

## 호알칼리성 *Bacillus* sp. HJ-12 유래 $\beta$ -1,4-D-arabinogalactanase의 특성

신해헌 · 변유량\*

연세대학교 식품·생물공학과 및 생물산업소재연구센터

### Characterization of $\beta$ -1,4-D-arabinogalactanase from Alkalophilic *Bacillus* sp. HJ-12

Hae-Hun Shin and Yu-Ryang Pyun\*

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

**Abstract** —  $\beta$ -1,4-D-arabinogalactanase isolated from alkalophilic *Bacillus* sp. HJ-12, approximate Mw 42 kDa, was generally stable in the range of pH 6~10 and below 50°C and its highest activity was observed at 60°C with pH 7~9. The isolated  $\beta$ -1,4-D-arabinogalactanase specifically hydrolyzed  $\beta$ -1,4-galactosyl linkage that is the major structure of soybean arabinogalactan (SAG) but not  $\beta$ -1,3-galactosyl linkage of the other polysaccharides.  $K_m$  was estimated as 0.67 mg/ml by the method of Hanes-Woolf plot. No metals and chemical reagents inhibited the enzyme activity but urea did. The active site of this enzyme assumed to be tryptophan residue. The hydrolysis products from SAG, assayed by gel chromatography, TLC and HPLC, were predominantly galactotetraose (Gal<sub>4</sub>) and triose (Gal<sub>3</sub>) with a small portion.  $\beta$ -1,4-D-arabinogalactanase hydrolyzed ONPG as well as SAG, and the degree of hydrolysis of SAG was 15% which is lower than that by the other  $\beta$ -1,4-galactanases from different sources. SAG treated with this enzyme resulted in the reduction of specific viscosity up to 70%.

$\beta$ -1,4-D-arabinogalactanase(EC 3.2.1.89 :  $\beta$ -1,4-galactanase)는 대두와 같은 쌍자엽 식물 세포벽 다당류인 arabinogalactan과 galactan의  $\beta$ -1,4-galactosyl 결합을 가수분해하는 효소로서 fungi, bacteria 등에서 생산되고 있다(1-3).

$\beta$ -1,4-galactanase에 대한 연구는 주로 세포벽 구조확인(3,4)과 세포벽 분해(5)를 위해 진행되었으며 최근의 연구에서는 arabinogalactan에서부터 galacto 올리고당의 생산에 관심을 가지고 있다(6). 올리고당은 생리적으로 인체의 건강에 유효한 특성을 지녔을 뿐만 아니라 물리적인 특성이 우수하여 식품에 유용하게 사용되고 있다(7). 현재 생산되는 galacto 올리고당은 *Kluyveromyces fragilis*, *K. lactis*, *Bacillus circulans* 및 *Aspergillus oryzae* 등에서 생산되는  $\beta$ -galactosidase를 이용하여 lactose로부터 transgalactosylation 반응에 의해  $\beta$ -1,4 또는  $\beta$ -1,6 결합으로 생산되며 주로 triose가 생산된다(6). 그러나 arabinogalac-

tan에서 부터  $\beta$ -1,4-galactanase를 이용하여 가수분해하여 생산되는 galacto 올리고당에 대해서는 아직까지 보고된 바가 없다.

현재 보고된  $\beta$ -1,4-D-arabinogalactanase는 다양한 크기의 올리고당을 생산하지만 주로 단당류를 생산하고 있다(3). Soybean arabinogalactan(SAG)를 올리고당의 형태로 가수분해 하여  $\beta$ -1,4-galactanase를 생산하는 우수한 균주로서 호알칼리성 *Bacillus* sp. HJ-12를 분리하고 효소 생산조건 및 정제과정을 보고한 바 있다(8). 본 실험에서는 정제한  $\beta$ -1,4-D-arabinogalactanase의 효소학적 특성 및 그 반응 생성물에 대하여 보고한다.

### 재료 및 방법

#### 효소생산

$\beta$ -1,4-galactanase 생산을 위한 배지로는 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)를 사용하였다. 0.1% glucose가 포함된 기본

**Key words:**  $\beta$ -1,4-D-arabinogalactanase, soybean arabinogalactan (SAG), galacto 올리고당

\*Corresponding author

배지에서 18시간 전배양한 균체를 1%(v/v) 접종하여 37°C에서 2일간 회전진탕 배양한 후 8,000 rpm, 4°C에서 30분간 원심분리 한 후 얻어진 상등액에서 조효소를 분리하였다. 이를 유안침전, DEAE-Sephadex A-50 이온교환 chromatography, Sephadex G-75 gel chromatography의 과정을 거쳐 정제한 효소를 실험에 사용하였다.

**효소활성 측정법**

$\beta$ -1,4-D-galactanase의 활성은 Somogyi-Nelson법(9, 10)을 이용하여 soybean arabinogalactan(SAG) 0.5% 용액(0.1M glycine-NaOH 완충액, pH 10.0) 0.4 ml에 효소액 0.1 ml를 첨가하여 40°C에서 10분간 반응시킨 후 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-sulfuric 법(11)을 사용하여 측정하였다.

**기질의 제조**

Soybean arabinogalactan(SAG)은 Morita 법(12)을 이용하여 탈지 대두박으로 부터 열수 추출하여 정제하였으며 수율은 약 4% 정도였다.

**가수분해산물의 확인**

분해 산물을 확인하기 위해서 thin-layer chromatography(TLC)와 HPLC를 사용하였다. TLC는 Slica gel(Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, Merck)을 사용하여 상승법으로 측정하였고, 전개용매는 n-butanol : n-propanol : acetic acid : water(10 : 6 : 3 : 3, v/v)를 사용하였으며, 15% sulfuric acid를 분무한 후 105°C에서 10분간 가열하여 검출하였다. HPLC에 의한 분석은 Waters HPLC를 사용하였으며, column은 carbohydrate analysis column 10  $\mu$ (3.9×300 mm, WATO 84038, Waters Co.)를 사용하였고, 이동상은 acetonitrile : water=75 : 25, 온도는 40°C, detector는 굴절당도계(Waters 410)를 사용하였다. 유속은 2 ml/min, 시료는 20  $\mu$ l를 injection 하였고, standard로는 arabinose, galactose, maltose, raffinose를 사용하였다.

**o-Nitrophenol의 정량**

o-Nitrophenol(ONP)는 50 mM phosphate 완충액(pH 8.0)에 녹인 ONP에 0.2M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>를 동량 혼합한 후 410 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**점도의 측정**

Ostwald viscometer(# 100)을 이용하여 증류수에 대한 sample의 비점도를 측정하였다.

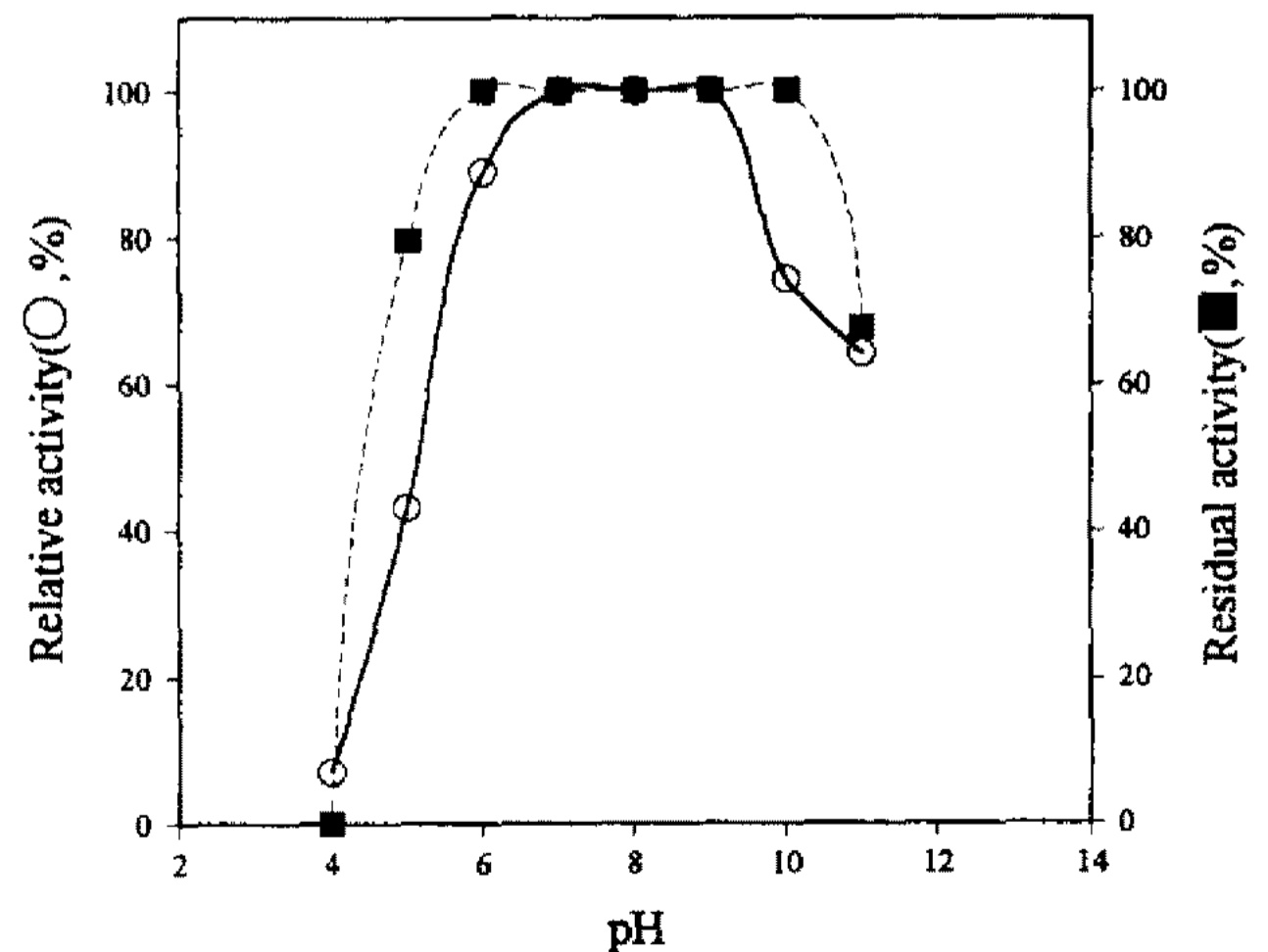
**결과 및 고찰**

**$\beta$ -1,4-galactanase의 물리화학적 특성**

**pH, 온도 효과 및 분자량**  $\beta$ -1,4-galactanase의 효소활성과 안정성에 미치는 pH 효과를 50 mM 완충액을 사용하여 측정하였다(Fig. 1). 효소 활성은 pH 7~9에서 제일 높게 나타났으며, 각 pH 완충액에 효소액을 24°C에서 15시간 방치한 후 잔존 활성을 측정된 결과 pH 6~10까지의 넓은 범위에서 안정성을 유지하였다. 위와 같은 결과는 대부분의 *Bacillus* 유래 galactanase의 최적 pH가 4.5~6.0(4), 6~7(13, 14) 정도로 나타나고 있으며, alkalophilic *Bacillus*  $\beta$ -1,4-galactanase S-2의 경우(6) pH 10에서 최적 활성을 나타내는 것과는 많은 차이를 보이고 있다.

또한  $\beta$ -1,4-galactanase의 각 온도에서의 효소 활성을 측정된 결과 60°C 부근에서 최적 활성을 나타내었으며(Fig. 2) 온도 안정성을 알아보기 위하여 각 온도에서 20 mM Tris-HCl 완충액에서 10분간 방치한 후 잔존 활성을 측정된 결과 50°C까지 안정성이 유지되었다. 이는 *Bacillus* 유래  $\beta$ -1,4-galactanase의 경우에도 최적온도는 50~60°C, 안정성은 45~55°C (2, 6, 13, 14)로 나타나 거의 유사한 결과를 보이고 있다. 최대 효소활성 온도는 Arrhenius plot을 한 결과 57.6°C로 나타났다.

효소의 분자량은 SDS-PAGE 전기영동을 행하여 측정된 결과 본 효소는 약 42,000 dalton의 분자량을



**Fig. 1. Effect of pH on the enzyme activity and stability of the  $\beta$ -1,4-galactanase.**

Buffer (50 mM) used: pH 4~6, acetate buffer; pH 6~8, phosphate buffer; pH 8~11, glycine-NaOH buffer

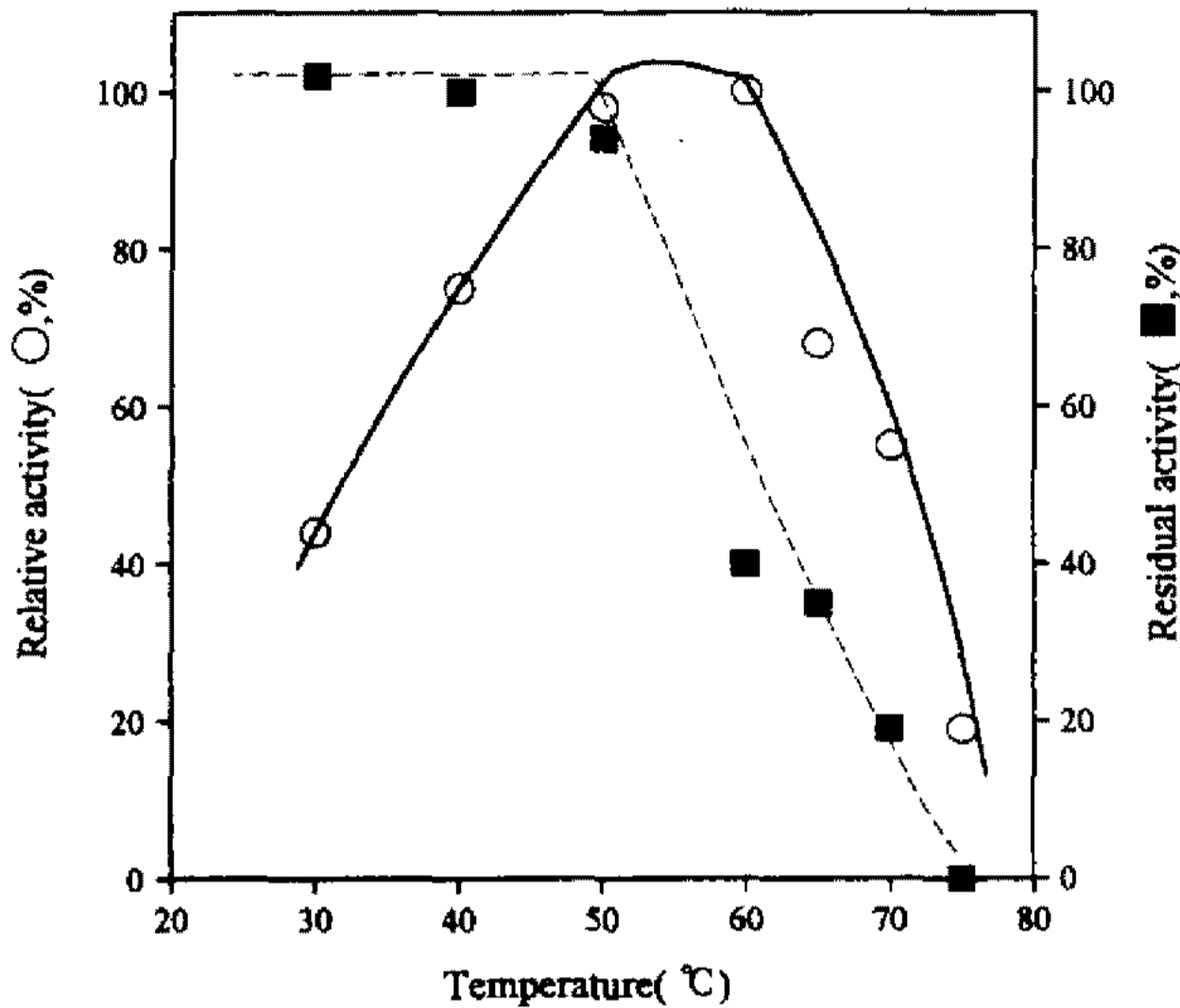


Fig. 2. Effect of temperature on the enzyme activity and stability of the  $\beta$ -1,4-galactanase. Buffer: 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0

가지는 것으로 확인되었다(data not shown). 보고된  $\beta$ -1,4-galactanase의 분자량이 약 36,000~40,000인 것(3)과 비교하면 유사한 분자량을 가짐을 알 수 있다.

**기질 특이성** *Bacillus* sp. HJ-12의  $\beta$ -1,4-galactanase의 효소적 특징을 알아보기 위하여  $\beta$ -1,4-galactosyl 결합을 하고 있는 SAG와  $\beta$ -1,3-galactosyl 결합을 하고 있는 larch wood arabinogalactan(Sigma社) 및  $\beta$ -1,4-xylose 결합을 하고 있는  $\beta$ -1,4-xylan(Birchwood),  $\beta$ -galactosidase가 반응하는 lactose, 3탄당인 raffinose 그리고  $\beta$ -1,4-glucopyranosidic 결합을 하고 있는 CMC(Carboxymethyl cellulose)를 기질로 사용하여 효소액을 작용시켜 효소활성을 측정하였다. 그 결과 SAG를 제외한 기질에서는 효소활성이 전혀 검출되지 않았다. 즉, *Bacillus* sp. HJ-12의  $\beta$ -1,4-galactanase는  $\beta$ -1,4-galactosyl 결합만을 가수분해하고  $\beta$ -1,3-galactosyl 결합 등을 가수분해하지 못하는 기질 특이성을 나타내고 있다고 판단되었다(3).

**Kinetic 및 효소활성 중심**  $\beta$ -1,4-galactanase의 kinetic 상수를 알아보기 위하여 0.1M glycine-NaOH (pH 10.0) 완충액에 0~10 mg/ml로 SAG의 농도를 변화시키면서 효소액(0.5 unit)을 첨가하여 효소 활성을 측정하였다.

효소반응 속도식에서 기질농도의 영향을 증시한 Michaelis-Menten 식을 변형한 Hanes-Woolf plot(16) 식 및 S와 V의 관계인 direct linear plot(16)으로  $K_m$  값을 구한 결과 Hanes-Woolf plot에 의해서는 0.628 mg/ml, direct linear plot에 의해서는 0.5 mg/ml로 거의 유사한 값을 보여 plot 방법에 따른 차이를 보이지 않고 있다(Fig. 3). 이는 보고된  $K_m$  값이 *B. subti-*

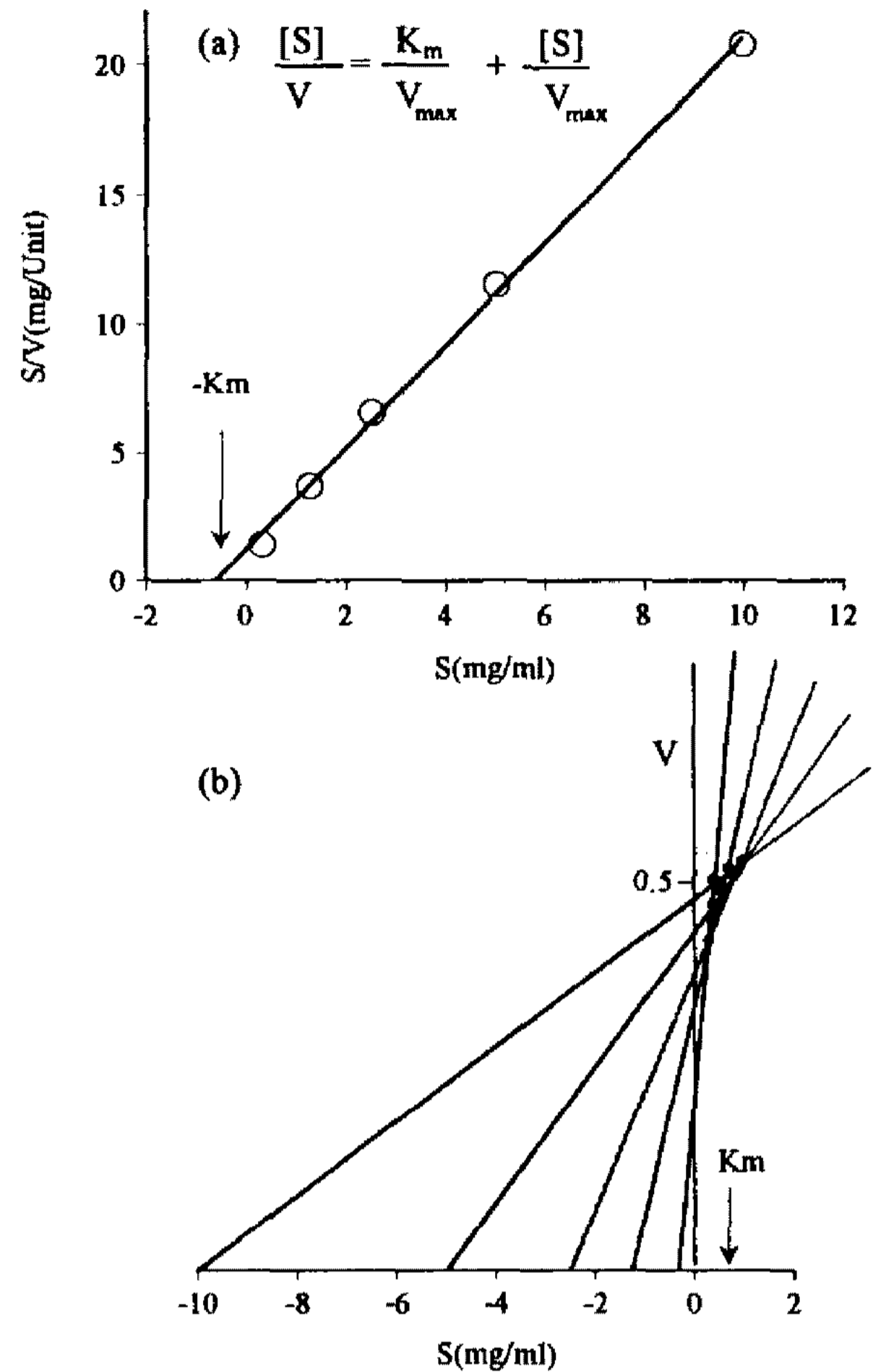


Fig. 3.  $K_m$  estimation of  $\beta$ -1,4-galactanase by (a) Hanes-Woolf plot, (b) Direct-linear plot.

*lis* K-50은 1.13(3), *B. subtilis* var *amylosacchariticus* I, II, III는 각각 0.43, 1.07, 0.86(13) 등의 다양한 값을 보이고 있는 것과 비교하여 보았을 때 본 *Bacillus* sp. HJ-12 유래  $\beta$ -1,4-galactanase의 기질 친화도가 보고된 것에 비해 큰 것으로 판단되었다.

$\beta$ -1,4-galactanase에 대한 금속이온 및 각종 chemicals의 영향을 알아보기 위하여 효소액에 각각을 첨가한 후 24°C에서 30분간 방치한 후 잔존 활성을 측정하였다(Table 1). 그 결과 urea의 경우 약 40%의 활성 저해가 나타났으며, 다른 chemicals에 대해서는 영향을 거의 받지 않은 것으로 나타났다. 위와 같은 결과는 일반적으로  $Hg^{+2}$ ,  $Ag^{+2}$ ,  $Fe^{+2,+3}$ ,  $Cu^{+2}$ , EDTA 등에 의해 저해 받으며,  $Ca^{+2}$  등에 의해 활성화되는 것(3)과는 대조를 보인다. Alkalophilic *Bacillus* S-2의 경우(6)에는 금속이온 및 chemicals에 대한 영향이 없는 것으로 보고되었다.

또한 효소활성 중심에 관여하는 아미노산을 알아보기 위하여 아미노산을 특이적으로 저해하는 화학수식제를 사용하여 1 mM의 농도 하에서 24°C에서 30

분간 방치한 후 잔존 활성을 측정하였다. Tryptophan을 특이적으로 저해하는 N-bromosuccinimide로 처리한 경우 효소 활성이 완전히 저해되어 효소 활성의 중심에는 tryptophan이 존재하는 것으로 생각되었다. *Bacillus* sp. HJ-12가 생산하는  $\beta$ -1,4-galactanase의 효소학적 특징들을 다른 *Bacillus*속 유래 효소와 비교하여 Table 2에 나타내었다.

**Table 1. Effects of various metals and chemical reagents on the activity of  $\beta$ -1,4-galactanase**

Chemicals	Final concentration	Residual activity (%)
EDTA <sup>a</sup>	1 mM	90
SDS <sup>b</sup>	0.1%	97
Urea	6 M	64
HgCl <sub>2</sub>	1 mM	91
FeCl <sub>3</sub>	1 mM	94
MnCl <sub>2</sub>	1 mM	88
AlCl <sub>3</sub>	1 mM	93
CoCl <sub>2</sub>	1 mM	90
MgCl <sub>2</sub>	1 mM	90
CaCl <sub>2</sub>	1 mM	84
NiCl <sub>2</sub>	1 mM	89
ZnCl <sub>2</sub>	1 mM	89
None	—	100

$\beta$ -1,4-galactanase was incubated with various metals and chemical reagents at 24°C for 30 min and then the residual activity was assayed under the standard conditions.

a: EDTA: ethylene diamine tetra acetatic acid

b: SDS: sodium dodecyl sulfate

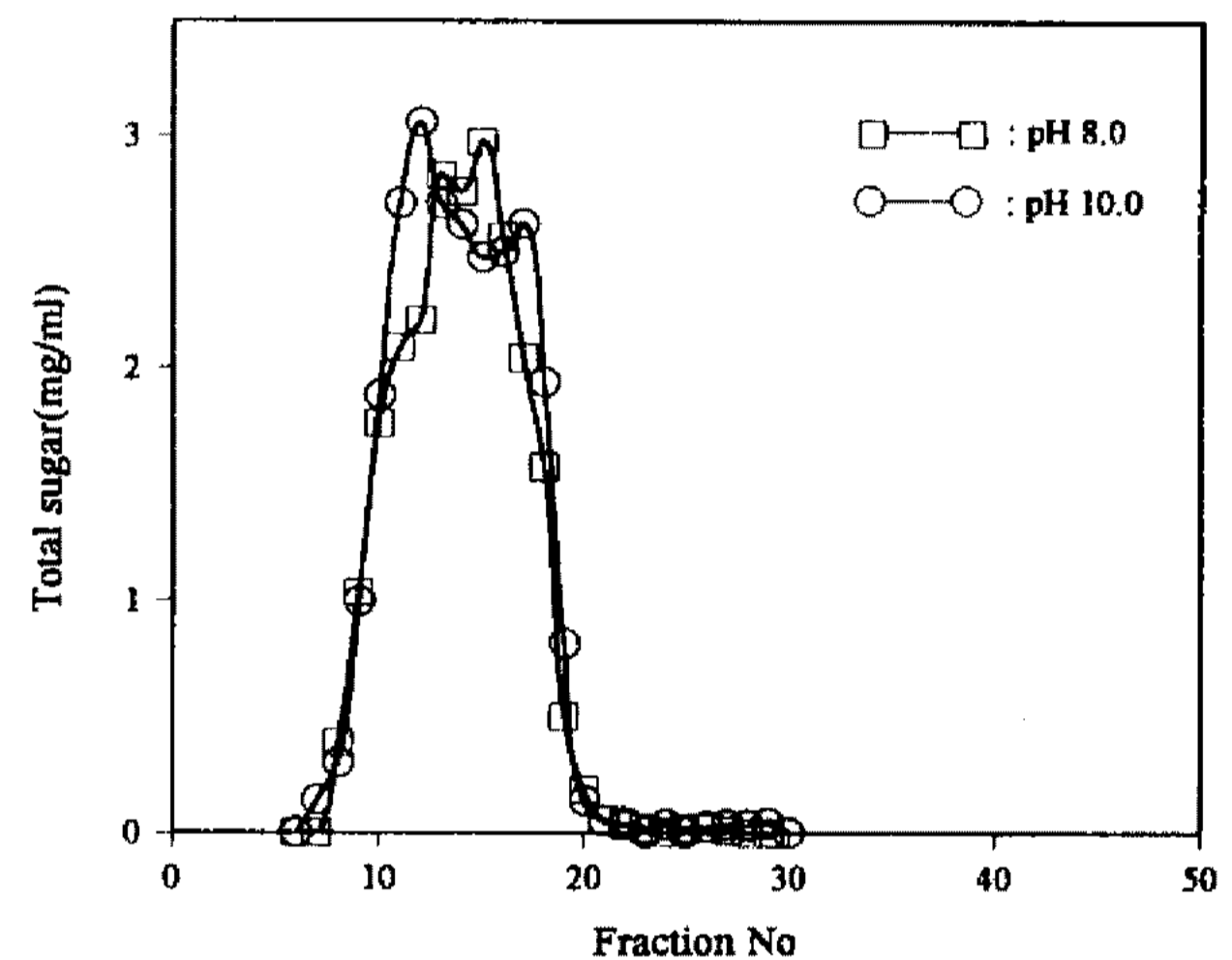
**Table 2. Comparison of enzymatic properties of  $\beta$ -1,4-D-arabinogalactanase from *Bacillus* sp. HJ-12 with different *Bacillus* sp. sources**

Microorganism	pH optimum	pH Stability	Temp. optimum (°C)	Temp. Stability (°C)	Chemical Effect*	Mw (10 <sup>4</sup> )
<i>B. subtilis</i> No.17(4)	4.5~6.0	6~8	37	<37		
<i>B. subtilis</i> K-50(2)	6.0	5~9.5	55	<50	Fe, Ag, Hg(-)	3.7
<i>B. subtilis</i> var <i>amylosacchariticus</i> (13)	6~7	5.5~10.5	50	<50	EDTA(-) Ca <sup>2+</sup> (+)	3.2~3.6
<i>B. subtilis</i> (15)	6.5~7	6~10	60	<55	Hg, Cu(-)	3.6
<i>B. sp.</i> S-2(6)	10.0	7~12	50	<45	ne	4.0
<i>B. sp.</i> HJ-12	7~9	6~10	60	<50	urea(-)	4.2

\*: (+) indicates the enzyme activation whereas (-) indicates the inhibition. ne indicates no effect.

### $\beta$ -1,4-galactanase의 작용

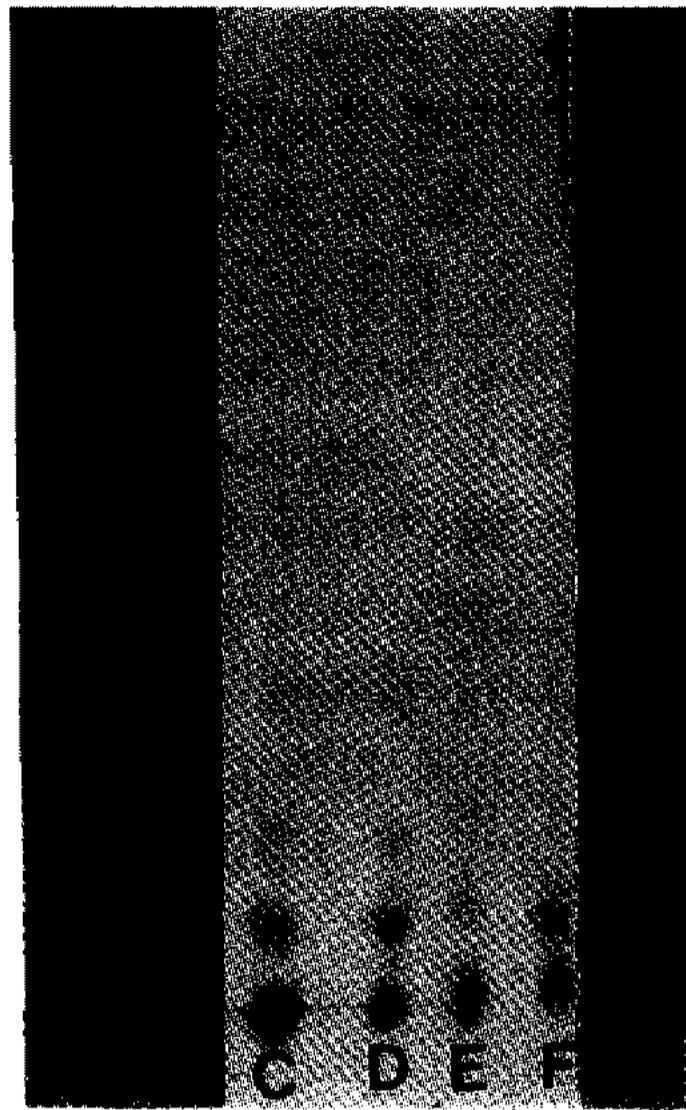
**가수분해 산물** 가수분해 산물을 분석하기 위하여 효소액 2 unit를 2% SAG에 24시간 반응시킨 후 3분간 boiling하여 효소를 불활성화 시킨 후 원심분리하여 상등액을 얻고 이를 vacuum evaporator로 농축한 다음 Sephadex G-50 gel chromatography를 행하였다 (Fig. 4). 이때 pH에 따른 가수분해 효과를 살펴보기 위하여 SAG를 pH 8.0(50 mM phosphate 완충액)과 pH 10.0(50 mM glycine-NaOH 완충액)에서 각각 실시하였다. 그 결과 pH에 관계없이 D.P.가 10 이상인 올리고당이 용출되었으며, 단당류는 나타나지 않았다.



**Fig. 4. Fractionation profiles of SAG treatment with  $\beta$ -1,4-galactanase in different pH conditions.**

About 200 mg of enzymatic hydrolysate was loaded on Sephadex G-50 column (1.4×7.5 cm) and eluted with water.

Flow rate: 18 ml/hr, each fraction: 3 ml; fraction 13: DP 16, fraction 18: DP 12



**Fig. 5. TLC chromatogram of the oligosaccharide fractionated on Sephadex G-50 in a hydrolysate of SAG by  $\beta$ -1,4-galactanase.**

A~B: standard, A-galactose B-maltose

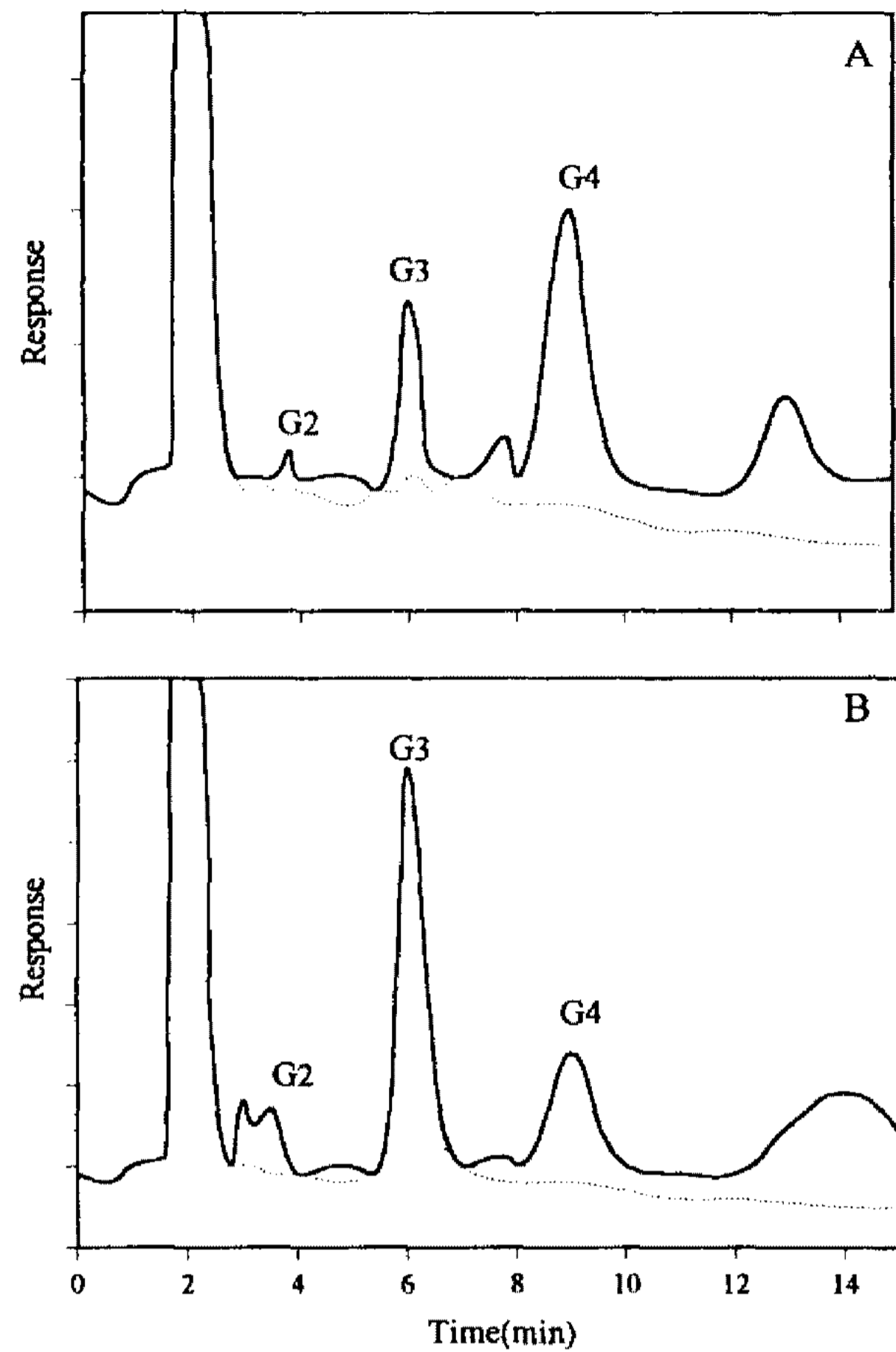
C~F: fractionized hydrolysate (refer to Fig. 4)

C: fraction 13 at pH 10.0, D: fraction 18 at pH 10.0, E: fraction 13 at pH 8.0, F: fraction 16 at pH 8.0, G: HCl hydrolysate

그러나 pH 10인 경우 두개의 peak 형태로 pH 8과는 차이를 보여 이를 확인하기 위하여 TLC를 행하였다 (Fig. 5). pH 8은 fraction 13과 16을, pH 10은 fraction 13과 18을 확인한 결과 spot에 있어서는 pH에 따른 차이를 거의 보이지 않고 있다. 또한 이를 HCl 용액으로 4시간 가열하여 가수분해하여 단당류화 한 후 TLC로 측정된 결과 galactose만이 검출되어 가수분해 산물이 galactose가 결합된 올리고당으로 판단되었다.

가수분해 산물을 좀 더 확실하게 구분하기 위하여 2 unit의 효소를 pH 8과 pH 10의 0.5% SAG 60 ml에 첨가하여, 각 시간마다 3 ml씩 sampling 하여 효소 활성을 없애기 위해 2분간 boiling 하였다. 이를 8,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 반응하지 않은 SAG와 실활된 효소를 제거하였으며, 상등액 중의 당을 HPLC로 분석하였다(Fig. 6). 그 결과 tetraose( $\text{Gal}_4$ )로 생각되는 peak와 그 보다 분자량이 큰 peak가 pH에 상관없이 주반응생물로 나타났으며 triose( $\text{Gal}_3$ )가 소량 생산되었다. pH에 따른 반응생물은 차이가 없었으나 pH 8의 경우에는 triose( $\text{Gal}_3$ )가 0시간에 다량 나타났지만 반응 후에는 그 면적의 증가가 크게 나타나지 않아서 이는 SAG의 pH에 따른 용출 효과로 판단되었다.

즉 *Bacillus* sp. HJ-12 유래  $\beta$ -1,4-galactanase는 가수분해 산물로서  $\text{Gal}_4$ 를 주산물로 하여 소량의  $\text{Gal}_3$ 를 생산하였다. 보고된  $\beta$ -1,4-galactanase의 분해산물



**Fig. 6. Comparison of SAG hydrolysate by HPLC at different pH (50 mM).**

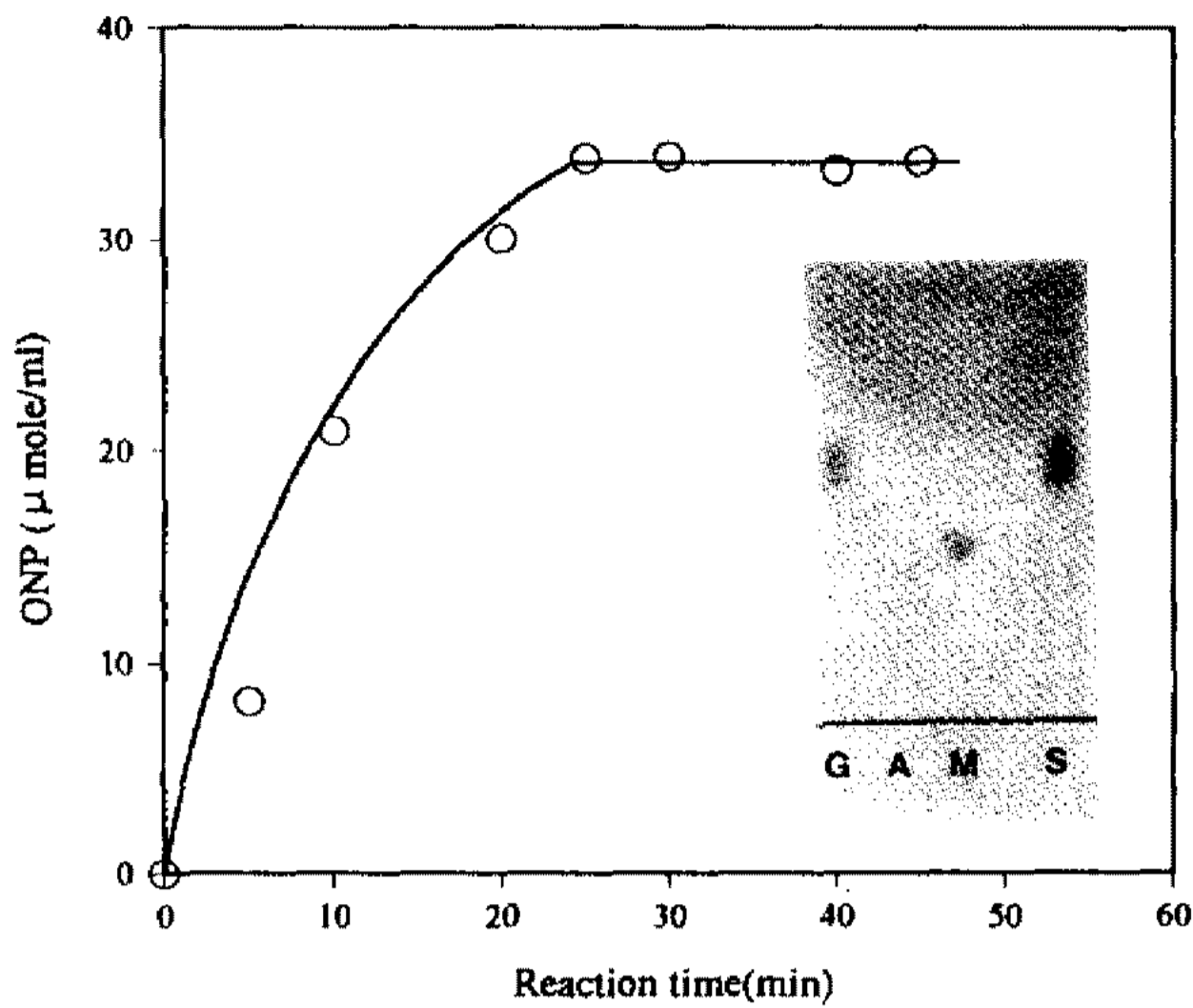
A: pH 8.0, phosphate buffer

B: pH 10.0, glycine-NaOH buffer

Reaction time: ·····, — 0 min, 60 min

은 주로  $\text{Gal}_4$ 에서  $\text{Gal}$ 까지 혼재되어 나타나며, 2당류 (galactobiose :  $\text{Gal}_2$ )를 주로 생성하고 있는 것으로 나타났다(4). 일부에서는  $\text{Gal}_4(4-6)$ ,  $\text{Gal}_3(6)$ 가 나타나기도 하여 본 효소의 작용과는 약간의 차이가 있으며 또한  $\beta$ -galactosidase에 의해 생산되는 galacto 올리고당은 대부분 3당류가 주로 나타나고 있다(7).

**ONPG와의 반응 생성물**  $\beta$ -1,4-galactanase는  $\beta$ -1,4-D-arabinogalactan 이외에도  $\beta$ -1,4-galactosyl 결합을 하고 있는 ONPG(o-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside), PNPG(p-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside)에도 효소반응을 하는 특성을 보이고 있다. 또한,  $\beta$ -1,4-galactanase가 가수분해 작용뿐만 아니라, lysozyme,  $\alpha$ -amylase, xylanase 등의 여러 endo-glycanases에 나타나는 것과 유사하게, ONPG에 작용하여 올리고당을 생합성하는 transgalactosylation 작용을 하는 것도 보고(18, 19)되고 있다. 예를 들어 *Penicillium citrinum*의 endo-galactanase를 ONPG에 작용시키면 ONP기가 유리되어 ONP와 galactose만 생기

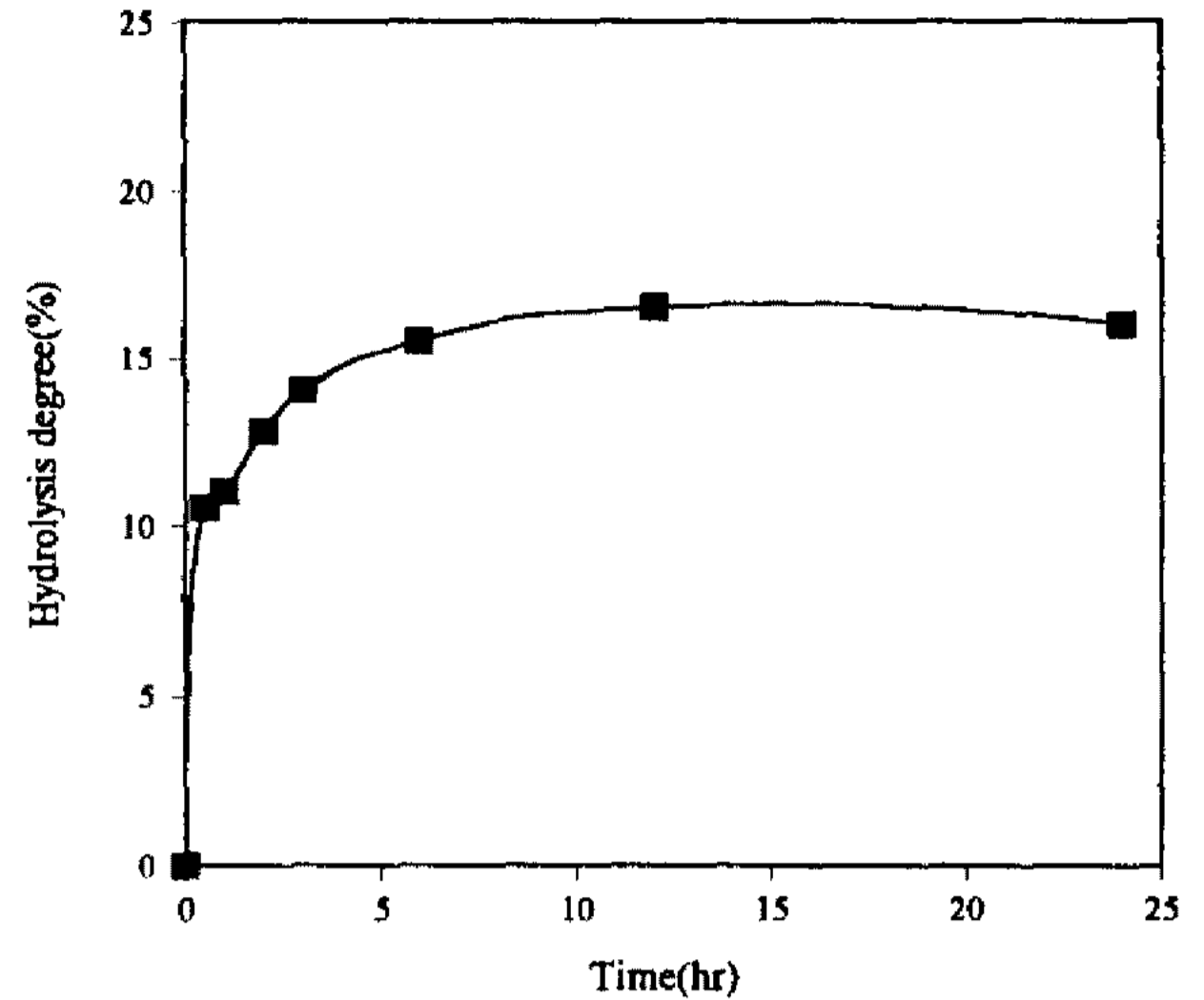


**Fig. 7. Hydrolysis profiles of ONPG by  $\beta$ -1,4-galactanase.**

A reaction mixture (5 ml) containing 50 mM ONPG and the enzyme (10 unit/ml) in 50 mM phosphate buffer, pH 8.0 was incubated 40°C.

Photo shown the TLC chromatogram of 50 min reaction hydrolysate.

Standard: G-Gal A-Ara M-Maltose, S: 50 min reaction hydrolysate



**Fig. 8. Progressive curve of hydrolysis of SAG with  $\beta$ -1,4-galactanase.**

6 ml of 0.5% SAG was reacted with 1 ml of  $\beta$ -1,4-galactanase (1 unit/ml) in a 50 mM phosphate buffer, with pH 8.0.

Hydrolysis degree indicates the level of releasing reducing sugar over SAG's  $\beta$ -1,4-galactosyl linkage sugar.

는 것이 아니라, ONP기를 갖거나 가지지 않는 올리고당이 함께 축적된다. 이때 분해와 합성의 비율, 생성물의 구조는 반응 조건, 효소의 source에 따라 다르게 나타나는 것으로 알려져 있다(14). Transfer 기능은 exo-enzyme에서도 나타나서 *B. subtilis*의 exo-1,4- $\beta$ -D-galactanase는 기질인 SAG를 말단에서 부터 galactobiose 단위로 절단하는데 주된 산물인 galactobiose 이외에 이것이 transfer 되어 생긴 galactotetraose도 소량 축적되는 것으로 보고되고 있다(14, 18).

본 *Bacillus* sp. HJ-12의  $\beta$ -1,4-galactanase를 50 mM phosphate 완충액(pH 8.0)에 녹인 50 mM ONPG에 작용시킨 결과(Fig. 7) lag phase 없이 약 80%를 가수분해하였다. 이는 transgalactosylation 작용시에 흔히 보이는 특징으로 초기에 sigmoid 형태로 lag phase를 나타내는데 이 시기에 transgalactosylation과 축합반응이 일어나는 것으로 설명하고 있어 본 실험 결과와는 차이를 보이고 있다. ONPG와의 반응으로 생성된 물질을 확인하기 위하여 TLC로 측정된 결과 모두 galactose로 나타나서 본  $\beta$ -1,4-galactanase는 transgalactosylation 반응은 없이 가수분해 작용만 하는 것으로 판단되었다.

**가수분해도 및 점도변화** 효소 작용에 의한 가수분해도를 살펴보기 위하여 효소액 1 unit를 0.5% SAG (50 mM phosphate buffer, pH 8.0) 6 ml에 첨가한 후

시간에 따른 환원당을 측정하였다(Fig. 8). 그 결과 SAG의  $\beta$ -1,4-galactosyl 결합의 약 15% 정도를 가수분해한 것으로 나타났다. 이는 *B. subtilis* K-50의 33% (13)과 *Bacillus*의 28~34%(3)의 경우에 비해 낮은 가수분해도를 나타내는 데 이는 위의 경우에 가수분해산물로서 galactobiose( $Gal_2$ )와 galactose( $Gal_1$ )을 나타냄으로서 본 효소에 비해 상대적으로 가수분해도가 큰 것으로 판단되었다.

$\beta$ -1,4-galactanase에 의한 SAG의 물성 변화를 관찰하기 위하여 1% SAG(0.1M glycine-NaOH 완충액, pH 10.0) 20 ml에 2 unit의 효소를 첨가하여 40°C에서 12시간 처리한 후 Ostwald viscometer(# 100)로 비점도를 측정하였다. 그 결과 효소로 처리시 SAG의 비점도가 1.16에서 0.35로 약 70%의 점도 감소가 있었다.

그러므로 SAG는 효소처리에 의하여 galacto 올리고당으로 전환되면서 SAG의 점도가 감소됨을 알 수 있다.

### 요 약

$\beta$ -1,4-D-arabinogalactanase는 pH 7~9, 60°C에서 최적 활성을 보였으며, pH 6~10과 50°C에서 활성이 유지되었다. SDS-PAGE를 이용하여 측정된 분자량은 42,000 dalton이었으며,  $\beta$ -1,4-D-arabinogalactanase의 작용은  $\beta$ -1,4-galactosyl 결합을 하고 있는 SAG에서만

나타나며,  $\beta$ -1,3-galactosyl 결합 등을 가진 그 외 다른 기질에 대해서는 활성이 없는 기질 특이성을 나타내었다. Hanes-Woolf plot에 의한  $K_m$ 은 0.67 mg/ml이었다. 또한 효소활성 부위에는 Trp이 위치한 것으로 유추하였다.

SAG의 효소가수 산물을 gel chromatography, TLC 및 HPLC로 분석한 결과 tetraose(Gal<sub>4</sub>)와 소량의 triose(Gal<sub>3</sub>)인 올리고당을 생산하였으며 pH에 따른 차이가 없었다.  $\beta$ -1,4-D-arabino galactanase는 SAG 뿐만 아니라 ONPG에도 작용하여 분해하는 작용을 하며, 또한 SAG의 기질 분해도는 15% 정도를 나타내었다. SAG를 효소 처리한 결과 비점도가 약 70% 감소된 결과를 나타내었다.

### 참고문헌

- Clarke, A.E., R.L. Anderson, and B.A. Stone. 1979. Form and function of arabinogalactans and arabinogalactan-proteins. *Phytochemistry* **18**: 521-540.
- McCleary, B.V. and N.K. Matheson. 1986. V. Pectic polysaccharides. *Adv. Carbohydr. Biochem.* **44**: 182-186.
- Dekker, B.F.H. and G.N. Richards. 1976. Hemicellulases: their occurrence, purification, properties and mode of action. *Adv. Carbohydr. Biochem.* **32**: 277-352.
- Labavitch, J.M., L.E. Freeman, and P. Albersheim. 1976. Structure of plant cell walls. *J. Biol. Chem.* **251**: 5904-5910.
- 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.
- Tsumura, K., Y. Hashimoto, T. Akiba, and K. Hotikoshi. 1991. Purification and properties of galactanases from alkalophilic *Bacillus* sp. S-2 and S-39. *Agr. Biol. Chem.* **55**: 1265-1271.
- 박관화, 정기섭, H. Hidaka, S. Kitahata, 서진호, and Y. Kaji. 1994. 올리고당의 기능성. 한국식품과학회 심포지움.
- 신해헌, 변유량. 1995.  $\beta$ -1,4-D-arabinogalactanase 생산균주의 분리 및 효소정제. 한국산업미생물학회지.
- Somogyi, N. 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* **195**: 19-23.
- 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**(3): 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.
- 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.
- Nakano, H., S. Takenishi, and Y. Watanabe. 1985. Purification and properties of two galactanase from *Penicillium citrinum*. *Agr. Biol. Chem.* **49**: 3445-3545.
- Rickwood, D. 1988. *Enzyme kinetics*, IRL press, Oxford, Washington D.C., USA.
- Van de Vis, J.W., J.F. Searle-van Leeuwen, H.A. Siliha, F.J.M. Kormelink and G.J. Voragen. 1991. Purification and characterization of endo-1,4- $\beta$ -D-galactanase from *Aspergillus niger* and *Aspergillus aculeatus*: Use in combination with arabinases from *Aspergillus niger* in enzymic conversion of potato-arabinogalactan. *Carbohydr. Poly.* **16**: 167-187.
- Nakano, H., S. Kitahata, H. Kinugasa, Y. Watanabe, H. Fujimoto, K. Ajisaka, and S. Takenishi. 1991. Transfer reaction catalyzed by exo- $\beta$ -1,4-galactanase from *Bacillus subtilis*. *Agr. Biol. Chem.* **55**(8): 2975-2982.
- Nakano, H., S. Takenishi and Y. Watanabe. 1988. Transfer reaction catalyzed by galactanase from *Penicillium citrinum*. *Agr. Biol. Chem.* **52**: 1319-1400.

(Received 18 August 1995)