

*Weissella cibaria*가 생산하는 α -Galactosidase 및 β -Glucosidase의 특성

홍성욱 · 류래균 · 정병문¹ · 김완식¹ · 정건섭*
연세대학교 생명과학기술학부, ¹매일유업(주) 중앙연구소

Characterization of α -Galactosidase and β -Glucosidase by *Weissella cibaria*. Hong, Sung Wook, Lae Kyun You, Byung Moon Jung¹, Wan Sik Kim¹, and Kun Sub Chung*. Division of Biological Science and Technology, Yonsei University, Wonju 220-710, Korea, ¹R&D Center, Maeil Dairies Co. Ltd., Pyungtaek 451-861, Korea – A strain producing α -galactosidase and β -glucosidase was isolated from Kimchi. The isolated strain was identified as *Weissella cibaria* by 16S rDNA analysis and designated as *Weissella cibaria* K-M1-4. The enzyme activity of α -galactosidase and β -glucosidase reached the maximum in the soy medium at 37°C for 24 hr. The enzymes were purified by ethanol fractionation, DEAE sepharose fast flow, and sephacryl S-100HR column chromatography. α -Galactosidase specific activity was shown by 576 Units/mg protein and the yield was 3.5% of the total activity of crude extracts. β -glucosidase specific activity was shown by 480 Units/mg protein and the yield was 2.9% of the total activity of crude extracts. The optimum temperature for α -galactosidase was 60°C and 43% of its original activity remained when it was treated at 80°C for 30 min. For α -galactosidase shows the optimum pH of 8.0 and is fairly stable between pH5.0 and pH9.0. The enzyme activity was increased in the presence of Fe²⁺ and Cu²⁺. The value of Km and Vmax for the enzyme were 0.98 mM and 1.81 μ mole/min, respectively. The β -glucosidase has the optimum temperature of 50°C and 46% of its original activity remained when it was treated at 80°C for 30min. Its optimum pH of 7.0 and is fairly stable between pH5.0 and pH9.0. The enzyme activity was increased in the presence of Fe²⁺, Co²⁺ and Cu²⁺. The value of Km and Vmax for the enzyme were 1.24 mM and 6.81 μ mole/min, respectively.

Key words: Kimchi, *Weissella cibaria*, α -galactosidase, β -glucosidase

서 론

대두는 단백질 및 지방질 함량이 높은 식품 또는 각종 가공식품 원료 중의 하나이다. 대두에는 이소플라본(isoflavone), 식이성 섬유(dietary fiber), 올리고당(oligosaccharide), 레시틴(lecithin), 사포닌(saponin), 식물성 sterol과 phenol 화합물 등과 같은 생리활성 물질이 함유되어 있으며, 대두 이소플라본은 여성 호르몬인 estrogen과 유사한 구조와 작용을 가지고 있어 식물성 에스트로젠(phytoestrogen)이라 부른다[22]. 과거에는 그 특유의 맛으로 인해 대두식품의 불쾌한 맛 성분에 관한 연구가 많았으나[9], 혈중 콜레스테롤을 낮추고 폐경기 여성의 골다공증을 예방[1, 19, 22]할 뿐만 아니라 항산화 활성에 의한 심혈관질환 억제[16, 17]와 항암효과[15, 24] 등과 같은 이소플라본의 생리적 활성이 활발하게 보고되고 있다. β -glucosidase(β -D-glucoside glucohydrolase, EC 3.2. 1.21)는 하나의 cellulase compound로서 cellulose를 최초로 endo-glucanase가 절단하며 그 다음 cellobiohydrolase가 작용하고 마지막에 β -glucosidase가 작용하여 최

종산물인 glucose를 생성한다고 알려져 있다[12]. 미생물 기원의 β -glucosidase에 관한 연구는 *Bifidobacterium* sp. [26], *Sporotrichum cellulophilum*[11], *Aspergillus niger* [25], *Aspergillus nidulans*[6] 등이 생산한 β -glucosidase가 이소플라본 배당체의 가수분해에 관여한다고 하였다. 대두 중에 존재하는 유해성분으로는 trypsin inhibitor[8], hemagglutinin[8], 무기질의 흡수를 억제하는 phytate[18]와 flatulence factor[21] 등이 알려져 있다. 가스발생 인자인 stachyose와 raffinose는 대두에 상당량 함유되어 있으며, 인체 내에서는 소화기관 내에 α -galactosidase가 결핍되어 있어 이들 oligosaccharides는 완전히 소화, 흡수되지 않고 장 내에 있는 *Clostridium* sp.와 *Bacteroides* sp.에 의해 발효가 되어 H₂, CO₂, 메탄 등의 가스 형성에 의한 복부 팽만감과 장의 고창, 복통, 복명 등의 원인이 되고 있다[23]. Stachyose, raffinose와 같은 oligosaccharides를 분해하는 효소인 α -galactosidase(α -D-galactoside galactohydrolase, EC 3.2.1.22)는 동물, 식물, 미생물 등에 널리 분포되어 있으며, galactose 잔기를 함유한 galactomannan, melibiose, raffinose, stachyose와 같은 oligosaccharides에서 α -1,6 결합의 α -galactose 잔기를 가수분해한다[4]. 미생물 기원의 α -galactosidase에 관한 연구는 *Aspergillus niger*[3], *Saccaromyces cerevisiae*[5], *Hansenula polymorpha*[5], *Bifidobacterium*

*Corresponding author

Tel: 82-33-760-2252, Fax: 82-33-760-2183
E-mail: kschung@yonsei.ac.kr

longum[7], *Bacillus licheniformis*[10], *Scopulariopsis brevicaulis*[2], *Escherichia coli*[13], *Streptomyces sp.*[14] 등에서 생산하는 α -galactosidase 효소와 그 유전자의 특성이 밝혀져 보고되었다. 따라서 본 연구에서는 대두의 발효를 통하여 생리활성을 가지고 있는 이소플라본 aglycone 함량을 높이기 위한 β -glucosidase와 대두에 다량 함유되어 있는 stachyose, raffinose와 같은 난소화성 oligosaccharides를 분해하기 위한 α -galactosidase를 생산하는 미생물을 선발 및 동정하였으며, 선발미생물이 생산하는 효소를 분리, 정제하여 이화학적 특성을 확인하고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

미생물 분리 및 사용배지

유제품, 김치, 돼지고기 소의 장 내용물, 채소류, vaginal tract, 유아분변, 청국장 등에서 각각 시료 1g을 채취하여 멸균 생리식염수를 이용하여 순차적으로 심진회석한 후 soy agar medium에 도말하여 37°C에서 24시간동안 배양한 후, 노란색을 띠는 집락의 형태에 따라 서로 다른 미생물을 분리하였다. 혐기성 미생물의 분리를 위해 anaerobic system Gaspack(BBL, Becton Dickinson, USA)을 이용한 혐기 배양기에 37°C에서 24시간동안 배양하였다. 표준균주와 분리균주는 효소 생산용 soy medium을 사용하여 37°C에서 24시간동안 계대배양하여 실험에 사용하였다. α -Galactosidase 및 β -glucosidase를 생산하는 미생물을 분리하기 위하여 대두를 원료로 한 soy medium을 제조하여 사용하였다. Soy medium 제조는 대두(충북 괴산군 2005산)와 증류수(1:4)를 121°C에서 15분간 열처리한 후, 여과망을 이용하여 대두를 제거하고 그 여과액의 pH를 3.5로 조절한 다음, 4°C에서 6시간 정치하여 침전된 단백질을 filter paper(Whatman, England)로 제거하였다. 그 여과액의 pH를 6.5로 재조정하여 제조하였다. 고체배지는 여기에 1.5%(w/v) agar와 0.005%(w/v) bromocresol purple(Yakuri chemicals Co., Japan)을 첨가하고 121°C에서 15분간 멸균하여 제조하였다.

효소활성 측정

효소 생산용 액체배지에서 배양한 후에 원심분리(10,000×g, 5 min)하여 회수한 상등액을 extracellular 조효소액으로 사용하였다. 균체를 회수하여 phosphate buffered saline(PBS)으로 2회 수세한 후, 균체는 초음파 세포파쇄기(Sonoscasher, Ulssco Hitech Co., Korea)를 이용하여 5분간 sonication을 실시하였다. 그리고 다시 원심분리(10,000×g, 5 min)하여 회수한 상등액을 intracellular 조효소액으로 사용하였다. 효소 활성은 Yeo 등의 방법[26]에 따라 수행하였다. 기질은 50 mM sodium phosphate buffer(pH 6.5)에 ρ -nitrophenyl- α -D-galacto-pyranoside(PNPG, Sigma, USA)와 ρ -nitrophenyl- β -D-gluco-pyranoside(PNPG, Sigma, USA)를 10 mM이 되

도록 각각 제조한 후, 100 μ L의 기질용액에 조효소액을 각각 100 μ L씩 첨가하여 37°C에서 10분간 반응시킨 후 0.5 M Na_2CO_3 용액 100 μ L를 첨가하여 반응을 중지시켜 유리된 ρ -nitrophenol(PNP, Sigma, USA)의 양을 400 nm에서 흡광도로 측정하였다. 효소활성 단위는 1분 동안에 1 mole의 PNP를 유리시키는데 필요한 효소량을 1 unit으로 정의하였다.

단백질 정량

단백질의 정량은 Ohnishi 등[20]의 정량법에 따라 실시하였다. 시료용액(50 μ L)에 550 μ L의 biuret reagent(0.75 mmol/L cupric sulfate, 94 mmol/L sodium hydroxide)를 넣어 혼합한 후, 실온에 10분간 방치하였다. 그 후에 25 μ L의 folin and ciocalteu's phenol reagent(Sigma, USA)를 넣고 실온에 30분동안 방치한 후, 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 검량 곡선 작성을 위한 표준물질은 bovine serum albumin (Sigma, USA)을 사용하였다.

미생물 동정

분리 선발한 미생물의 동정은 Gram 염색과 현미경 관찰을 통해 형태학적 특성을 조사하였다. API 50 CHL kit(bio-Merieux Co., France)로 49개의 탄소원에 대한 이용성을 조사하고 이 결과를 API 50 CHL database V3.0(<http://apiweb.biomerieux.com>)을 이용하여 잠정적으로 동정하였다. 보다 더 정확한 동정을 위하여 16S ribosomal DNA gene sequencing 분석을 통하여 동정하였다. 선발미생물의 chromosomal DNA를 분리한 다음 16S rDNA sequencing에 일반적으로 사용하는 27F(5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3')와 1492R(5'-GGATACCTTGTACGACTT-3') primer를 사용하여 94°C에서 1분간 denaturation, 51°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분30초동안 polymerization을 시키는 조건에서 PCR(MinicyclerTM, MJ research Inc., USA)로 증폭하였다. 증폭된 약 1400 bp의 fragment를 T vector (Invitrogen, USA)에 결합시킨 후 형질전환하였다. T vector sequencing primer를 이용하여 염기서열 결정을 수행하였으며 그 결과는 BLAST search(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) program을 이용하여 GENBANK(NCBI, USA)의 ribosomal DNA gene sequencing과 비교하여 동정하였다.

효소의 분리 및 정제

선발미생물이 생산하는 효소를 정제하기 위하여 soy medium 액체 배지를 사용하여 37°C, 24시간동안 배양한 후, 배양액을 원심분리(10,000×g/15 min)하여 상등액을 취하였다. 배양 상등액에 3배 용량의 cold ethanol을 첨가하여 서서히 교반하였다. 침전물의 에탄올을 제거하기 위해 진공 데시케이터에서 1-2시간 방치한 후, 50 mM sodium phosphate buffer(pH 6.5)를 첨가하여 현탁하였다. 이 시료를 DEAE Sepharose Fast Flow(Pharmacia, Sweden) column(25×350

mm)에 적용하여 DEAE Sepharose에 결합시킨 후, 0-1 M NaCl를 linear gradient하게 3 mL/min 유속으로 용출하여 5 mL씩 80개 분획을 받았다. 효소활성을 측정하여 활성분획만을 모아 dialysis 장치(6-8 kDa cut-off)를 사용하여 4°C에서 18시간동안 투석하였다. 위의 과정에서 얻어진 시료는 Sephacryl S-100HR(Pharmacia, Sweden) column(18×350 mm)을 사용하여 gel filtration을 수행하였다. Gel filtration에서 용출액은 증류수로 하였고 용출속도는 1.0 mL/min으로 2 mL씩 분획하였다. 효소활성 분획만을 모아 동결건조하여 정제하였다.

pH 및 온도에 대한 안정성

효소에 대한 pH의 영향을 알아보기 위해 pH별로 적합한 buffer를 이용하였는데 pH 2.0은 0.1 M citrateHCl buffer, pH 3.0은 0.1 M glycineHCl buffer, pH 4.0-5.0은 0.1 M sodium acetate buffer, pH 6.0-10.0은 0.1 M TrisHCl buffer, pH 11.0은 0.1 M glycineNaOH buffer를 이용하였다. pH 안정성은 조효소액과 정제된 효소액 각각 10 µL에 pH 2.0-11.0의 buffer를 각각 190 µL씩 가하여 30°C에서 12시간 방치한 후 잔존효소 활성을 50 mM sodium phosphate buffer(pH 6.5)를 사용하여 45°C에서 10분간 반응하여 측정하였다. 효소에 대한 온도의 영향은 10°C부터 90°C까지 10°C간격으로 측정하였다. 최적반응 온도는 효소액과 기질 용액을 10분간 반응시킨 후, 활성을 측정하였고, 온도 안정성은 효소액을 각 온도에서 30분간 처리한 후 잔존효소 활성을 ρ -nitrophenyl- α -D-galacto-pyranoside(PNPG)와 ρ -nitrophenyl- β -D-gluco-pyranoside(PNPG)를 사용하여 45°C에서 10분간 반응하여 측정하였다.

효소의 금속이온에 대한 영향

효소의 금속이온에 대한 영향을 알아보기 위해 ρ -nitrophenyl- α -D-galacto-pyranoside(PNPG)와 ρ -nitrophenyl- β -D-gluco-pyranoside(PNPG)에 Zn^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} 금속이온들을 최종농도가 2 mM이 되도록 첨가한 후 잔존효소 활성을 45°C에서 10분간 반응하여 측정하였다.

효소의 Km 및 Vmax 측정

효소의 Km 및 Vmax를 측정하기 위해 농도별 기질 용액 [s]의 반응정도[v]를 측정한 후 1/[s]에 대해 1/v를 plot하는 방법인 Lineweaver-Burk plot을 그렸고 이를 통하여 Km값과 Vmax 값을 계산하였다. 이때, 각 기질 농도에서의 효소 활성을 50 mM sodium phosphate buffer(pH 6.5)를 사용하여 45°C에서 10분간 반응하여 측정하였다.

이소플라본 및 탄수화물의 함량변화

Soy broth medium에서 선발미생물을 37°C에서 48시간동

안 배양한 후, 배양액을 취하여 원심분리(10,000×g/15 min)하고 상등액을 취하여 동결건조하였다. 이소플라본 분석은 동결건조 시료 0.5 g에 70% 메탄올을 20 mL 가하여 10분간 sonication 시키고 20분간 진탕하였다. 그리고 10,000rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 취한 후 0.2 µm membrane filter(Advantec, Japan)로 여과하여 HPLC(Agilent 1100 series, USA) 분석을 수행하였다. Column은 Eclipse XDB-C18(4.6×150 mm), mobile phase A는 0.1% phosphoric acid, mobile phase B는 acetonitrile을 linear gradient하게 0.8 mL/min의 flow rate으로 용출하였으며, UV detector (255 nm)으로 검출하였다. 탄수화물 분석은 동결건조 시료 0.5 g에 증류수 4 mL를 첨가하고 80°C 항온수조에서 2시간 진탕한 후 에탄올 10 mL를 첨가하여 80°C 항온수조에서 30분간 시료내의 당을 추출하였다. 그리고 10,000×g에서 5분간 원심분리하여 상등액을 취한 후 0.2 µm membrane filter로 여과하여 HPLC 분석을 수행하였다. Column은 Sugar-Pak TM1(6.5×300 mm)을 사용하여 80°C로 유지하였으며, mobile phase는 water를 0.5 mL/min의 flow rate으로 용출하였으며, refractive index detector(Waters, USA)으로 검출하였다.

결과 및 고찰

시료로부터 미생물의 분리 및 선발

미생물 분리시료에서 각각 1 g을 채취하여 멸균 생리식염수로 연속 희석을 하였다. 0.005%(w/v) bromocresol purple을 첨가한 soy plate agar에 각종 희석액 100 µL씩 도말하여 37°C에서 24시간동안 배양한 후에 산이 생성되어 노란색으로 변한 colony의 형태가 서로 다른 미생물 491주를 분리하였다. 이 중 통성혐기성 균주는 422주이고 혐기성 균주는 69주이었다. α -Galactosidase 및 β -glucosidase가 기질인 PNPG를 분해하면 ρ -nitrophenol(PNP)이 분리되면서 노란색을 나타내므로 역가가 높을수록 진한 노란색을 나타낸다. 통성혐기성 균주 422주와 혐기성 균주 69주의 효소활성은 ρ -nitrophenol의 표준곡선에서 정량하였으며, α -galactosidase 및 β -glucosidase 효소활성이 높은 균주 192주를 1차 선발하였고 동일한 방법으로 1차 선발균주들의 효소활성을 비교하여 균주 48주를 2차 선발하였다(Data not shown). 3차 선발은 채소류에서 분리한 isolate 89, virginal tract에서 분리한 isolate V13-4, 김치에서 분리한 isolate K-M1-4 및 isolate K-AP3, 유아분변에서 분리한 isolate BF-BW-31, 청국장에서 분리한 isolate CMB 16 및 isolate S2C5 등 분리균주 7주를 선발하였는데(Table 1), 그 중에서 α -galactosidase 활성(26.3 unit/mL) 및 β -glucosidase 활성(27.1 unit/mL)을 나타낸 isolate K-M1-4을 최종선발하여 α -galactosidase 및 β -glucosidase 효소특성을 비교하였다. 대부분의 균주들이 intracellular 효소활성보다는 extracellular 효

소활성이 더 높은 것으로 나타났다.

선발미생물의 동정

효소활성이 가장 높은 isolate K-M1-4를 현미경으로 관찰한 결과 Gram 양성 간균이었으며 당이용성 검토를 위하여 API 50 CHL kit test를 실시하여 동정한 결과 *Lactobacillus coprophilus*와 92.3%의 상동성을 나타내었다(Data not shown). 보다 더 정확한 동정을 위하여 선발미생물의 16S ribosomal DNA 분석을 실시하였다. 16S rDNA gene sequence를 BLASTN의 데이터와 비교하여 분자 생물학적 연관성을 나타내는 계통도를 얻었다(Fig. 1). 이 결과에 따르면 선발미생물은 *Weissella cibaria* LMG17699^T와 가장 가까운 유연 관계로 보였다. 따라서 선발미생물을 *Weissella cibaria*로 동정하고 *Weissella cibaria* K-M1-4이라 명명하였다.

효소의 분리와 정제

Weissella cibaria K-M1-4의 배양상등액을 에탄올 침전하고 DEAE Sepharose ion-exchange chromatography(Fig. 2)를 행하였다. NaCl의 농도를 0-1 M linear gradient하게 용출시켰을때, 효소활성은 fraction number 49에서부터 61사이에서 나타났다. 이들 효소활성 분획을 따로 모아 dialysis 장치(6-8 kDa cut-off)를 사용하여 4°C에서 18시간동안 투석하고 동결건조한 후, 50 mM sodium phosphate buffer(pH 6.5)에 현탁하였다. 그리고 나서 효소활성 분획은 Sephacryl S-100HR을 사용한 gel filtration을 수행하여 효소활성 분획인 fraction number 26에서부터 33사이를 모았다. α -Galactosidase 및 β -glucosidase의 활성은 fraction에 전부 포함되었고 각 효소의 활성은 거의 중첩되었다(Fig. 3). 각 fraction은 동결건조하여 농축하였다. 이때 α -galactosidase의 배양액 비활성은 108 units/mg이었고, 마지막 gel filtration 정제에 의하여 5.3배 정제되었다(Table 2). β -glucosidase의

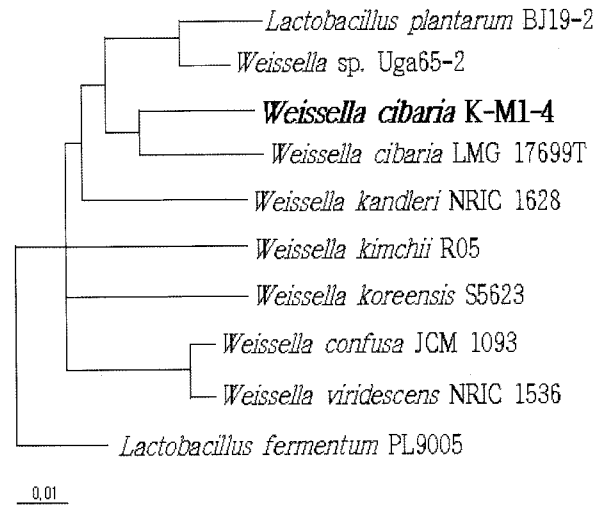


Fig. 1. Phylogenetic tree of *Weissella* sp. K-M1-4 through 16S rDNA gene sequence homology. 16S rDNA gene sequencing of the isolate was performed by PCR. The universal primers used for amplification of a partial 16S rDNA fragment of the isolate were 27F and 1492R. They were ligated into a T vector, and their products were sequenced using an ABI 377 Genetic Analyzer. The 16S rDNA sequence was aligned with reference sequences obtained from the GenBank databases, using the Blast searches.

배양액 비활성은 110 unit/mg이었고, 마지막 gel filtration 정제에 의하여 4.4배 정제되었다(Table 3).

최적반응 pH 및 pH 안정성 측정

정제한 효소액은 p -nitrophenyl- α -D-galacto-pyranoside (PNPG)와 p -nitrophenyl- β -D-gluco-pyranoside(PNPG)를 사용하여 각각의 α -galactosidase 활성과 β -glucosidase 활성을 측정하였다. 효소에 대한 pH의 영향을 알아보기 위해 pH별로 적합한 buffer를 이용하였는데 pH 2.0는 citrate·HCl

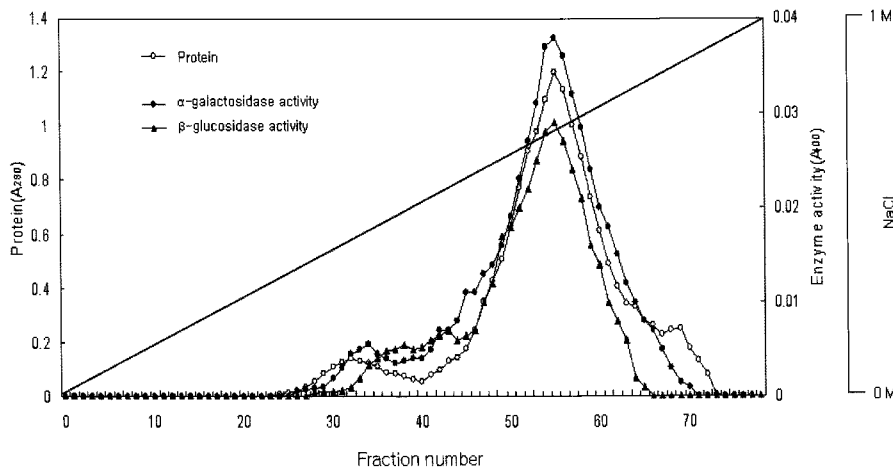


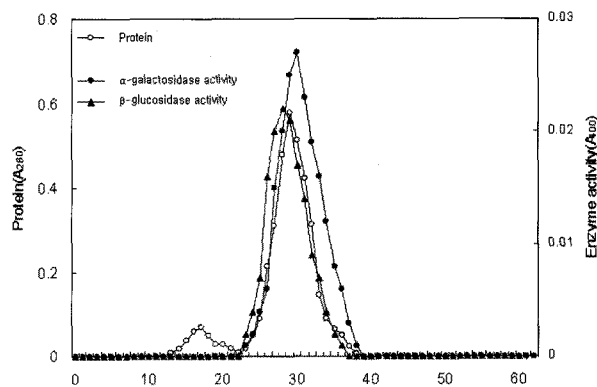
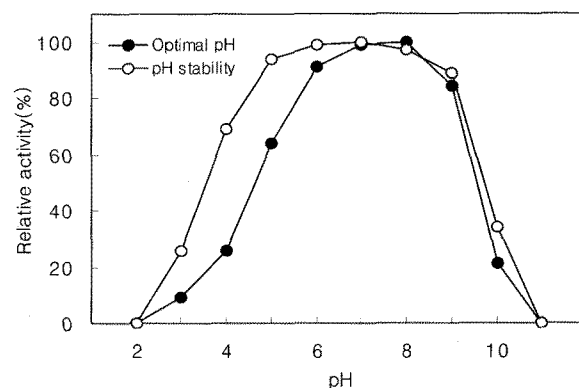
Fig. 2. Ion exchange chromatogram of crude enzymes on a DEAE Sepharose column. The bed dimension was 25 by 350 mm. The eluant was 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5) with a linear salt gradient to 1 M NaCl at a flow rate 3 mL/min. The volume of each fraction was 5 mL. Absorbances of protein and enzyme activity were 280 nm and 400 nm, respectively.

Table 1. α -Galactosidase and β -glucosidase activity from selected isolates

Isolates	α -galactosidase activity (Unit/mL)		β -glucosidase activity (Unit/mL)	
	Extracellular Intracellular		Extracellular Intracellular	
89	16.2	15.7	17.0	15.7
V13-4	17.9	15.2	16.5	15.2
K-M1-4	26.3	15.3	27.1	16.2
K-AP3	17.1	15.0	17.6	14.3
BF-BW-31	17.4	17.0	17.5	15.3
CMB 16	14.6	13.1	15.3	14.0
S2C5	14.0	12.3	14.4	13.1

The isolates were grown in soy liquid medium for 24hr at 37°C. The α -galactosidase activity and β -glucosidase activity were assayed by using p -nitrophenyl- α -D-galacto-pyranoside (PNPG) and p -nitrophenyl- β -D-gluco-pyranoside (PNPG) as the substrate, respectively.

buffer, pH 3.0은 glycine·HCl buffer, pH 4.0-5.0은 sodiumacetate buffer, pH 6.0-10.0은 Tris·HCl buffer, pH 11.0은 glycine·NaOH buffer를 사용하였다. α -Galactosidase는 pH 8.0에서 최대 활성을 나타내었으며, pH 5.0-9.0 사이에서 안정함을 보였다. pH 10.0 이상에서는 효소 활성이 급격히 감소하여 pH 11.0에서는 효소 활성이 소실하였다(Fig. 4). β -Glucosidase의 경우, pH 7.0에서 최대 활성을 나타내었고, pH 안정성은 α -galactosidase의 특성과 유사하였다(Fig. 5). Yeo 등[26]의 보고에 의하면 *Bifidobacterium* sp. Int-57이 생산한 α -galactosidase의 최적 pH는 7.0이었고, *Bacillus licheniformis* YB-42[10]이 생산한 α -galactosidase는 pH 6.5, *Streptomyces* sp. YB-4[14]이 생산한 α -galactosidase는 pH 6.0, *Scopulariopsis brevicaulis*[2]이 생산한 α -galactosidase는 pH 7.0이었고, pH 6.0-8.0 사이에서 안정하였다고 보고하였다. *Bifidobacterium* sp. Int-57이 생산한 β -glucosid-

**Fig. 3.** Sephacryl S-100HR column chromatogram of DEAE Sepharose the enzyme fractions. The crude enzyme was eluted with H₂O at a flow rate 1.0 mL/min. The volume of each fraction was 2 mL. Absorbances of protein and enzyme activity were 280nm and 400nm, respectively.**Fig. 4.** Effect of pH on α -galactosidase activity and stability. For the pH stability, purified enzyme was preincubated at various pH buffer for 12 hr and the remaining activity was measured at pH 7.0 for 10 min. The 0.1 M buffers were used as follows: citrate·HCl (pH 2.0); glycine·HCl (pH 3.0); sodium·acetate (pH 4.0-5.0); Tris·HCl (pH 6.0-10.0); glycine·NaOH (pH 11.0).**Table 2.** Purification summary of α -galactosidase from *Weissella cibaria* K-M1-4

Purification step	Total protein(mg)	Total activity (Units)	Specific activity (Units/mg)	Purification (fold)	Yield(%)
Culture supernatant	777.8	84000	108	1.0	100.0
Ethanol precipitation	56.5	17808	315	2.9	21.2
DEAE-sepharose	12.5	6300	504	4.7	7.5
Sephacryl S-100HR	5.2	2940	576	5.3	3.5

Table 3. Purification summary of β -glucosidase from *Weissella cibaria* K-M1-4

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (Units)	Specific activity (Units/mg)	Purification (fold)	Yield(%)
Culture supernatant	777.8	85558	110	1.0	100.0
Ethanol precipitation	56.5	14238	252	2.3	16.6
DEAE-sepharose	12.5	5250	420	3.8	6.1
Sephacryl S-100HR	5.2	2496	480	4.4	2.9

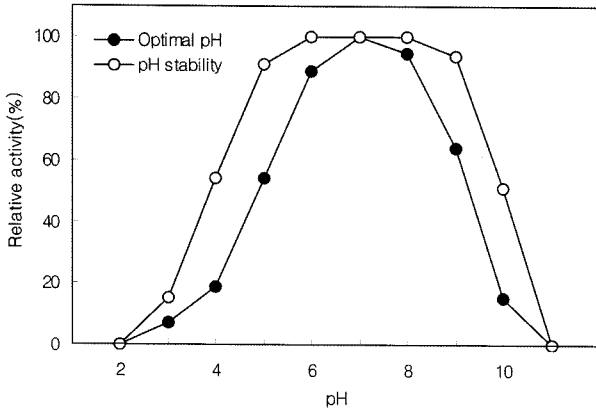


Fig. 5. Effect of pH on β -glucosidase activity and stability. For the pH stability, purified enzyme was preincubated at various pH buffer for 12 hr and the remaining activity was measured at pH 7.0 for 10 min. The 0.1 M buffers were used as follows: citrate· HCl (pH 2.0); glycine· HCl (pH 3.0); sodium· acetate (pH 4.0-5.0); Tris· HCl (pH 6.0-10.0); glycine· NaOH (pH 11.0).

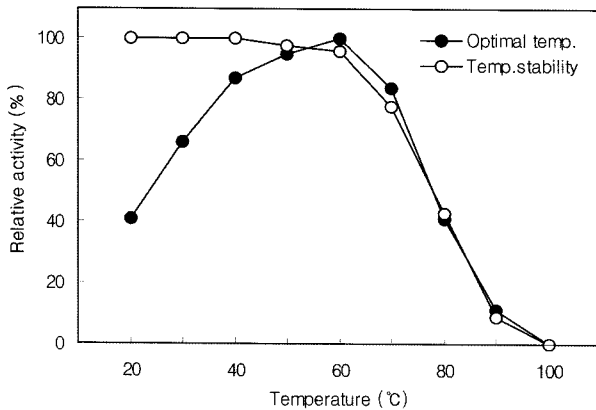


Fig. 6. Effect of temperature on α -galactosidase activity and stability. For the temperature stability, purified enzyme was preincubated at various temperatures for 30 min and the remaining activity was measured.

ase는 pH 7.0에서 최적이었으며, pH 4.0-7.0에서 안정하다고 보고하였다[26]. 본 실험결과와 이들 결과 사이에는 근소한 차이가 있는 것으로 보아 균종간의 차이에서 비롯된 것이라고 사료되며, 대체적으로 pH가 중성일때 효소의 활성이 높았다. 게다가 *Weissella cibaria* K-M1-4의 α -galactosidase 및 β -glucosidase 효소활성의 pH 안정폭이 넓기 때문에 산업적으로 효소를 이용하는데 효율적이라 사료된다.

최적반응 온도 및 온도 안정성 측정

정제한 효소액에 대한 온도의 영향은 α -galactosidase의 경우, 60°C에서 최대 활성을 나타내었으며, 60°C까지 안정성을 보였으나, 70°C 이상에서는 그 활성이 급격히 감소하였다(Fig. 6). β -Glucosidase는 50°C에서 최대 활성을 나타내었으며, 70°C까지 안정성을 보였으나, 그 이상에서는 효소

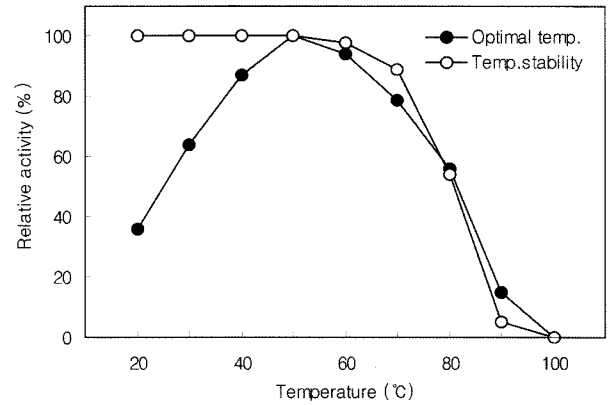


Fig. 7. Effect of temperature on β -glucosidase activity and stability. For the temperature stability, purified enzyme was preincubated at various temperatures for 30min and the remaining activity was measured.

활성이 급격히 감소하였다(Fig. 7). *Bifidobacterium* sp. Int-57 [26]이 생산한 α -galactosidase의 최적온도는 40°C이었고 β -glucosidase의 최적온도는 50°C, *Bacillus licheniformis* YB-42[10]의 α -galactosidase의 최적온도는 45°C, 온도안정성은 50°C이상에서 활성이 급격히 저하되었으며, *Streptomyces* sp. YB-4[14]이 생산한 α -galactosidase의 최적온도는 60°C이라고 보고하였다. 이러한 연구결과와 비교하여 *Weissella cibaria* K-M1-4가 생성한 α -galactosidase 및 β -glucosidase의 최적 온도는 비교적 높지만 효소의 활성이 온도의 변화에 민감하지 않고 온도의 안정성 또한 넓기 때문에 산업적 이용시 다양하게 적용이 가능할 것으로 사료된다.

효소의 금속이온에 대한 영향

효소의 금속이온에 대한 영향을 알아보기 위해 기질인 p-nitrophenyl- α -D-galacto-pyranoside(PNPG) 용액과 p-nitrophenyl- β -D-gluco-pyranoside(PNPG) 용액에 각각의 금속이온들을 최종 농도가 2 mM이 되도록 첨가하여 효소 활성을 측정 한 결과, α -galactosidase의 경우, Zn^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} 을 첨가하였을 때는 효소활성이 감소하였으며, Cu^{2+} 와 Fe^{2+} 을 첨가하였을 때는 효소 활성이 증가함을 보였다. β -glucosidase의 경우, Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} 을 첨가하였을 때는 효소 활성이 감소하였으며, Cu^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} 을 첨가하였을 때는 효소 활성이 증가함을 보였다(Fig. 8). Yeo 등[26]은 금속이온에 대한 영향에서 Co^{2+} 가 33%, Cu^{2+} 가 21%의 α -galactosidase 활성이 저해됨을 보고하였다. *Scopulariopsis brevicaulis*[2]이 생산한 α -galactosidase는 Mn^{2+} 에 의해서 활성이 증가하였다고 보고하였다. *Aspergillus niger* SFN-416[25]이 생산한 β -glucosidase는 Cu^{2+} 에서 상대활성이 16.7%로 가장 저해 정도가 높은 것으로 보고하였다. 이것으로 미루어보아 미생물의 종류에 따라 효소활성의 저해정도는 다양한 차이가 있는 것으로 사료된다.

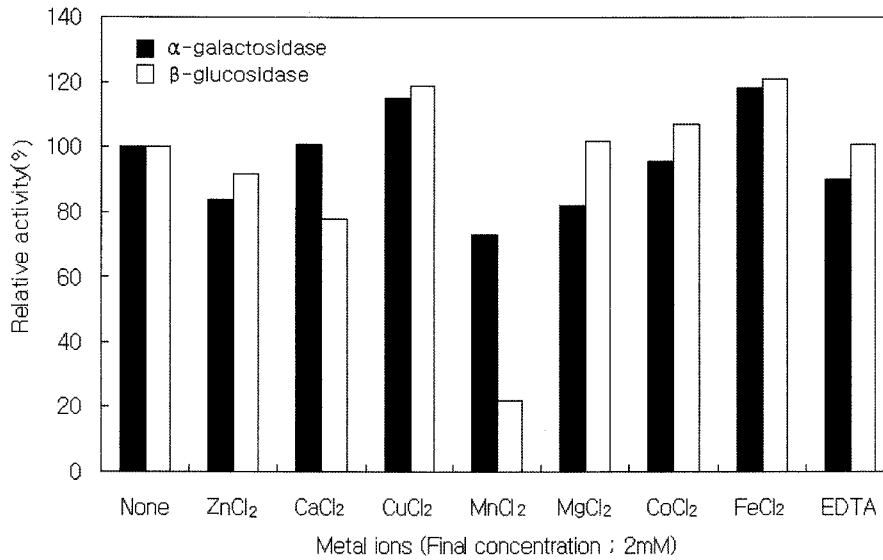


Fig. 8. Effect of metal ions on the activity of enzymes from *Weissella cibaria* K-M1-4. Final concentration of metal ions was 2 mM in ρ -nitrophenyl- α -D-galacto-pyranoside (PNPG) solution and ρ -nitrophenyl- β -D-gluco-pyranoside (PNPG) solution, respectively. Purified enzyme and substrate were incubated at 45°C for 10 min and the remaining activity was measured.

효소의 Km 및 Vmax 측정

α -galactosidase의 ρ -nitrophenyl- α -D-galacto-pyranoside (PNPG)에 대한 기질 친화력을 측정하기 위해 농도별 기질 용액의 반응 정도를 측정한 후 Lineweaver-Burk plot에 의하여 Km과 Vmax를 계산하였다. 이 plot으로부터 산출된 α -galactosidase의 Km값은 0.98 mM이었고, Vmax값은 1.81 μ mole/min이었다. β -glucosidase의 ρ -nitrophenyl- β -D-gluco-pyranoside(PNPG)에 대한 기질 친화력을 측정한 결과, Km값은 1.24 mM이었고, Vmax는 6.81 μ mole/min이었다(Data not shown). Choi 등[2]은 *Scopulariopsis brevicaulis*가 생산하는 α -galactosidase에서 PNPG를 기질로 사용하였을 때 Km값이 1.9 mM, Vmax값은 9.66×10^2 μ mole/min임을 보였다. 본 α -galactosidase는 PNPG에 대해 Choi 등[2]이 보고한 것보다 강한 친화력을 가짐을 알 수 있었다. Chun과

Lee[25]는 *Aspergillus niger*가 생산한 β -glucosidase에서 PNPG를 기질로 사용하였을 때 Km값이 0.42 mM, Vmax값은 152 μ mole/min인 것에 비하면 기질 친화도가 낮은 것으로 판단되나 효소의 정제도 및 실험조건에 따라 다를 수 있으므로 일률적으로 비교하기는 어려운 것으로 판단된다.

***Weissella cibaria* K-M1-4 배양 중 탄수화물 및 이소플라본의 함량변화**

α -Galactosidase와 β -glucosidase 활성을 가지고 있는 *Weissella cibaria* K-M1-4를 soy broth medium에 1%(v/v) 접종하여 37°C에서 배양한 후, 12시간 간격으로 배지 중 당의 종류별 함량 변화를 HPLC로 분석하였다. Soy broth medium에는 sucrose(1.92%), stachyose(0.93%), fructose(0.41%), raffinose(0.19%), 미량의 glucose와 galactose 순서

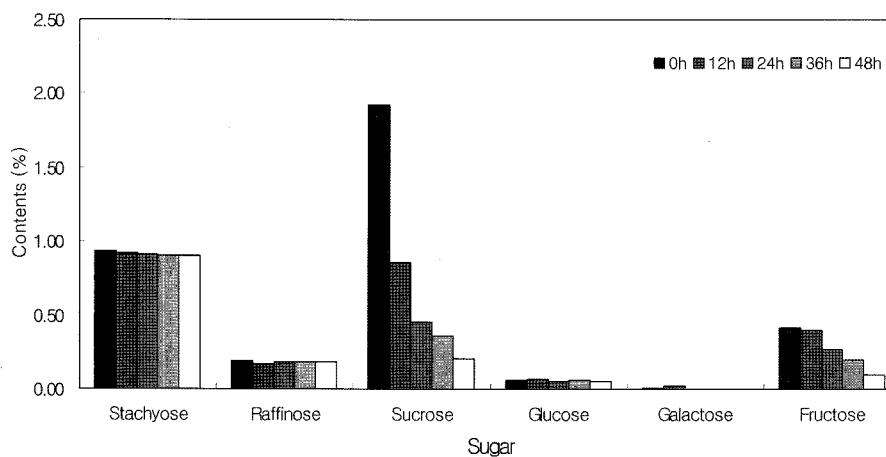


Fig. 9. Changes of stachyose, raffinose and other free sugar content by *Weissella cibaria* K-M1-4 during fermentation.

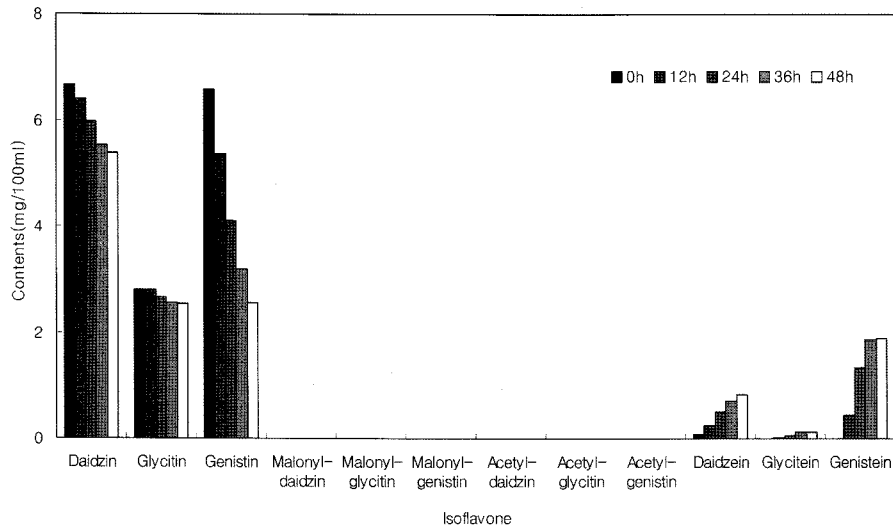


Fig. 10. Changes of isoflavone content by *Weissella cibaria* K-M1-4 during fermentation.

로 구성되어 있다. 미생물 배양 48시간 이후에는 sucrose가 0.21%, fructose가 0.1%로 감소한 반면에 stachyose와 raffinose는 0.01-0.03% 밖에 감소하지 않았다. 감소하지 않은 이유는 *Weissella cibaria* K-M1-4가 탄소원으로 sucrose와 fructose를 이용한다는 것을 나타내고, sucrose를 모두 소비한 후에 α -galactosidase의 작용으로 stachyose와 raffinose를 분해하여 최종산물인 sucrose를 생산하고 이용할 것으로 사료된다(Fig. 9). Soy broth medium의 이소플라본을 분석한 결과, glucoside 형태인 daidzin(66.7 μ g/mL), glycitin(28.1 μ g/mL), genistin(65.8 μ g/mL)이 주종을 이루며 함유되어 있음을 나타내었다. 미생물 배양 48시간 이후에는 β -glucosidase의 활성으로 daidzin(53.9 μ g/mL), glycitin(25.4 μ g/mL), genistin(25.6 μ g/mL)이 감소하였고 aglycone 형태의 daidzein(8.4 μ g/mL), glycitein(1.3 μ g/mL), genistein(18.8 μ g/mL)의 이소플라본으로 전환됨이 확인되었다. 특히 이소플라본 중에서 genistin에서 genistein으로의 전환율이 우수한 것으로 나타났다(Fig. 10).

요 약

대두의 발효를 통하여 생리활성을 가지고 있는 이소플라본 aglycone 함량을 높이기 위한 β -glucosidase와 대두에 다량 함유되어 있는 stachyose, raffinose와 같은 난소화성 oligosaccharides를 분해하기 위해 α -galactosidase 효소 분비 미생물을 김치로부터 α -galactosidase와 β -glucosidase를 생산하는 미생물을 탐색하였다. 탐색과정을 위해서 선별한 미생물을 16S rDNA sequencing 동정한 결과, *Weissella cibaria*로 동정되어 *Weissella cibaria* K-M1-4로 명명하였다. *Weissella cibaria* K-M1-4를 대두 액체배지에서 18시간동안 배양한 후, 생산한 효소는 배양액을 에탄올 침전, DEAE

sepharose, sephacryl S-100HR column chromatography를 통하여 α -galactosidase의 경우, 정제도 5.3배, 수율 3.5% 그리고 β -glucosidase의 경우, 정제도 4.4배, 수율 2.9%로 정제되었다. α -Galactosidase 효소특성은 60°C에서 최대 활성을 나타내었으며, 80°C에서 30분 처리시 43% 잔존활성을 보였다. pH 8.0에서 최대 활성을 나타내었으며, pH 5.0-9.0에서 안정하였다. 금속이온에 대한 영향에서 Fe²⁺과 Cu²⁺을 첨가하였을때 효소 활성이 증가하였다. ρ -Nitrophenyl- α -D-galacto-pyranoside (PNPG) 기질에 대한 Km은 0.98 mM이었고, Vmax는 1.81 μ mole/min 이었다. β -Glucosidase 효소 특성은 50°C에서 최대 활성을 나타내었으며, 80°C에서 30분 처리시 46% 잔존활성을 보였다. pH 7.0에서 최대 활성을 나타내었으며, pH 5.0-9.0에서 안정하였다. 금속이온에 대한 영향에서 Fe²⁺, Co²⁺, Cu²⁺을 첨가하였을때 효소 활성이 증가하였다. ρ -Nitrophenyl- β -D-gluco-pyranoside (PNPG)에 대한 Km값은 1.24 mM이었고, Vmax는 6.81 μ mole/min 이었다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 농림기술개발사업(2005-2008)의 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Cho, Y., S. Park, H. Shin, K. H. Jang, and S. A. Kang. 2001. Comparative estrogenic effects of yak-kong and soy bean on the proliferation of human osteoblastic cell line, MG-63. *Kor. J. Nutr.* 34: 905-911.
2. Choi, C., K. S. Choi, S. H. Lee, S. P. Hong, H. D. Lee, and D. K. Bae. 1998. Characteristics and action pattern of α -

- galactosidase from *Scopulariopsis brevicaulis* in Korean traditional meju. *Agric. Chem. Biotechnol.* **41**: 489-495.
3. Chun, H. S. and S. R. Lee. 1988. Production and enzymatic characteristics of α -galactosidase from *Aspergillus niger*. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **20**: 79-84.
 4. Dey, P. M. and E. D. Campillo. 1984. α -Galactosidase. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **56**: 141-249.
 5. Giuseppin, M. L., J. W. Almkerk, J. C. Heistek, and C. T. Verrips. 1993. Comparative study on the production of guar α -galactosidase by *Saccharomyces cerevisiae* SU50B and *Hansenula polymorpha* 8/2 in continuous cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 52-59.
 6. Jung, J. S., Y. C. Hah, and S. W. Hong. 1983. Enzymatic property and action of β -glucosidase from *Aspergillus nidulans* FGSC 159. *Kor. Biochem. J.* **16**: 165-173.
 7. Kang, K. H., D. J. Kang, H. K. Min, and S. I. Park. 1994. Some properties of α -galactosidase from *Bifidobacterium angulatum* and *Bifidobacterium longum*. *Foods Biotechnol.* **3**: 160-164.
 8. Kang, M. H., Y. H. Kim, and S. R. Lee. 1980. Trypsin inhibitor and hemagglutinating activities of some minor beans in Korea. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **12**: 24-33.
 9. Kim, D. M., H. H. Baek, and K. H. Kim. 1990. The contents of antinutritional factors and lipoxygenase activity of the recommended soybean varieties in Korea. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **22**: 393-397.
 10. Kim, H. S., K. S. Lee, J. H. So, M. S. Lee, J. H. Choi, and K. H. Yoon. 2004. Characterization of extracellular α -galactosidase produced by *Bacillus licheniformis* YB-42. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **32**: 128-134.
 11. Kim, J. H. and D. H. Nam. 1984. Purification and properties of β -glucosidase from *Sporotrichum cellulophilum*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **12**: 21-26.
 12. Kim, K. W. and B. S. Chun. 2001. Optimum conversion to the aglycone form using β -glucosidase and isoflavone extraction from soybean. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **16**: 174-178.
 13. Kim, K. W. and H. J. Lee. 1983. Purification and characterization of α -galactosidase from *Escherichia coli*. *Kor. Biochem. J.* **16**: 1-12.
 14. Kim, S. Y., K. H. Cho, C. J. Kim, D. J. Park, and K. H. Yoon. 2002. Characterization of extracellular α -galactosidase produced by *Streptomyces* sp. YB-4. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 332-338.
 15. Kwon, C. S. and J. S. Kim. 1999. Effect of soybean supplementation on murine drug-metabolizing enzymes and benzo(a)pyrene-induced lung cancer development. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **31**: 535-539.
 16. Lee, Y. S., C. Xiaowei, and J. Anderson. 2001. Physiological concentrations of genistein stimulate the proliferation and protect against free radical-induced oxidative damage of MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *Nutrition Research.* **21**: 1287-1298.
 17. Lee, Y. S., S. Y. Jang, and K. O. Kim. 2005. Effects of soy isoflavone intake on nitrite content and antioxidant enzyme activities in male rats fed high-fat diet. *Kor. Nutr. Soc.* **38**: 89-95.
 18. Maga, J. A. 1982. Phytate: its chemistry, occurrence, food interactions, nutritional significance, and methods of analysis. *J. Agric. Food. Chem.* **30**: 1-9.
 19. Milsicek, R. J. 1994. Interaction of naturally occurring nonsteroidal estrogens with expressed recombinant human estrogen receptor. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **49**: 153-160.
 20. Ohnishi, S. T. and J. K. Barr. 1978. A simplified method of quantitating proteins using the biuret and phenol reagents. *Anal. Biochem.* **86**: 193.
 21. Rackis, J. J., D. H. Honig, D. J. Sessa, and F. R. Steggerda. 1970. Flavor and flatulence factors in soybean protein products. *J. Agric. Food. Chem.* **18**: 977-982.
 22. Setchell, K. D. R. and A. Cassidy. 1999. Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. *J. Nutr.* **129**: 758-767.
 23. Steggerda, F. R., E. A. Richards, and J. J. Rackis. 1968. Effects of various soybean products on flatulence in the adult man. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **121**: 1235-1242.
 24. Su, S. J., T. M. Yeh, H. Y. Lei, and N. H. Chow. 2000. The potential of soybean foods as a chemoprevention approach for human urinary tract cancer. *Clin. Cancer Res.* **6**: 230-236.
 25. Sung, C. K., S. W. Lee, S. K. Park, J. R. Park, and I. S. Moon. 1997. Purification and characterization of β -glucosidase from *Aspergillus niger* SFN-416. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 44-50.
 26. Yeo, N. I., S. K. Lee, and G. E. Ji. 1993. Characterization of α -galactosidase from *Bifidobacterium* sp. Int-57. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **25**: 689-693.

(Received Aug. 3, 2009/Accepted Aug. 31, 2009)