.* **55**, 506-509.
- Perrin Boyd Dempsey, D. D. (1974) Buffers for pH and metal ion control. Chapman and Hall Ltd, 153.
- Daniel M. Bollag, Stuart J. Edelstein (1991) Protein methods. Wiley-Liss Inc., 50-55.
- Citti, J. E., W. E. Sandine, and P. R. Elliker (1965) β -Galactosidase of *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.* **89**, 937.
- Itoh, T., M. Suzuki, and S. Adachi (1982) Production and characterization of β -galactosidase from lactose-fermenting yeasts. *Agric. Biol. Chem.* **46**, 899.
- Kang, K. H. and S. I. Park (1989) *Streptococcus thermophilus* 510 에 의한 β -galactosidase의 생산, 정제 및 특성. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **17**, 35.
- Kosikowski, F. V. and L. E. Wierzbichi (1971) Preparation and characterization of lactose for microbial sources. *J. Dairy Sci.* **54**, 763.

Characteristics of β -galactosidase activity in *Lactobacillus plantarum* from kimchi

Young-Hwan Rhee* and Mi-Seon Kang (Department of Agricultural Chemistry College of Agriculture, Chonnam National University Kwangju 500-757 Korea)

Abstract : To investigate a possible application of three strains of lactic acid bacteria (strain No. 49, No. 61, No. 75) from kimchi in milk fermentation industry, the optimal condition for production of intracellular β -galactosidase from *Lactobacillus(L.) plantarum* and its enzymatic properties were examined. The preferable carbon source of the medium for strain No. 49 in production of β -galactosidase was MRS broth with 1.0% lactose instead of dextrose at pH 6.5, for strain No. 75 with 1.0% galactose and for strain No. 61 with 3.0% lactose at pH 7.5, respectively. The maximum enzyme production from strain No. 49, No. 75 was observed after 48 hours culture at 30°C in a medium containing the appropriate carbon source, from strain No. 61 after 48 hours culture at room temperature. The optimum temperature for β -galactosidase activity from *L. plantarum* was 60°C for strain No. 49, 37°C for strain No. 61 and 50°C for strain No. 75, respectively. The heat stability of enzyme activities for all three strains remained 90% at 45°C. The optimal pH was pH 6.5 and enzyme activities were most stable at pH 6.0 for all three bacteria.

*Corresponding author