*Kluyveromyces fragilis*의 Beta-galactosidase에 의한 Oligosaccharide의 生成

姜國熙・金尙希

成均館大学校 農科大学 酪農学科

Production of Oligosaccharide by Beta-galactosidase of *Kluyveromyces fragilis*

Kook-Hee Kang and Sang-Hee Kim

Dept. of Dairy Science, Sung Kyun Kwan University, Suwon 170, Korea

ABSTRACT-*Kluyveromyces fragilis* was evaluated on beta-galactosidase producing ability. Enzyme production medium giving maximum beta-galactosidase yield was found to consist of 6% lactose, 1% peptone and 0.25% yeast extract. Best extraction of beta-galactosidase was obtained by toluene treatment (3% V/V) for 5hr at 37°C in 0.05M potassium phosphate buffer, pH 7.0. Optimal temperature for enzyme activity was 40°C. The enzyme was stable at pH 6.0-7.0. Michaelis-Menten constant was 2.5 mM on O-nitrophenyl-β-D-galactoside. 7 oligosaccharides were formed by transgalactosidation of this enzyme.

Keywords □ ***Kluyveromyces fragilis*, Beta-galactosidase, Oligosaccharide**

우유중 탄수화물의 대부분을 차지하는 lactose는 乳兒에게 귀중한 영양소가 되지만, 離乳期 후의 한국 사람의 대부분은 lactose의 소화능력이 감퇴되어 lactose intolerance의 증세를 나타낸다. 이 증세는 설사, 복부불쾌감, 피부알러지현상 등으로 나타난다. 이 lactose는 乳酸菌이나 효모에 의하여 쉽게 가수분해되기 때문에 유산균을 사용하여 만든 乳製品, 즉 발효유, 치이즈, 발효버터, 칼피스 등에는 lactose가 분해되어 있어서 문제되지 않는다. 그러나, 市乳의 경우에는 이것이 문제되어 우유 소비의 장애요인이 되고 있다[1-3]. 市乳의 경우에는 유산균이나 효모를 사용할 수 없기 때문에 이 균이 생산한 lactose 분해효소 β-galactosidase의 사용이 가능하다. 이 효소의 생산균은 많이 알려져 있으나, *Kluyveromyces fragilis*가 좋은 生産菌株라고 보고되어 있고[3-10], 이외에 다른 효모, 세균, 곰팡이 등으로 부터도 이 효소의 정제분리 물리화학적 성질, 이용성에 관한 연구가 많이 보고되어 있다[11-16].

β-galactosidase는 1951년 Wallenfels[17]에 의해 처음으로 보고 되었는데, 이 효소는 가수분해 반응시에 galactosyl 잔기를 다른 糖이나 알코올에 전이한다는 것이다. 이러한 작용에 의해 lactose를 가수분해하면서 동시에 oligosaccharide도 부수적으로 생성한다는 것이 Pazur[18,19], Roberts and Pettinati[20], Toba 등[21], Itoh 등[22]에 의해 보고되었다.

본 연구에서는 *Kluyveromyces fragilis*로부터 β-galactosidase의 생성조건을 검토하고, crude 상태에서의 특성과 oligosaccharide의 生成을 조사하였다.

Received for publication 20 June; 1987
Reprint requests; Dr. K.H. Kang at the above address

재료 및 방법

사용균주—시험균주로서는 성균관대학교 낙농학과에 보존되어 있는 *Kluyveromyces fragilis* SKD 7001를 사용하였다.

배지—효소 생산성을 비교하기 위하여 사용한 배지는 Itoh[22], Mahoney (lactose)[9], Mahoney (whey)[9], Dickson[14]의 것을 사용하였다.

조효소액의 조제—조효소액의 조제는 Mahoney and Whitaker[8]의 방법을 변경하여 다음과 같이 하였다. 즉 배양액을 저온 (4℃)에서 5,000×g로 20분간 원심분리하여 균체를 모아서 2번 세척한 다음, 0.05 M potassium phosphate buffer로 최종 농도가 wet cell 100 mg/m*l*되게 현탁시켰다. 3% (v/v) toluene을 첨가하여 37℃에서 5시간 동안 Cell을 파괴시켰다. 파쇄한 균체를 제거하기 위해 14,000×g로 40분간 원심분리 하였고 상등액을 취하여 이것을 조효소액으로 하였다.

Beta-galactosidase 활성측정—Beta-galactosidase 활성측정은 Lederberg 방법[23]을 변형하여 사용하였다. 즉 0.05 M potassium phosphate buffer(pH 7.0)에 O-nitrophenyl-β-D-galactoside (ONPG)를 5 mM 되도록 용해한 기질을 30℃로 예온한 후 급냉시키면서 0.5 M Na_2CO_3 용액 2.5 m*l*를 가해서 반응을 정지시킨 후 발색된 황색의 흡광도를 420 nm에서 측정하였다. Blank는 기질액만을 10분간 배양하고 급냉하면서 반응정지액 2.5 m*l*를 먼저 가한 후 동량의 효소액을 넣어서 흡광도를 측정하였다. 효소역가는 O-nitrophenol의 유리량을 표준 곡선으로부터 산출, 표시하였으며 상기조건에서 1분 동안에 1 m mole의 O-nitrophenol을 유리하는 효소량을 1 단위로 하였다.

단백질정량—단백질은 bovine serum albumin을 표준 단백으로하여 Lowry 등[24]의 방법에 의해 정량하였다.

효소특성—효소의 열안정성은 조효소액을 30~60℃까지 10분간 열처리한 후 ONPG를 기질로 사용하여 효소활성을 측정하여 구하였으며 효소의 최적온도는 조효소액을 ONPG와 30~70℃에서 10분간 반응시킨 후 효소활성을 측정하여 구하였다. 효소의 pH 안정성은 조효소액을 여러 pH에서 30℃ 10분 배양한 후 ONPG와 반응시켜 효소활성을 측정하여 구하였다.

Lactose 가수분해—40% lactose 용액 (0.05 M phosphate buffer) 100 m*l*와 조효소 400 unit를 잘 혼합하여 45℃에서 2~12시간까지 방치하였다.

Paper chromatography—Lactose 가수분해물의 paper chromatogram은 n-butanol-pyridine-water (6 : 4 : 3)의 전개용액을 사용하여 상승법에 의해 전개시켰다[21]. 당은 silver nitrate reagent[25]로 발색시켰다.

결과 및 고찰

배지에 의한 β-galactosidase 生産性—시험균이 생성하는 β-galactosidase의 粗酵素液을 제조하기 위하여, 우선 Y-M broth (glucose 대신에 lactose 2% 첨가)에 시험균을 접종하여 30℃에서 진탕배양 하였다. 진폭 6 cm, 속도 150 strokes/min에서 18시간 진탕배양 한 다음, 이 배양액을 효소생산용 4 종류의 배지에 2.5%씩 접종하여 위와 同-조건에서 24시간 진탕배양하였다. 이렇게 배양한 효모균체를 모아서 toluene 처리하고, 이 처리액에서 β-galactosidase의 crude enzyme 용액을 분리하여 ONPG 기질에 대한 분해활력을 측정한 결과는 Table 1과 같다. 이 표에서 보는 바와 같이 효소활성이 가장 높게 나타난 배지는 lactose 함량 8%인 Itoh 培地[22]였으며, 이 배지에서 효소 생산량은 31.26 m/m*l*였다. Itoh 배지의 lactose 함량이 본 시험균주에 대하여 최적인가를 확인하기 위하여, lactose를 2~10%

Table 1. Effect of various medium on the production of the Beta-galactosidase

Medium	Final pH	Cell Yield (wet cell) (g)	Activity (U/ML)	Relative Activity (%)
Itoh[2]	4.06	8.2	31.26	100
Mahoney[9] (Lactose)	3.25	7.0	15.42	50
Mahoney[9] (Whey)	3.42	10.2	21.43	69
Dickson[14]	6.50	8.2	10.29	33

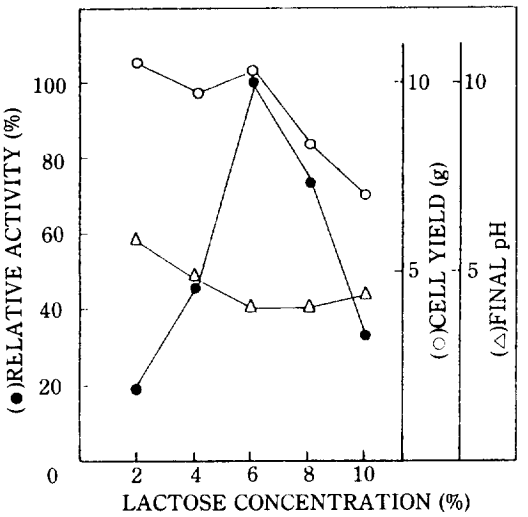

Fig. 1. Effect of lctose concentration on the Formation of Beta-galactosidase

범위로 첨가한 배지에서 효소 생성량을 시험해 본 결과, Fig.1과 같이 lactose 6%에서 가장 높게 나타났다. 따라서, 本試驗의 배지는 Table 2와 같이하여 Beta-galactosidase의 생산용에 사용하였다. *K. fragilis*의 β galactosidase는 cell wall을 먼저 파괴시키지 않으면 추출되지 않으므로 비싼 장비를 요하지 않고 간편한 방법인 toluene 처리를 하였다. 먼저 toluene 처리 온도를 정하기 위해 온도별로 2% (v/v) toluene을 처리하여 시간별로 효소활성을 측정한 결과, 37℃로 배양할 때 5~20시간까지 효소활성이 좋았고 그 이상 배양하면 효소활성이 점차 떨어졌다(Fig. 2). Mahoney 등[9]의 *K. fragilis*를 이용한 β-galactosidase 생산에 있어서 toluene 처리시 37℃ 2% toluene 처리에 50시간까지 효소활성이 유지되는 것과 다른 결과를 보였다. 그 다음에는 37℃에서 toluene 농도와 시간에 따른 β-galatosidase 생산을 본 결과 Fig.3에서처럼 3%

Table 2. Composition of enzyme production medium for Beta-galactosidase

INGREDIENT	CONTENT (%)
Lactose	6
Peptone	0.25
Yeast Extract	1

Sterilized at 121°C for 15 minutes after adjusting pH 7.0.

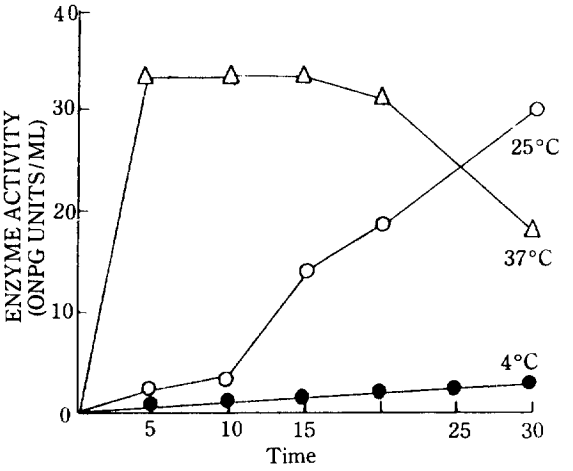

Fig. 2. Effect of time and temperature on extraction of Beta-galactosidase by toluene treatment.

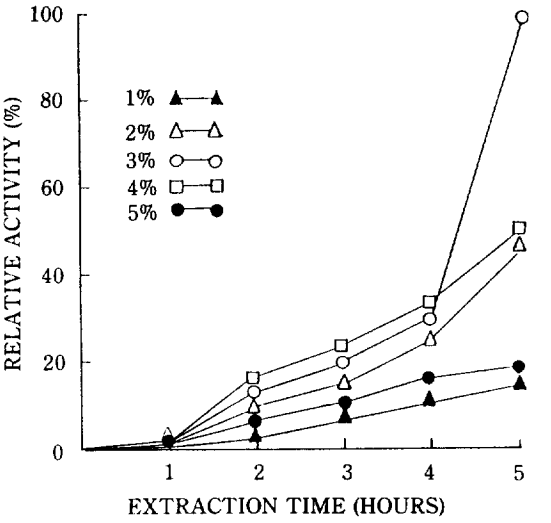

Fig. 3. Effect of time and toluene concentration on the extraction of Beta-galactosidase.

Toluene 농도에서 5시간 배양했을 때 효소활성이 가장 높았다. *K. fragilis*의 세포모양과 toluene 처리로 cell wall을 파괴시킨 후의 세포모양은 Fig.4, Fig.5와 같다.

조효소액의 효소활성을 51.65 units/m*l*이고 단백질 함량은 4.17 mg/m*l*이므로 specific activity는 12.38 units/mg protein이었다.

효소학적 성질—조효소는 ONPG를 기질로 하여 40℃에서 제일 높은 활성을 보였고(Fig.6), 열처리에 대한 안정성은 40℃까지는 비교적 안정하나 40℃ 이상에서는 급격하게 파괴되는 것을 볼 수 있

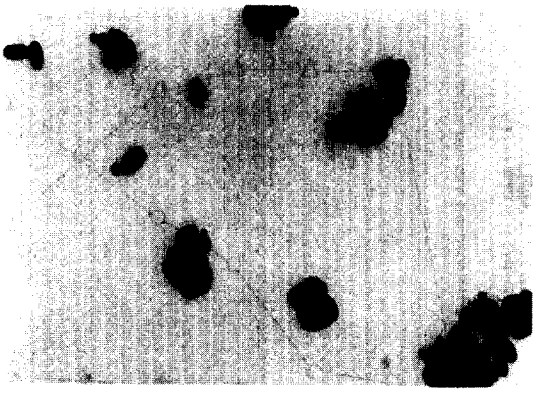

Fig. 4. Morphological appearance of *Kluyveromyces fragilis* (x 1500).

Fig. 5. Morphological appearance of *Kluyveromyces fragilis* after toluene treatment (x 1500).

었다(Fig.7). 이 결과는 Itoh[22] 등이 여러가지 yeast로부터 얻은 조효소액이 대부분 35℃ 10분 처리로 50%까지 효소활성이 감소되는 것에 비교할 때 열안정성이 높다고 하겠다. 여러 종류의 완충용액이 효소활성에 미치는 효과를 보면 Table 3에서 보는 바와 같이 0.05 M 인산염 완충용액에서 최대활성을 나타내었다. pH별 안정도를 확인하기 위해서, pH 3-5까지는 McIlvaine buffer를, pH 6-8까지는 potassium phosphate buffer를, pH 9-10 tris acetate buffer를 사용하였으며, 그 결과는 Fig.8과 같이 pH 6-7에서 상당히 안정하였으나 pH 5 이하에서는 급격히 불활성화 되었고 pH 8 이상 에서는 서서히 활성이 감소하는 것으로 보아서 이 효소는 酸에 대해 약한 것으로 나타났다. 이 효소의 기질특이성을 조사하기 위해, 기질로서 ONPG를 사용하였으며, 이것을 0.05 M potassium phosphate buffer (pH 7.0)에 여러 농도를 효소와 30℃에서 10분간 반응시켰다. 이 결과를 Lineweaver-Burk plot에 의해 Michaelis constant (Km)를 구한 것은 Fig.9와 같이 2.5 mM이

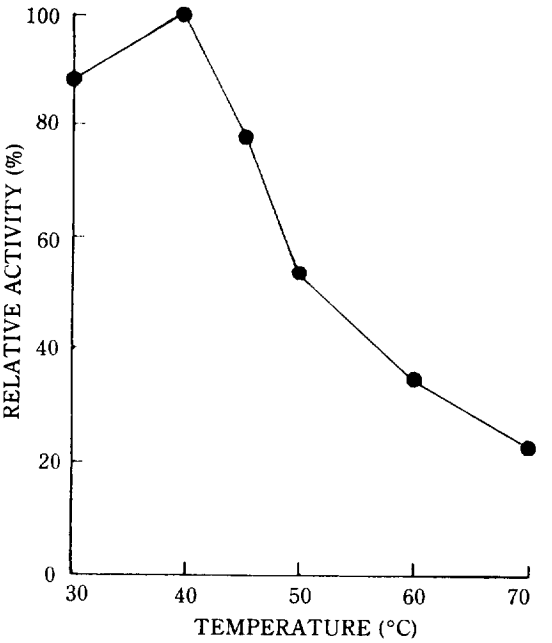

Fig. 6. Effect of temperature on enzyme activity.

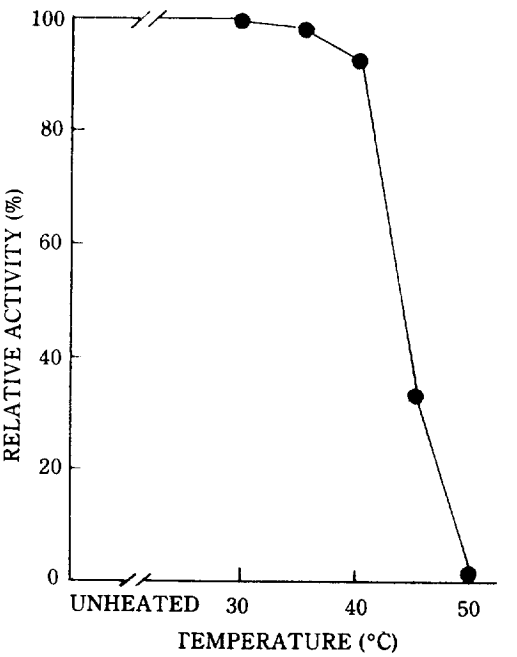

Fig. 7. Effect of heat treatment on enzyme activity.

Table 3. Effect of various buffers on the activity of Beta-galactosidase

Assay Buffers (pH 7.0)	Concentration (M)	Crude Enzyme Activity (U/ML)	Crude Enzyme Relative Activity(%)
Sodium phosphate	0.10	50.10	100
Tris acetate	0.10	29.06	58
McIlvaine	0.10	47.09	94
Potassium phosphate	0.10	50.10	100
	0.10	33.06	64
	0.02	50.02	98
Potassium phosphate	0.05	51.65	100
	0.10	50.10	97
	0.20	49.58	96

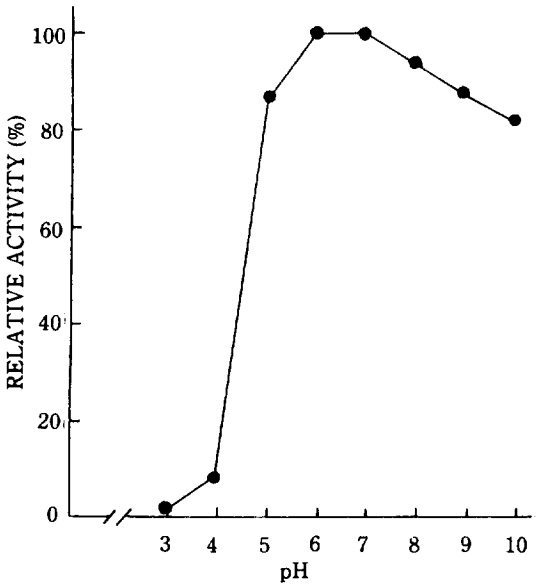

Fig. 8. Effect of pH on the stability of Beta-galactosidase.

었다.

Lactose의 가수분해—효소와 40% lactose 용액을 45℃에서 배양한 결과, 많은 oligosaccharide가 생성된 것을 Fig.10에서 볼 수 있다.

가수분해시간을 여러단계로 해 본 결과, 8시간

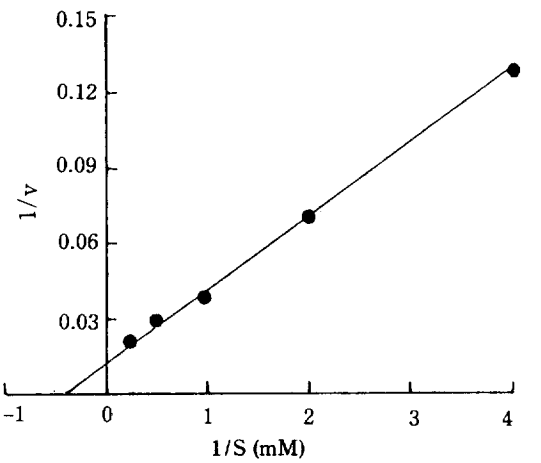

Fig. 9. Linewever-Burk double reciprocal plot for determination of the Michaelis constant for the hydrolysis of ONPG.

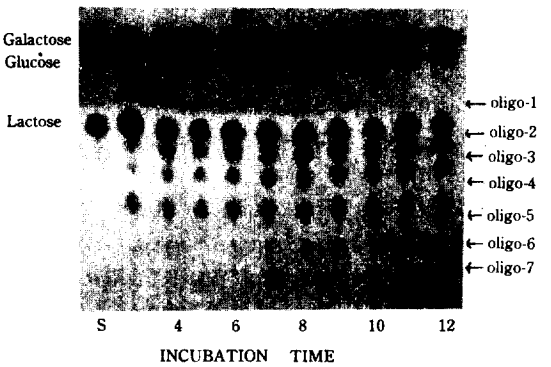

Fig. 10. Paper Chromatogram of Lactose Hydrolyzates. 40% of Lactose solution in 0.05M phosphate Buffer, pH 7.0, was hydrolyzed at 45°C. S, Standerd.

처리한 것이 사진과 같이 oligosaccharide의 生成이 가장 분명하게 나타났다. 여기서 生成된 oligosaccharide를 oligo-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7이라고 命名하였으며, 이중에서 oligo-2는 lactose인데, 이것은 효소의 작용을 받지않고 잔류한 것과 반응과정에서 새로이 生成된 lactose가 혼합된 상태이다.

국문 요약

*Kluyveromyces fragilis*로부터 β-galactosidase의 생성조건과 조효소액의 성질 그리고 당 전이 반응에 의한 oligosaccharide 생성을 조사한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

① Peptone-Yeast extract 배지에 6% lactose를 첨가 하였을 때 최대 효소생산을 보였다.

② 0.05 M potassium phosphate buffer (pH 7.0)에서 3% toluene를 첨가하여 37℃ 5시간 배양하였을 때 *K. fragilis*로부터 효소가 최대로 추출되었다.

③ 효소의 최적온도는 40℃ 이고 40℃ 이상의 열처리에서는 효소가 파괴 되었으며, pH 6-7에서는 상당히 안정하였다.

④ ONPG 기질로 사용하였을 때 Km 값은 2.5 mM이었다.

⑤ 당 전이 반응의 결과, 7개의 oligosaccharide가 생성되었다.

이상의 실험결과로 볼 때, 본 실험에 사용한 *K. fragilis* SKD 7001은 Beta-galactosidase의 생산을 위해서 이용 가치가 인정되었으며, 특히, 이 효소의 활성이 중성 pH에서 강하고 안정한 상태를 보이는 것은 市乳나 원료우유의 lactose를 중성에서 해야 한다는 점을 고려할 때, 실용적 가치가 있다고 본다. 또, 이 효소의 작용과정에서 生成되는 oligosaccharide는 腸內 *bifidus*균의 생육을 촉진시키는 효과가 인정되고 있기 때문에 이용가치를 더욱 높여주는 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Holsinger, V.H.: Lactase-modified milk and whey. *Food Technol.*, **40**, 35 (1978).
2. Kretchner, N.: Lactose and Lactase. *Sci. Amer.*, **227**, 71 (1972).
3. Caputto, R.L., Leloir, L.F. and Trucco, R.E.: Lactase and lactose fermentation in *Saccharomyces fragilis*. *Enzymologia*, **12**, 350 (1948).
4. Davies, A.: Some factors affecting lactase formation and activity in *Saccharomyces fragilis*. *J. Gen. Microbiol.*, **14**, 425 (1956).
5. Van Dam, B., Revallier-Warffemius, J.G. and Van Dam-Schermerhorn, L.C.: Preparation of lactase from *Saccharomyces fragilis*. *Neth. Milk Dairy J.*, **4**, 96, (1950)
6. Wendorff, W.L., Amundson, C.H. and Olson, N.F.: Nutrient requirements and growth conditions for production of lactase enzyme by *Saccharomyces fragilis*. *J. Milk Food Technol.*, **33**, 451 (1970).
7. Wendorff, W.L. and Amundson, C.H.: Characterization of β-galactosidase from *Saccharomyces fragilis*. *J. Milk Food Technol.*, **34**, 300 (1971).
8. Mahoney, R.R. and Whitaker, J.R.: Purification and physiochemical properties of β-galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *J. Food. Sci.*, **43**, 584 (1978).
9. Mahoney, R.R., Nickerson, T.A. and Whitaker, J.R.: Selection of strain, growth conditions and extraction procedures for optimum production of lactase from *Kluyveromyces fragilis*. *J. Dairy Sci.*, **58**, 1620 (1975).
10. Uwajima, T., Yagi, H. and Terada, O.: Purification, crystallization and some properties of β-galactosidase from *Saccharomyces fragilis*. *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 570 (1972).
11. Goncalves, J.A. and Castillo, F.J.: Partial purification and characterization of β-D-galactosidase from *Kluyveromyces marxianus*. *J. Dairy. Sci.*, **65**, 2088 (1982).
12. Kim, Y.M., Lee, J.C., Chung, P.K., Choi, Y.J. and Yang, H.C.: Studies on the production of β-galactosidase by *Lactobacillus sporogenes*-characterization of β-galactosidase. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **11**, 205 (1983).
13. Greenberg, N.A. and Mahoney, R.R.: Rapid Purification of β-galactosidase (*Aspergillus niger*) from a commercial preparation. *J. Food. Sci.*, **46**, 684 (1981).
14. Dickson, R.C., Dickson, L.R. and Markin, J.S.: Purification and properties of an inducible β-galactosidase isolated from the yeast *Kluyvermyces lactis*. *J. Bacteriol.*, **137**, 51 (1979).
15. Craven, G.R., Steers, E. JR., and Anfinsen, B.: Purification, composition, and molecular weight of the β-galactosidase of *Escherichia coli K 12*. *J. Biol. Chem.*, **240**, 2468 (1965).
16. Mozaffar, Z., Nakanishi, K., Matsuno, R. and Kamikubo, T.: Purification and properties of β-galactosidase from *Bacillus circulans*. *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 3053 (1984).

17. Wallenfels, K.: Enzymatische Synthese von oligosacchariden aus disacchariden. *Naturwiss.*, **38**, 306 (1951).
18. Pazur, J.H.: The enzymatic conversion of lactose into galactosyl Oligosaccharides. *Science.*, **117**, 355 (1953).
19. Pazur, J.H.: The mechanism of enzymatic synthesis of galactosyl oligosaccharides. *J. Biol. Chem.*, **208**, 439 (1954).
20. Roberts, H.R. and Pettinati, J.O.: Concentration effects in the enzymatic conversion of lactose to oligosaccharides. *Agric. Food. Chem.*, **5**, 130 (1957).
21. Toba, T., Yokota, A. and Adachi, S.: Oligosaccharides structure formed during the hydrolysis of lactose by *Aspergillus oryzae* β-galactosidase. *Food. Chem.*, **16**, 147 (1985).
22. Itoh, T., Suzuki, M. and Adachi, S.: Production and characterization of β-galactosidase from lactose-fermenting yeasts. *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 899 (1982).
23. Lederberg, J.: The beta-D·galactosidase of *Escherichia coli*, Strain K-12. *J. Bacteriol.*, **60**, 381 (1950).
24. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
25. Trevelyan, W.E., Procter, D.P. and Harrizon, J.S.: Detection of sugars on paper chromatograms. *Nature.*, **166**, 444 (1950).