

## $\beta$ -1,4-D-arabinogalactanase 생산균주의 분리 및 효소정제

신해헌 · 변유량\*

연세대학교 식품·생물공학과 및 생물산업소재연구센터

## Isolation of $\beta$ -1,4-D-arabinogalactanase Producing Strain and Enzyme Purification

Hae-Hun Shin and Yu-Ryang Pyun\*

Department of Food and Biotechnology and Bioproducts Research Center,  
Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

**Abstract** — Alkalophilic *Bacillus* sp. HJ-12 producing  $\beta$ -1,4-D-arabinogalactanase was isolated from soil in the alkalic condition, pH 10.0.  $\beta$ -1,4-D-arabinogalactanase was maximally produced in the medium consisting of 2% soybean arabinogalactan (SAG), 0.5% yeast extract, 0.5% polypeptone, 0.5% NaCl, 0.1%  $K_2HPO_4$ , 0.02%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.1%  $Na_2CO_3$  under the aerobic condition (pH 8.2).  $\beta$ -1,4-D-arabinogalactanase is inducible enzyme so that its activity has been increased 10 fold in the SAG medium than in the glucose medium. Through the ammonium sulfate precipitation, DEAE-Sephadex A-50 ion chromatography, and Sephadex G-75 gel chromatography procedures, this enzyme was purified with a single protein of 11% yield and 110 fold's purity.  $\beta$ -1,4-D-arabinogalactanase is endo type enzyme producing oligosaccharide from SAG.

대두 또는 대두박의 다당류는 대부분 arabinogalactan(AG)이며 이는 수용성 다당류인 hemicellulose polysaccharide로 쌍자엽식물의 primary cell wall의 xyloglucan과 rhamnogalacturonan 사이의 가교역할을 담당하므로서 펙틴물질로 분류되기도 한다(1, 2).

AG는 arabinose와 galactose가 구성 성분인 다당류(hydrocolloid)로서 Type I과 Type II로 나누어진다. Type I은 legume arabinogalactan이 속하며 galactose chain이  $\beta$ -1,4 결합의 직선상 구조로 되어 있고,  $\beta$ -galactose main chain의 4~5번째에 L-arabinose 2개가 위치한다. 반면에 larch tree arabinogalactan과 같은 Type II는 갈가지가 많은 arabino-1,3/6- $\beta$ -galactose의 branched 구조로 되어 있다(3).

$\beta$ -1,4-D-arabinogalactanase(EC 3.2.1.89:  $\beta$ -1,4-galactanase)는 arabinogalactan과 galactan의  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-galactopyranosyl 결합을 가수분해하는 효소로서 배지내의 탄소원에 반응하여 세포외로 생산되며  $\beta$ -(1-3)-D-galactosyl 결합을 하고 있는 coffee-bean arabinogalactan을 가수분해할 수 없는 특이성을 가진다

(4). 현재 보고된  $\beta$ -1,4-galactanase 생성 균주는 *Bacillus*(3, 6-9), *Fungi*(10, 11) 등이 있으며 soybean arabinogalactan(SAG)에 반응시켰을 때 di-, tri-, tetraose의 여러 올리고당을 생성하지만 주로 다당류를 생성하는 것으로 보고되고 있다(4).

이러한  $\beta$ -1,4-galactanase는 식물세포벽 구조의 이해(3, 5) 및 순수한 대두 단백질을 얻기 위하여 결합된 탄수화물의 제거를 위하여 연구(6)되어져 왔으나 최근에는 AG 등에 처리하여 galacto 올리고당의 생성을 위한 목적으로 그 연구가 진행되고 있다(9).

최근 식품산업은 생리적으로 인체의 건강에 유효한 특성을 지녔을 뿐만 아니라 물리적인 특성이 우수하여 식품에 유용하게 사용되고 있는 galacto 올리고당과 같은 올리고당을 기능성 식품소재로서 사용하는데 많은 관심을 가지고 있다(12).

본 연구에서는 SAG를 가수분해하는 새로운 효소를 탐색하기 위하여  $\beta$ -1,4-galactanase 생산균주의 탐색 및 생산조건 그리고 일련의 정제과정을 행하였다.

### 재료 및 방법

#### 균주의 분리 및 동정

본과 내에 보관 중인 전국 각지의 토양을 이용하여

**Key words:**  $\beta$ -1,4-D-arabinogalactanase, 호알칼리성 *Bacillus* sp. HJ-12, Soybean arabinogalactan (SAG), galacto 올리고당

\*Corresponding author

soybean fiber(SBF) 1%가 포함된 pH 10.0의 알칼리 기본배지를 사용하여 37°C에서 2일간 배양하여 생성된 colony 중에서 clear zone을 크게 형성하며 외관상 상이한 균주를 분리하여  $\beta$ -1,4-galactanase 생산능을 비교하였다. 알칼리 기본배지는 탄소원 1%, yeast extract 0.5%,  $K_2HPO_4$  0.1%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.02%,  $Na_2CO_3$  1%, Agar 2%로 구성되어 있다. 선발한 균주는 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(13)에 의해 동정하였다.

### 효소활성 측정

$\beta$ -1,4-galactanase의 활성은 Somogyi-Nelson법(14, 15)을 이용하여 기질 0.5% 용액(0.1M glycine-NaOH 완충액, pH 10.0) 0.4 ml에 효소액 0.1 ml를 첨가하여 40°C에서 10분간 반응시켜 효소 작용에 의하여 생성되는 환원당의 양으로 결정하였다. 효소활성 1 unit는 위 조건하에서 1분간 1  $\mu$ mol의 D-galactose를 생성시키는 효소의 양으로 정의하였다.

또한 총당은 phenol-sulfuric법(16)을 사용하여 측정하였으며, screening시에는 효소반응 후 기질에서 환원당에 대한 총당의 비(degree of polymerization: DP)가 크면 단당류보다는 올리고당의 생성능이 큰 것으로 판단하여 선발하였다.

### 기질의 제조

Soybean fiber(SBF)는 제일제당 연구소에서 제공받은 탈지 대두박을 사용하여 0.1N NaOH로 1시간 동안 처리하여 단백질을 제거한 후 증류수로 세척 및 동결건조하여 제조하였다.

Soybean arabinogalactan(SAG)은 Morita법(17)을 이용하여 탈지 대두박으로부터 열수 추출하여 정제하였으며 수율은 약 4% 정도였다.

### 효소생산을 위한 균주의 배양

효소생산을 위한 배지로는 2% SAG, 0.5% yeast extract, 0.5% polypeptone, 0.5% NaCl, 0.1%  $K_2HPO_4$ , 0.02%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.1%  $Na_2CO_3$ (pH 8.2)를 사용하였다. 0.1% glucose가 포함된 기본배지에서 18시간 전배양한 균체를 1%(v/v) 접종하여 37°C에서 2일간 회전진탕 배양한 후 8,000 rpm, 4°C에서 30분간 원심분리 한 후 얻어진 상등액에서 효소를 분리하였다.

### 효소의 정제

유안침전 균주 배양 상등액을 30% 유안침전하여 저온에서 방치한 후 8,000 rpm, 4°C에서 30분간 원심분리하여 침전물을 제거하였다. 이 상등액을 다시 80%

유안침전 한 다음 원심분리하여 침전물을 얻었다. 이를 소량의 20 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)에 녹인 후 같은 buffer에 대해 dialysis를 행하였다.

DEAE-Sephadex 이온교환 chromatography 25  $\times$  1.3 cm column에 DEAE-Sephadex A-50(Sigma社)을 충전한 후 위와 동일한 buffer로 평형화시킨 후 효소액을 15 ml/h의 유속으로 통과시켜 흡착시킨 다음 0~0.7M NaCl gradient를 이용하여 단백질을 용출시켰다. 효소 활성이 나타나는 부분만을 dialysis membrane에 모은 후 PEG 20000으로 농축한 후 같은 완충액에 대해 투석을 행하였다.

Sephadex G-75 gel chromatography 효소액을 20 mM Tris-HCl 완충액(pH 8.0)으로 평형화시킨 Sephadex G-75 수지(Sigma社)(75  $\times$  1.3 cm)에 15 ml/h의 유속으로 단백질을 용출하였다.

### 전기영동

효소 단백질은 정제과정 중 단계마다 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 사용하여 순도를 확인하고 방법은 Laemmli의 방법(18)에 따라 수직 gel 전기영동을 하였다. 분자량 marker는 Sigma社 제품 Mw-SDS-70L을 사용하였다.

### 단백질 정량

단백질의 정량은 Bradford method(19)를 이용한 Bio-Rad社의 protein assay 시약을 사용하여 실시하였으며, 이때 표준물질은 Bio-Rad의 Bovine serum albumin(BSA)을 사용하였다. 정제과정 중의 단백질의 양은 spectrophotometer(HP8452A, Hewlett Packard社)를 이용하여 280 nm에서의 흡광도값을 측정하였다.

### 가수분해산물의 확인

효소 가수분해 산물을 확인하기 위해서 thin-layer chromatography(TLC)를 사용하였으며 Slica gel(Kieselgel 60 F254, Merck)을 사용하여 상승법으로 측정하였고, 전개용매는 ethyl acetate : acetic acid : water(12 : 5 : 4, v/v)를 사용하였으며, 15% sulfuric acid를 분무한 후 105°C에서 10분간 가열하여 검출하였다.

## 결과 및 고찰

### $\beta$ -1,4-D-arabinogalactanase 생산 균주의 탐색

이제까지 보고된  $\beta$ -1,4-galactanase 생산 균주는 endo형 또는 exo형의  $\beta$ -1,4-galactanase를 균체외로

**Table 1. Comparison of  $\beta$ -1,4-D-arabinogalactanase activity of an isolated strain with reported strains.**

Strain	Activity		Reference
	Unit*/ml	Unit/mg protein	
<i>B. subtilis</i> var <i>amylosacchariticus</i>	0.9		7
<i>Bacillus subtilis</i>		0.05	8
<i>B. sp.</i> S-2	0.8	0.35	9
<i>A. niger</i> var <i>acculeatus</i>		0.06	11
Strain 12	1.0	0.85	This study

\*: liberation of 1  $\mu$ mol galactose per min with SAG

생산하고 있으며 효소적 특성이 서로 다르고 SAG의 가수분해 정도가 차이가 있는 것으로 보고되고 있다 (4). 500여 토양으로부터  $\beta$ -1,4-galactanase 활성을 가진 미생물을 분리하기 위하여 알칼리 배지에서 colony의 형태와 색이 相異하고 clear zone을 크게 형성하며, 환원당에 대한 총당의 비(DP: Degree of Polymerization)가 큰 미생물을 1차로 19균주를 분리하였고, 효소 활성을 측정하여 2차로 6균주를 선발하였다. 선발한 6균주의 효소 활성을 측정한 결과 strain 12가 가장 좋은 결과를 보였으며, 이 균주의 효소 활성은 기존에 보고된  $\beta$ -1,4-galactanase 생산 균주들의 활성과 비교하여 보았을 때 활성이 우수한 결과를 보였다(Table 1).

이 strain 12의 균 특징을 알아보기 위하여 Bergey's manual(13)에 의거하여 특성을 알아본 결과를 Table 2에 나타내었다. 그 특징의 결과로 미루어 보아 strain 12는 *Bacillus* 속에 속하는 것으로 판단되었으며, 기존에 보고된 alkalophilic *Bacillus*(9)와는 차이를 보여 새로운 균으로 생각되었다. 따라서 strain 12를 최종적으로 선발하여, *Bacillus sp.* HJ-12로 命名하였으며, 이후의 실험은 이 균을 이용하였다.

#### 탄산염 및 pH의 영향

일반적으로 pH의 조절은 탄산염을 이용하게 되는데 alkalophilic bacteria(20)의 경우 탄산염은  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 가 가장 좋은 결과를 보여서 효소 생산을 위한 최적 배지를 검토하기 위하여 1% SAG가 함유된 기본 배지에  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 의 양을 0%에서 2%까지 증가시키면서 배양한 후 효소 활성을 측정하여 Fig. 1에 나타내었다.

**Table 2. Taxonomical characteristics of isolated strain 12**

Strain 12	
A. Morphological	
Shape	Rods
Size	0.5~0.7 $\times$ 3~5 $\mu$ m
Filaments	-
Mobility	+
Spore forming	+
Gram Staining	+
B. Biochemical	
Strict anaerobes	-
Catalase	+
Oxidase	+
Reduction of nitrate	+
V-P test	-
Utilization of citrate	+
Production of indole	-
Growing NB media	$\pm$
Growing on 15% NaCl	+
Hydrolysis of casin	-
gelatin	-
starch	+
Acid from D-glucose	+
L-Arabinose	+
D-Xylose	+
D-Mannitol	+

+: Positive, -: Negative,  $\pm$ : Poor growth

pH 증가에 따라 효소 활성은 pH 7.5에서부터 급격히 증가하여  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.1%인 pH 8.2에서 최대 활성을 보이다가 감소하였으며, pH 10 이상에서는 급격히 감소하여 pH 10.5에서는 거의 활성을 나타내지 못하였다. 또한 균체량은 pH 10.2에서 최대로 나타나다 급격히 감소하여 pH 10.5에서는 거의 생육을 하지 못하였다. 또한 배양액의 초기 pH에 상관없이 배양 종료 후 pH는 8.6~8.9로 거의 동일한 pH를 나타내 호알칼리성 세균이 나타내는 일반적인 특징인 주위 pH를 변화시켜도 최종 pH는 9를 나타내는 특징(20)을 보이고 있다.

결과적으로 효소 활성에는 pH 8.2, 균체 생육에는 pH 10.2가 최적인 조건을 나타내므로 이후의 효소 생산을 위한 실험은 모두  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.1%(pH 8.2)에서 행하였다.

#### 탄소원의 영향

$\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.1%가 함유된 기본 배지에 각종 탄소원을 1%(w/v)되게 첨가한 배지를 사용하여 효소 활성을

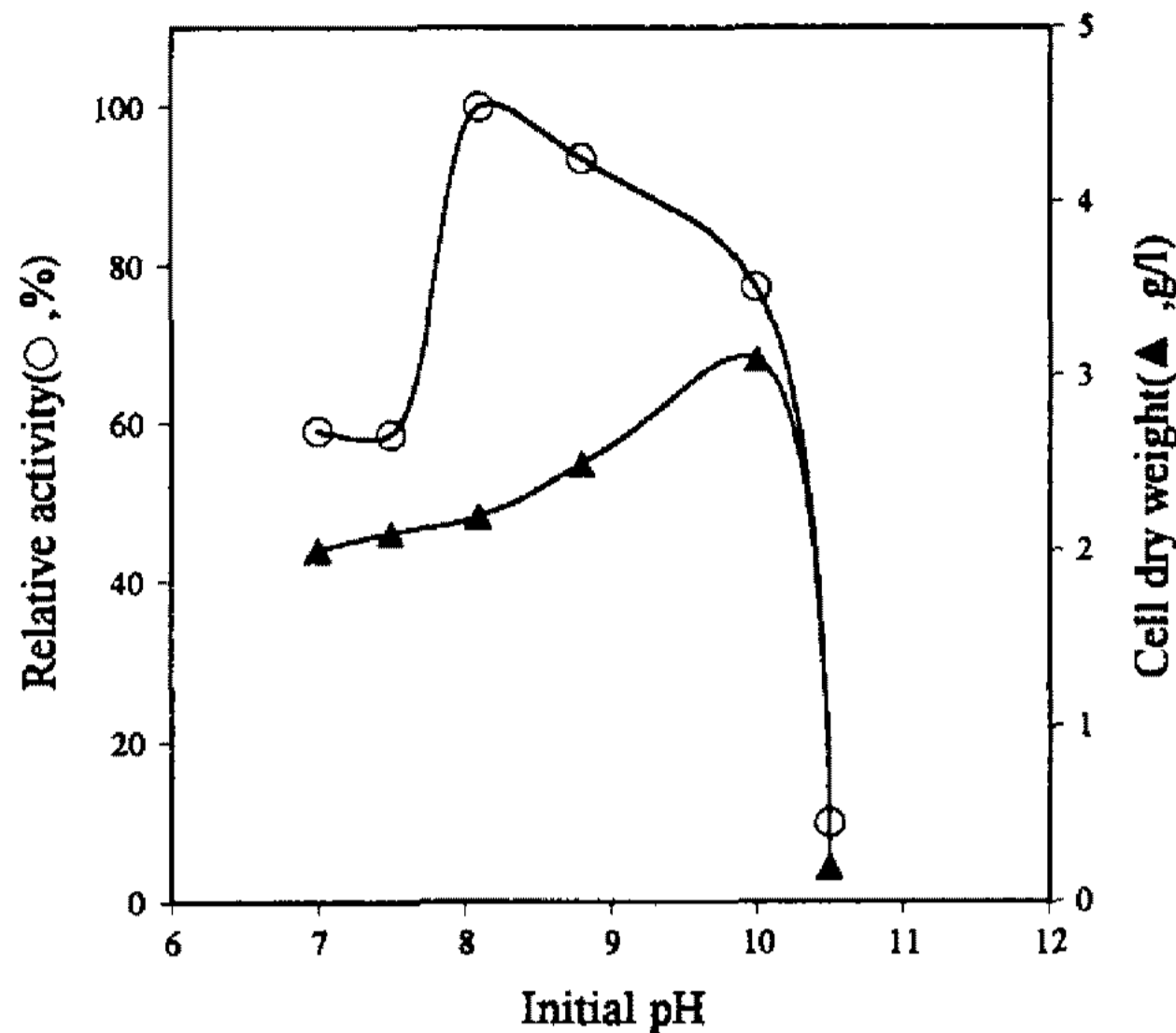


Fig. 1. Effect of initial pH of culture broth on activity of  $\beta$ -1,4-galactanase.

Table 3. Effect of various carbon sources on the production of  $\beta$ -1,4-galactanase.

Carbon source (1%, w/v)	Relative Activity(%)	Final pH
L-(+) Arabinose	45.1	8.3
D-(+) Galactose	0	8.7
D-Glucose	27.3	5.8
Sucrose	19.0	5.8
Raffinose	2.6	8.6
D-Cellobiose	0	9.0
Soluble starch	0	8.6
Dextrin(HPLC)	8.4	8.4
MCC*	8.4	8.9
SAG	100.	8.8

MCC: Microcrystalline Cellulose

조사한 결과를 Table 3에 나타내었다. 여기서 SAG가 가장 좋은 효소 활성을 보였으며, L-arabinose가 다음으로 좋은 결과를 나타내었다. 그 외의 당류는 효소 활성이 낮은 결과를 나타내었다. Glucose, sucrose, raffinose 등의 경우에서 볼 수 있듯이 결합이 증가할수록 효소 활성이 낮아졌으며 다른 당류의 경우  $\beta$ -1,4 이외의  $\alpha$ -1,2(6) 결합의 경우에 효소 활성이 감소하였고, 특히 D-galactose의 경우 효소 활성이 나타나지 않았다.

그러므로, 본 효소는 SAG의  $\beta$ -1,4-D-galactose 결합에 의하여 유도되는 유도효소로 생각되어지며, 효소 생산을 위한 최적 농도를 결정하기 위하여 농도별로 실험한 결과 Fig. 2와 같이 기질 농도의 증가에 따라 점차적으로 증가하여 4%의 SAG에서 1%에 비해 약

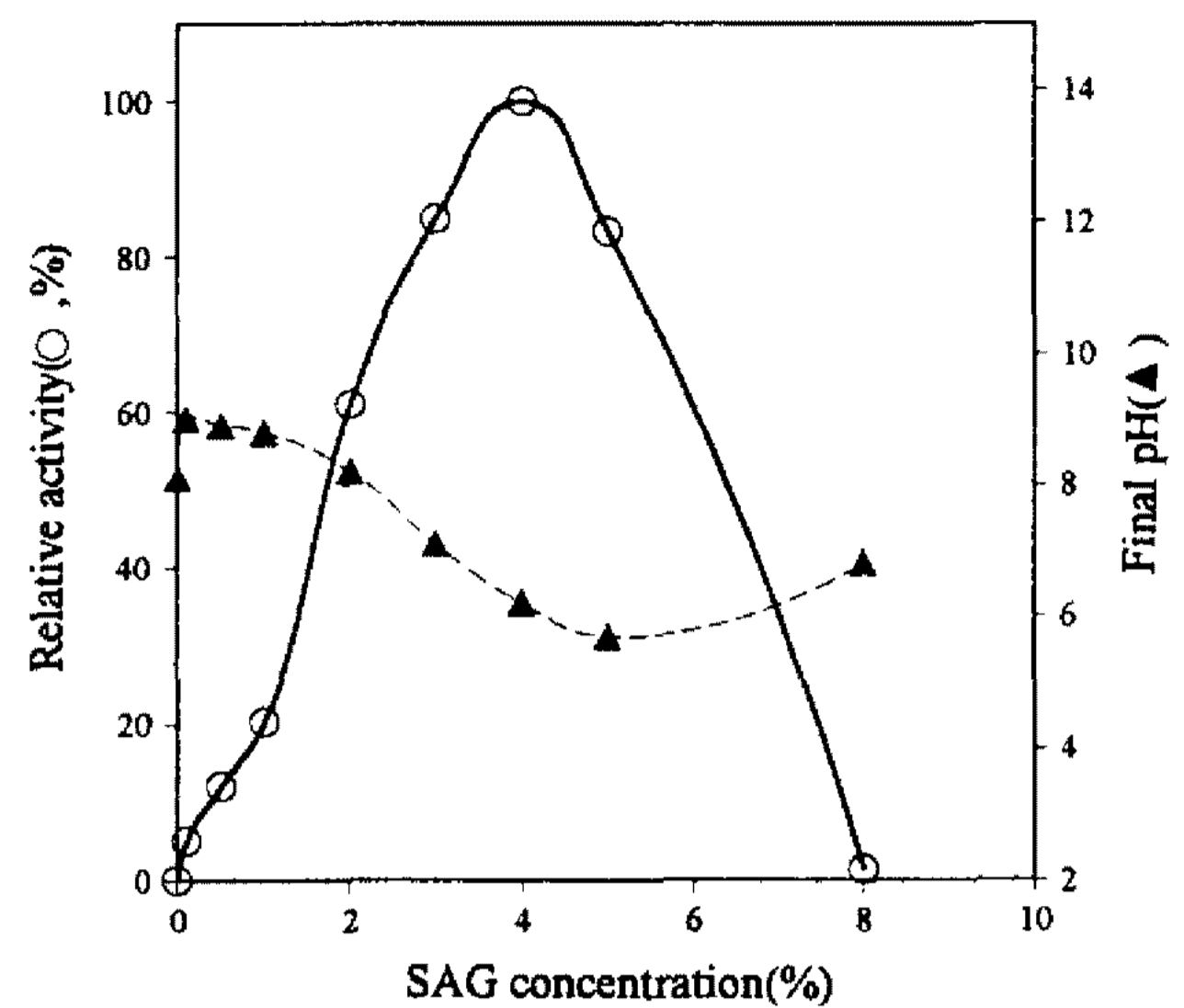


Fig. 2. Effect of SAG concentrations on activity of  $\beta$ -1,4-galactanase (Initial pH of broth, 8.2).

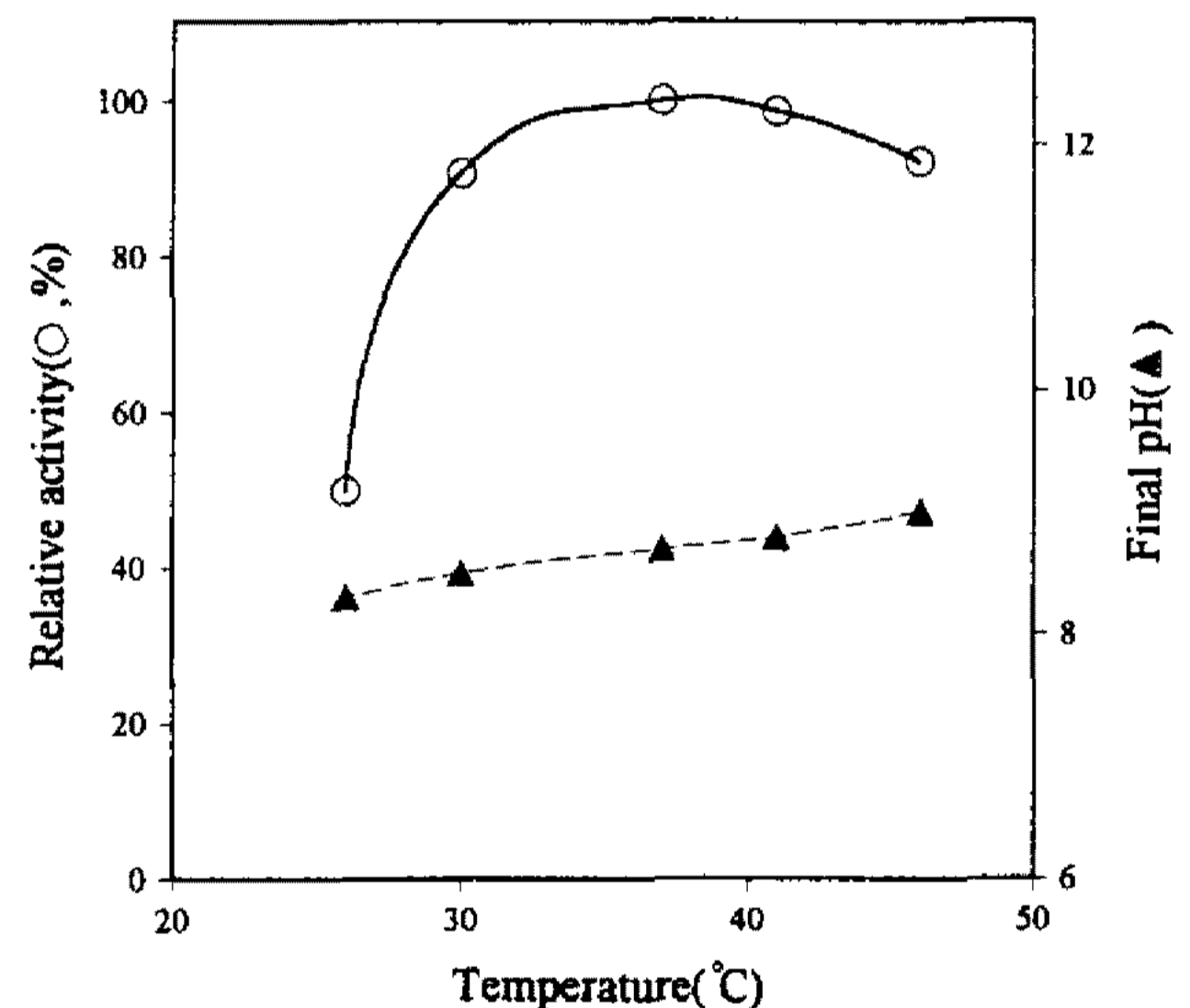


Fig. 3. Effect of cultivation temperature on activity of  $\beta$ -1,4-galactanase.

5배 정도의 활성을 나타내고 있다. 그러나 4% SAG의 경우에는 많은 양의 SAG가 배지 내에 잔존하여 그 손실이 많은 관계로 효소 생산에는 2% SAG를 사용하기로 하였다. 또한 1% SAG 이하의 농도에서는 pH가 9 정도를 유지하였으나, 농도가 증가함에 따라 최종 pH가 점차적으로 감소하였으며, 5% 이상의 농도에서는 다시 증가하는 경향을 나타내고 있었다.

#### 온도의 영향

효소 생산에 미치는 온도의 영향을 알아보기 위하여 26~46°C까지 온도 변화를 주면서 배양하였다(Fig. 3). 30°C 이하의 낮은 온도에서는 효소 활성이 극히 저조하였으나 37~41°C의 경우에는 좋은 활성을 나타

내었으며, 특히 37°C에서 가장 좋은 활성을 보여 37°C가 효소 생산에 적합한 온도로 생각되어졌다.

위의 조건 이외에 질소원 등의 조건을 검토하기도 하지만 질소원의 경우 yeast extract와 polypeptone이 가장 좋은 결과를 보이며, 호알칼리성 세균의 영양 흡수 즉, 생육과 germination, sporulation에 Na<sup>+</sup> ion을 0.5% 정도 요구하며, Mg<sup>2+</sup> ion을 효소 활성 및 생육에 요구하는 특징을 보인다. 그러나 온도, pH, 탄소원 이외의 조건은 거의 차이가 나지 않기 때문에(20) 본 *Bacillus* sp. HJ-12의 β-1,4-D-arabinogalactanase 생산 조건을 2% SAG, 0.5% yeast extract, 0.5% polypeptone, 0.5% NaCl, 0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.02% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(pH 8.2)로 하여 이 후 효소생산에 사용하였다.

**효소활성 유도**

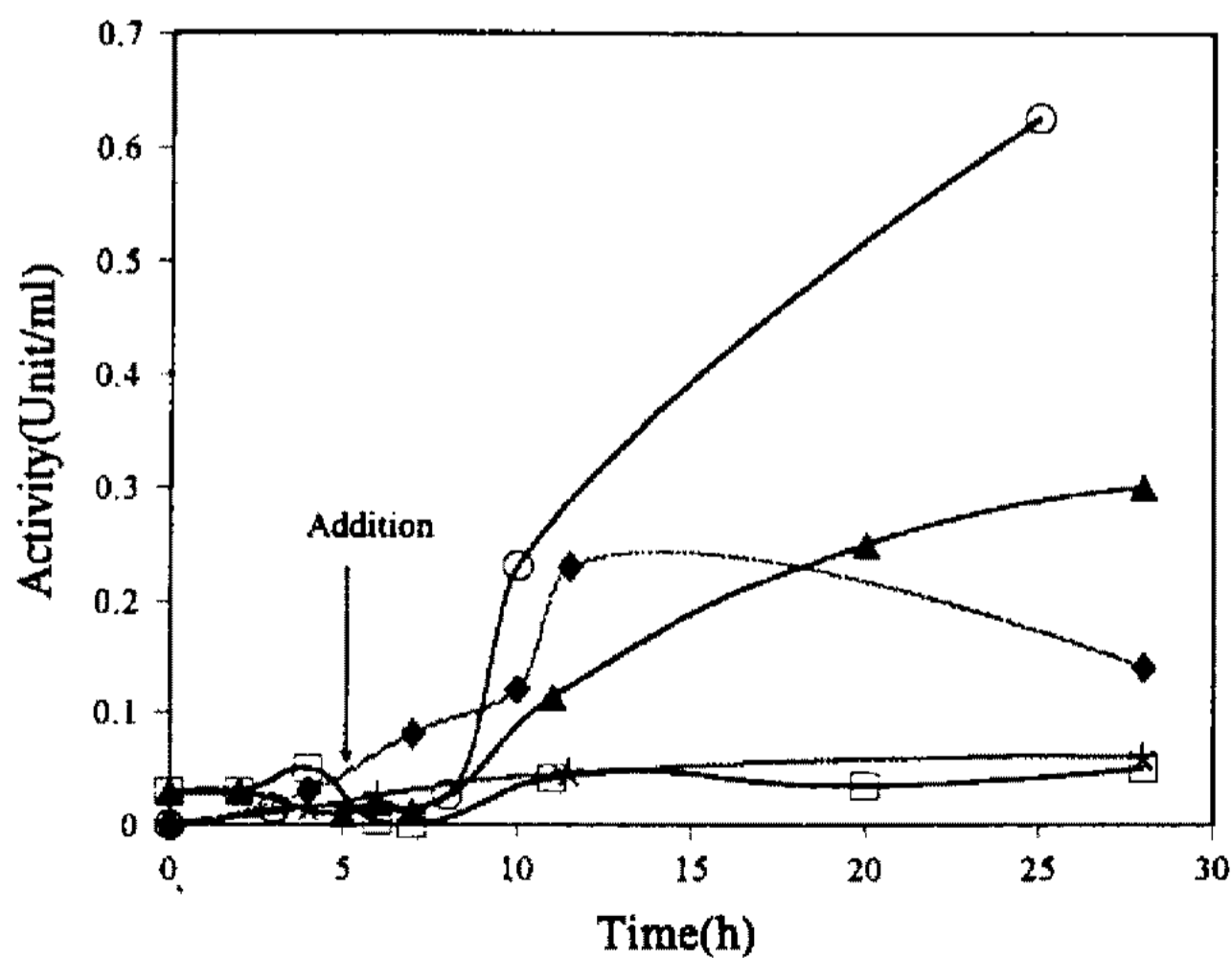
앞에서 검토한 탄소원의 영향에서 SAG에 의한 효소 생산의 증가가 SAG에 의한 유도 효과에 의한 것인가를 판단하기 위하여 여러 조건하에서 균체를 생육시키면서 효소 발현 양상을 검토하였다(Fig. 4). 배양 4시간 후에 glucose 또는 SAG를 여러 농도로 첨가하여 살펴 본 결과 첨가한 후 약 3시간부터 효소가 발현되기 시작하였으며, SAG의 농도가 증가할수록 효소 생산도 증가하였다. 초기부터 0.1% glucose만으로 배양했을 때는 효소 발현이 저조하였으나, SAG를 첨가한 경우에는 효소활성이 현저히 증가하였다. SAG를 첨가한 후 3시간 이후부터 효소가 발현된 것은 배지 내에 잔존하는 glucose에 의한 저해로 생각되어 지며, 이는 induction시 glucose를 첨가한

경우에 효소 생산이 나타나지 않은 것과 같은 결과이다.

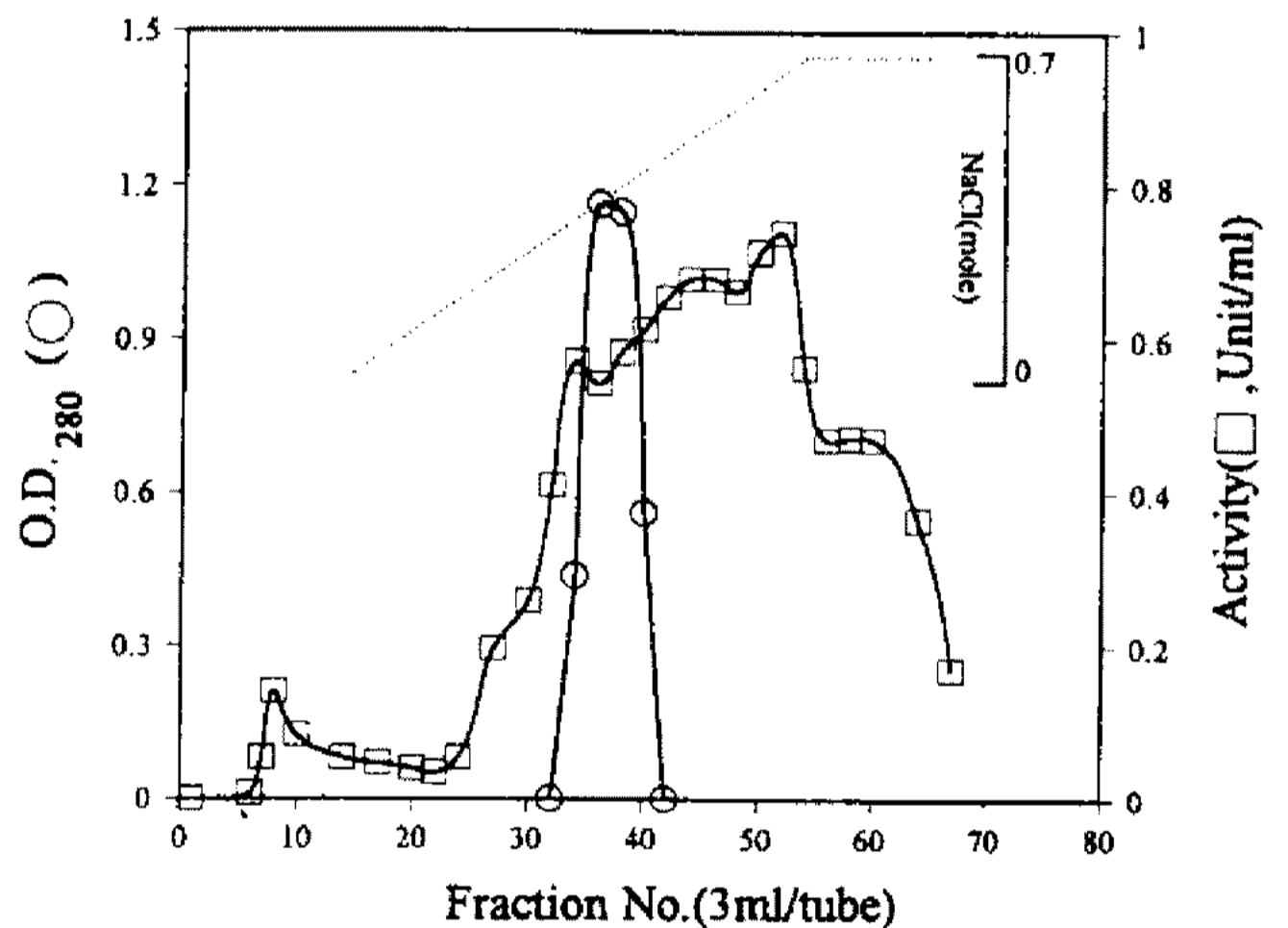
SAG의 농도가 증가할 수록 효소 생산은 증가하여 1% SAG의 경우 induction 후 7시간 경과 때에 glucose만으로 배양한 것에 비해 β-1,4-galactanase의 활성이 약 10배 정도 증가되었다. 이와 같은 결과에서부터 β-1,4-galactanase는 SAG의 β-1,4-galactosyl 결합에 의하여 유도되는 유도효소로 판단된다(4).

**효소의 분리 및 정제**

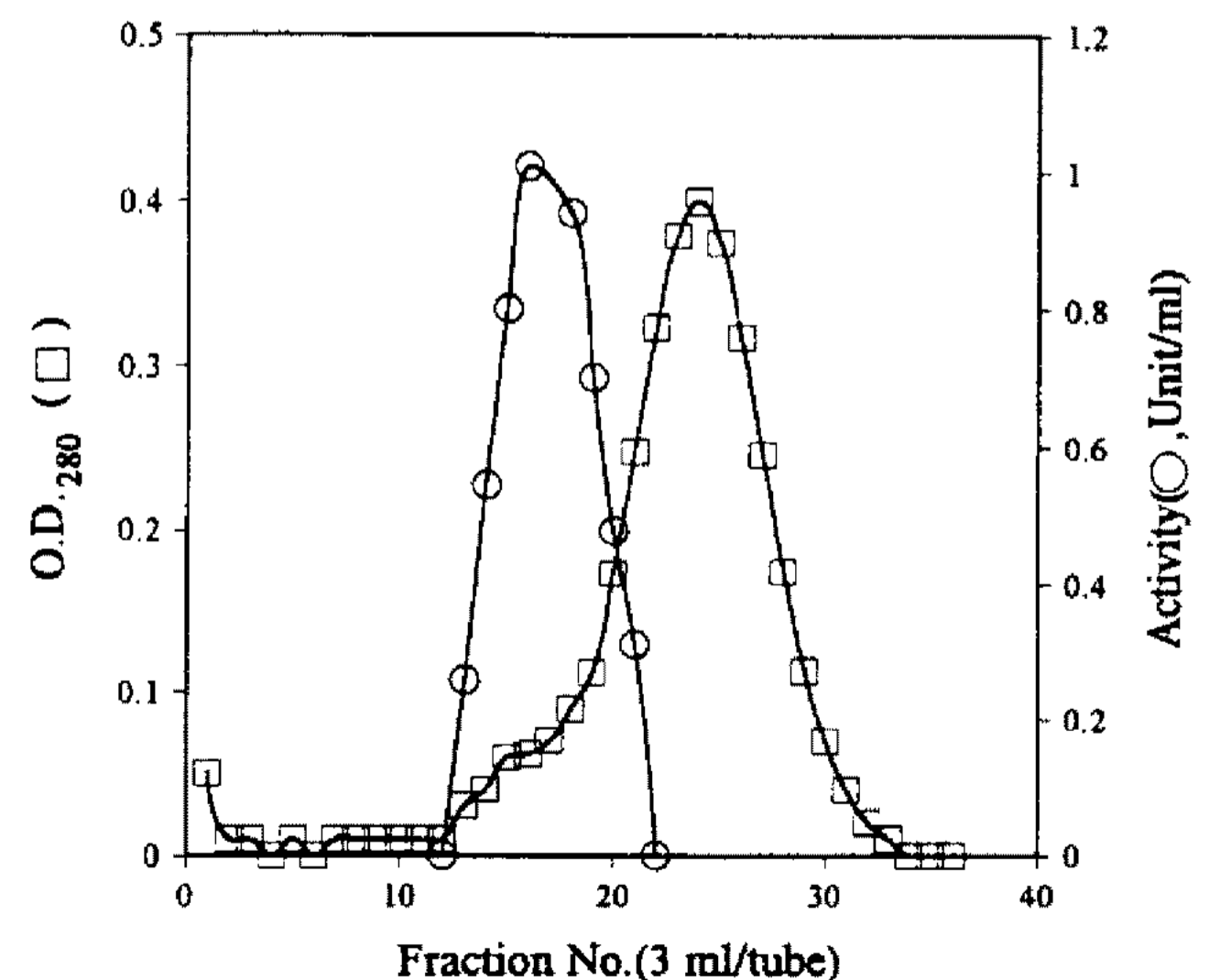
선발한 *Bacillus* sp. HJ-12 유래 β-1,4-D-arabinogalactanase를 효소 생산 조건을 이용하여 효소액을 생산하고 여기서부터 순수한 β-1,4-galactanase만을 분리하여 그 특징을 알아보고자 정제 과정을 행하였다. 먼저 효소 정제의 1단계로 ammonium sulfate 침



**Fig. 4. Effect of sugar addition on enzyme induction.** □: No addition, ▲: 0.2% SAG, ○: 1% glucose, ◆: 0.5% glucose+0.5% SAG, ○: 0.05% SAG (initial)+1% SAG



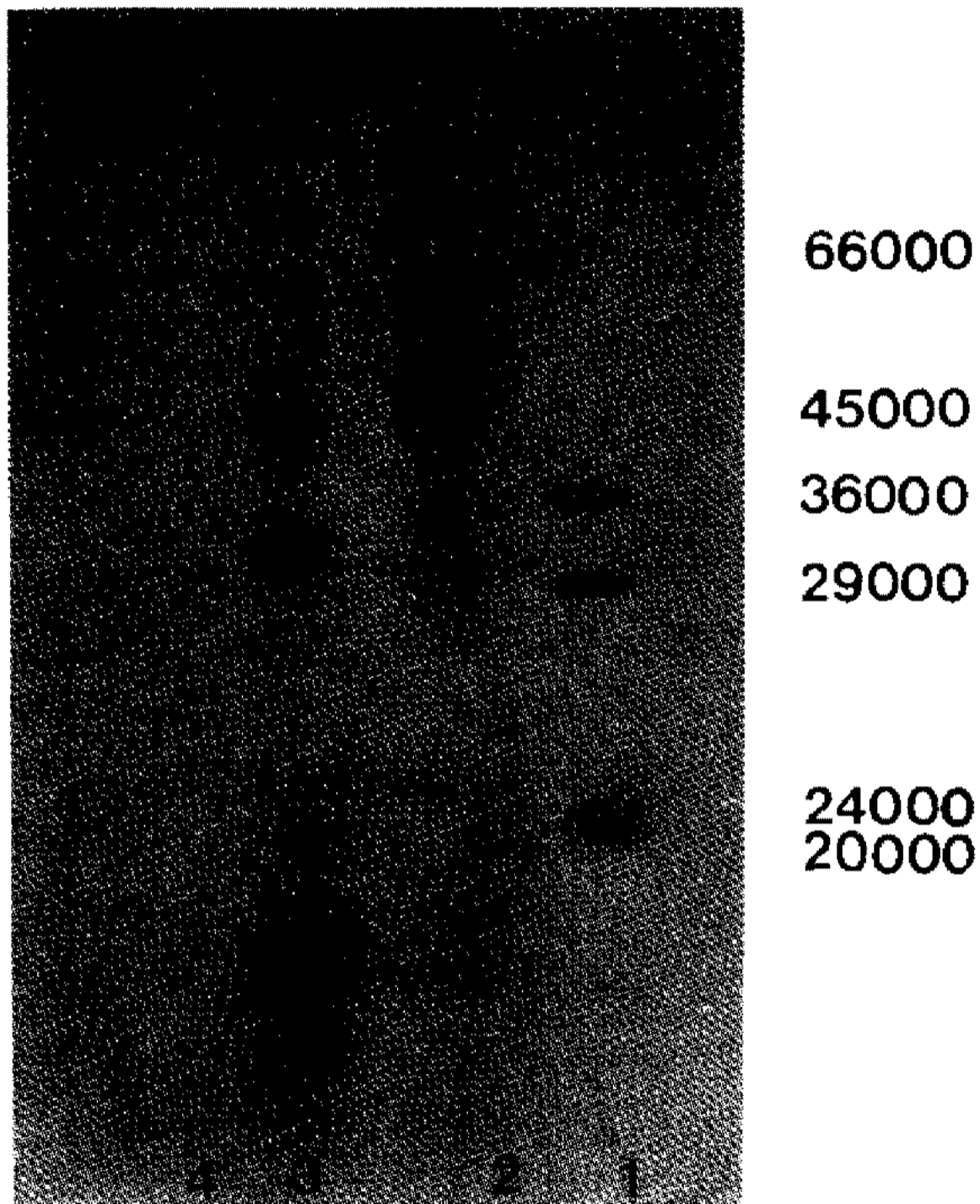
**Fig. 5. DEAE-Sephadex A-50 chromatography of the β-1,4-galactanase.**



**Fig. 6. Sephadex G-75 chromatography of the β-1,4-galactanase.**

**Table 4. Purification step of  $\beta$ -1,4-galactanase**

Step	Activity (Unit)	Protein (mg)	Specific activity (Unit/mg protein)	Yield (%)	Purity (fold)
Crude broth	225.0	264.7	0.9	100	1
Ammonium sulfate precipitation (30→80%)	92.2	25.3	3.7	41	4.1
DEAE-Sephadex A-50 Ion Chromatography	31.1	0.9	34.6	14	39
Sephadex G-75 Gel Chromatography	23.8	0.24	99.1	11	110

**Fig. 7. SDS-PAGE of  $\beta$ -1,4-galactanase at various stage of purification.**

1: standard, 2: culture broth, 3: ammonium sulfate precipitation, 4: gel chromatography

전을 통한 정제 및 농축 과정을 시작하였다. 효소 침전에 대한 ammonium sulfate 포화 농도의 영향에서는 30% 포화 농도에서 침전된 단백질 양은 많으나 효소 활성이 낮게 나와서 fractionization에 유리할 것으로 판단되어 30%→80%의 유안분별 침전을 행하였다. 최종 침전액을 20 mM Tris-HCl 완충액(pH 8.0)에 대해 투석한 결과 최종 침전된 단백질 회수율은 41%, purity는 4.1배 증가되었다.

위에서 얻어진 효소액을 DEAE-Sephadex A-50 (anion exchanger)으로 다시 정제하였다(Fig. 5). 20 mM Tris-HCl 완충액으로 씻은 후, 0~0.7M NaCl(75 ml/씩)로 gradient를 걸면서 3 ml/씩 분획하여 용출한 결과, 약 0.3M NaCl 농도에서 단백질이 용출되었다.

이온교환 수지에 위하여 정제된 효소액을 미리 20 mM Tris-HCl(pH 8.0) 완충액으로 평형화시킨 Se-

**Fig. 8. Chromatogram of enzyme hydrolysate at SAG. A~C: standard (Arabinose, Galactose, Raffinose), D: hydrolysate**

phadex G-75(75×1.3 cm)에 같은 완충액을 15 ml/h의 유속으로 흘려 보내면서 3 ml/씩 분획하여 불순 단백질을 제거하였다(Fig. 6). 활성이 나타나는 분획만을 모은 결과 수율은 11%였으며, 110배의 비활성(specific activity)의 증가를 가져왔다. 3가지 단계에 의해 정제된 결과를 모아서 Table 4에 나타내었다.

각 정제 단계에서의 순도를 확인하기 위하여 12% SDS-PAGE 전기영동을 실시하였다(Fig. 7). 정제가 진행됨에 따라 단백질 band가 적어졌으며, 최종적으로 약 40,000 dalton 위치에 단일 band가 나타나고 있다. 결론적으로 3단계의 정제과정을 통하여 약 40,000 dalton의 분자량을 가진 단일 단백질을 얻었다.

#### 효소가수분해 작용

효소 작용에 의한 SAG의 가수분해물 형태를 알아보기 위하여 조효소액을 이용하여 SAG를 가수분해한 분해산물을 TLC로 측정하여 Fig. 8에 나타내었다. 그림에서 보여준 바와 같이 arabinose, galactose와 같은 단당류는 검출되지 않았으나 그 보다 분자량이 큰 것들이 검출되었다. 그리고 아래쪽 여러 군데에 소량씩의 반점을 나타내어  $\beta$ -1,4-galactanase는 SAG의  $\beta$ -1,4 결합만을 가수분해하여 올리고당으로 가수분해하는 것으로 판단되었으며, 또한 여러 가지의 혼합물이 생성되는 것으로 미루어 바깥쪽으로부터 결합을 분해하는 exo형이 아닌 내부 결합을 여러 군데에서 가수분해하는 endo형으로 유추하였다. 보고된  $\beta$ -1,4-galactanase는 대부분 galactobiose를 주 생성물로 하는 endo형의 형태이지만 일부 *Bacillus*에서는 exo형을 나타내기도 하였다(8, 10).

## 요 약

$\beta$ -1,4-D-arabinogalactanase를 생산하는 *Bacillus* sp. HJ-12를 토양으로부터 pH 10.0의 알칼리 조건에서 분리하였다. *Bacillus* sp. HJ-12가 생산하는  $\beta$ -1,4-D-arabinogalactanase는 2% soybean arabinogalactan(SAG), 0.5% yeast extract, 0.5% polypeptone, 0.5% NaCl, 0.1%  $K_2HPO_4$ , 0.02%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.1%  $Na_2CO_3$ 가 함유된 알칼리 배지(pH 8.2)로 호기적인 조건에서 37°C, 2일 배양한 균체로부터 얻을 수 있었다.  $\beta$ -1,4-D-arabinogalactanase는 배지내의  $\beta$ -1,4-galactose 결합에 대응하여 생산되는 유도효소로서 glucose 기질에 비해 SAG의 경우 약 10배의 효소활성 증가를 가져왔다. 호알칼리성 *Bacillus* sp. HJ-12가 생산하는  $\beta$ -1,4-D-ababinogalactanase를 유안분별 침전과 DEAE Sephadex A-50 ion chromatography, Sephadex G-75 gel chromatography를 통하여 정제한 결과 수율은 11%, 정제도 110배의 단일 단백질을 얻었다.  $\beta$ -1,4-D-arabinogalactanase를 SAG에 작용시킨 결과 단당류가 아닌 올리고당을 생성하였으며, endo형으로 가수분해하는 것으로 판단되었다.

## 참고문헌

- Lo, G.S. 1989. Nutritional and physical properties of dietary fiber from soybeans. *Cereal Foods World* **34**: 530-534.
- Clarke, A.E., R.L. Anderson, and B.A. Stone. 1979. Form and function of arabinogalactans and arabinogalactan-proteins. *Phytochemistry* **18**: 521-540.
- Labavitch, J.M., L.E. Freeman, and P. Albersheim. Structure of plant cell walls. *J. Biol. Chem.* **251**: 5904-5910.
- Dekker, B.F.H. and G.N. Richards. 1976. Hemicellulases: their occurrence, purification, properties and mode of action. *Adv. Carbohydr. Biochem.* **32**: 277-352.
- Buckeridge, M.S. and J.S. Grant Reid. 1994. Purification and properties of  $\beta$ -galactosidase or exo-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactanase from the cotyledons of germinated *Lupinus angustifolius*. *L. seeds. Planta.* **192**: 502-511.
- 木内 幹, 太田輝夫, 藤家弘子, 海老根英雄. 1972. 大豆炭水化物の醱酵分解に関する研究. *日本食品工業學會誌* **19**: 585-590.
- Emi, S. and T. Yamamoto. 1972. Purification and properties of several galactanase of *Bacillus subtilis* var *amylosacchariticus*. *Agr. Biol. Chem.* **36**: 1945-1954.
- Nakano, H., S. Takenishi, S. Kitahara, H. Kinugasa, and Y. Watanabe. 1990. Purification and characterization of exo-1,4- $\beta$ -galactanase from a strain of *Bacillus subtilis*. *Eur. J. Biochem.* **193**: 61-67.
- Tsumura, K., T. Hashimoto, T. Akiba, and K. Horikoshi. 1991. Purification and properties of galactanases from alkalophilic *Bacillus* sp. S-2 and S-39. *Agr. Biol. Chem.* **55**: 1265-1271.
- Nakano, H., S. Takenishi, and Y. Watanabe. 1985. Purification and properties of two galactanase from *Penicillium citrinum*. *Agr. Biol. Chem.* **49**: 3445-3454.
- Lahaye, M., J. Vigouroux, and J.F. Thibault. 1991. Endo- $\beta$ -1,4-D-galactanase from *Aspergillus niger* var. *aculeatus*: Purification and some properties. *Carbohydr. Poly.* **15**: 431-444.
- 박관화, 정기섭, H. Hidaka, S. Kitahata, 서진호, and Y. Kaji. 1994. 올리고당의 기능성. *한국식품과학회 심포지움*.
- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (7th ed.). 1957. The Williams and Wilkins Co.
- Somogyi, N. 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* **195**: 19-22.
- Nelson, N. 1944. A photometric adaption of the somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* **153**: 375-380.
- Dubois, M., K.A. Gills, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**: 350-356.
- Morita, M. 1965. Polysaccharides of soybean seeds. Part I. Polysaccharide constituents of "hot-water-extract" fraction of soybean seeds and an arabinogalactan as its major component. *Agr. Biol. Chem.* **29**: 564-573.

18. Laemmli, U.K. 1970. Changes of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*. **227**: 680-685.
19. Bradford, M. 1976. *Anal. Biochem.* **72**: 248.
20. Horikoshi, K. and T. Akiba. 1982. *Alkalophilic Microorganisms: A new microbial world*. Japan scientific societies press, Tokyo, Japan.

(Received 4 July 1995)