

α -Galactosidase를 생산하는 *Bacillus licheniformis* YB-42의 분리와 효소 특성

김현숙¹ · 이경섭¹ · 소재호¹ · 이미성³ · 최준호³ · 윤기홍^{1,2,*}

¹우송대학교 응용식품 · 영양학부, ²우송대학교 생물소재 응용연구센터, ³씨티씨바이오 중앙연구소

Characterization of Extracellular α -Galactosidase Produced by *Bacillus licheniformis* YB-42. Kim, Hyun Suk¹, Kyung-Seob Lee¹, Jae Ho So¹, Mi-Sung Lee³, Joon Ho Choi³, and Ki-Hong Yoon^{1,2,*}. ¹School of Applied Food and Nutritional Science, ²Bioresource and Application Research Center, Woosong University, 17-2, Jayang-dong, Dong-gu, Daejeon 300-718, ³R&D Center, CTCBIO Inc., Seoul 305-600, Korea – A bacterium producing the α -galactosidase was isolated from Korean soybean paste. The isolate YB-42 has been identified as *Bacillus licheniformis* on the basis on its 16S rRNA sequence, morphology and biochemical properties. The α -galactosidase activity was detected in both the culture supernatant and the cell extract of *B. licheniformis* YB-42. The partially purified extracellular α -galactosidase was obtained from the culture supernatant by DEAE-Sepharose column and Q-Sepharose column chromatography. The enzyme showed the maximum activity for hydrolysis of *para*-nitrophenyl- α -D-galactopyranoside (*pNP*- α Gal) at pH 6.5 and 45°C. It was able to hydrolyze oligomeric substrates such as melibiose, raffinose and stachyose to liberate galactose residue, indicating that the α -galactosidase of *B. licheniformis* YB-42 hydrolyzed α -1,6 linkage. The hydrolyzing activity of α -galactosidase for both *pNP*- α Gal and melibiose was dramatically decreased by galactose. Both glucose and mannose inhibited the activity for *pNP*- α Gal less than galactose.

Key words : *Bacillus licheniformis*, identification, α -galactosidase, property, reaction product

α -Galactosidase(α -D-galactoside galactohydrolase, EC 3.2.1.22)는 식물, 미생물, 동물에 널리 분포되어 있으며, galactose 잔기를 함유한 galactomannan 다당류나 melibiose (galactose- α -1,6-glucose), raffinose(galactose- α -1, 6-sucrose), stachyose(galactose- α -1,6-raffinose) 등의 저당류 또는 galactomannan에서 α -1,6 결합의 α -galactose 잔기를 가수분해한다 [6]. 이러한 활성을 지니는 α -galactosidase는 산업용 효소로 이용되고 있는데, 제당산업에서 당밀에 함유된 raffinose가 일정농도(6~10%) 축적되면 sucrose의 결정화가 중지되어 폐당밀로 폐기되는 원인이 되므로 당밀에 α -galactosidase를 처리하여 raffinose를 가수분해시키면 원당에서 sucrose의 회수율이 증가될 수 있다[9, 22]. 인간과 단위동물들은 소화기관 내에 α -galactosidase가 결핍되어 있어 두과류에 존재하는 raffinose와 stachyose가 소화되지 않고 대장으로 도달하여 가스를 생산하는 세균인 *Clostridium* sp.와 *Bacteroides* sp.에 의해 분해되어 상당량의 메탄, 이산화탄소, 수소 가스가 생성되어 고창증의 원인이 된다[24]. 그러므로 콩을 원료로 사용하는 식품에 α -galactosidase를 처리하면 이러한 현상을 방지하여 두유 식품의 영양적인 질의 개선을 이룰 수 있으며[7]

사료내 대두박의 영양효율을 높일 수 있어 사료첨가용 효소로도 유용성이 높다[14]. 내열성 α -galactosidase는 연질목의 galactomannan에 존재하는 galactose 측쇄를 제거하여 mannanase와 동시에 처리하면 galactomannan 분해능을 향상시킬 수 있어 펄프와 제지산업에 이용하고자 하는 시도가 이루어지고 있으며[3], α -galactosidase를 생산하는 유산균을 두 유발효에 이용하고자 하는 연구도 활발히 진행되고 있다[2, 25].

다수의 곰팡이가 세포외 α -galactosidase를 생산하는 것으로 알려져 있으며 *Aspergillus niger*[5], *Trichoderma reesei*[29], *Penicillium simplicissimum*[23]은 최소한 2 종류 이상의 α -galactosidase를 생산한다. 또한 *Saccharomyces cerevisiae*와 *Hansenula polymorpha*에서 세포외 분비효소로 생산하며[10], *Mortierella vinacea*는 2 종류의 α -galactosidase를 생산한다[26]. 세균에서는 *Pseudomonas fluorescens*[11], *Bifidobacterium adolescentis*[18], *Bacillus stearothermophilus*[28], *Thermus brockianus*[8]와 *Clostridium josui*[16], *Lactobacillus plantarum*[27], *Carnobacterium piscicola*[4]등에서 효소와 그 유전자의 특성이 밝혀졌으며, *Bifidobacterium adolescentis*의 α -galactosidase는 당 전이활성도 지니고 있다. 본 연구에서는 콩이 주 원료인 된장에 존재하는 미생물 중에서 콩에 함유된 raffinose와 stachyose를 분해하는 α -galactosidase의 생산균을 탐색하여, 분리균이 생산하는 α -galactosidase의 반응특성을 조사하였다.

*Corresponding author

Tel: 82-42-630-9742, Fax: 82-42-636-2676

E-mail: ykh@lion.woosong.ac.kr

재료 및 방법

α-Galactosidase 생산균의 탐색

된장을 적정량의 생리식염수에 현탁, 현탁액의 적당량을 취하여 LB 평판배지(yeast extract, 5 g; tryptone, 10 g; NaCl, 5 g; agar, 15 g; water, 1 liter)에 도말한 후 37°C에서 하룻밤 배양하였다. 형성된 콜로니 중에서 서로 다른 모양을 보이는 콜로니를 LB 액체배지에 접종하여 37°C에서 약 20시간 진탕배양한 후 균체와 배양상등액에 존재하는 α-galactosidase 활성을 측정함으로써 α-galactosidase 생산균을 탐색하였다

분리균주의 동정

분리균의 형태적 관찰을 위해서는 그람염색과 포자염색을 실시하였으며, 생화학적 특성을 조사하기 위해서 API 50 CHB kit(Biomereux, France)를 사용한 당 이용성을 분석하였다. 분리균의 16S rRNA의 염기서열을 분석하기 위해서 분리균의 16S rRNA 유전자 단편을 중합효소 연쇄반응(PCR)에 의해 증폭한 후, 증폭된 16S rRNA 유전자 단편을 정제하여 dye terminator cycle sequencing kit와 373A automate DNA sequencer(Perkin Elmer Co., USA)를 사용하여 염기서열을 결정하였다. 중합연쇄 반응을 위해서는 세균의 16S rRNA 유전자의 보존적 지역의 염기서열 5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'(염기서열 위치 9~27 지역), 5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3'(염기서열 위치 1523~1542 지역)을 primers로 사용하였으며, *B. licheniformis* YB-42로부터 분리한 총 염색체 DNA를 주형으로 사용하였다. PCR 반응액은 template DNA(10 ng), 10 mM Tris(pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 30 pmol primers와 5 U Taq polymerase로 구성되어 95°C에서 60초, 60°C에서 30초, 72°C에서 90초간 반응을 30회 반복하여 16S rRNA를 코딩하는 DNA 단편을 증폭하였다.

α-Galactosidase 조효소액 제조

B. licheniformis YB-42를 LB 배지에서 하룻밤 배양한 후 배양액을 1%(v/v)가 되도록 동일 성분의 본 배양액에 접종하고 37°C에서 baffled flask를 사용하여 20시간 동안 진탕 배양 하였다. 배양액을 원심분리한 후 20 mM 인산 완충용액(pH 6.5)로 현탁한 균체의 초음파 파쇄상등액과 배양상등액을 각각 ammonium sulfate (20~70%)로 처리하고 12,000 rpm에서 30분 동안 원심분리 한 후 각 침전물을 20 mM 인산 완충용액(pH 6.5)에 녹이고 이를 동일한 완충용액에 투석한 후 조효소액으로 사용하였다.

α-Galactosidase의 부분 정제

B. licheniformis YB-42를 LB 배지에 접종하여 37°C에서 20시간 배양한 후 배양상등액에 20~70% ammonium sulfate

를 처리하고 원심분리하여 얻은 침전물을 20 mM Tris·HCl buffer(pH 8.0)에 녹이고 동일 buffer에 투석하였다. 투석한 단백질 용액을 20 mM Tris · HCl buffer(pH 8.0)로 평형시킨 DEAE-Sepharose column에 loading하고 NaCl 농도를 0~0.4 M이 되도록 농도구배를 주어 증가시키면서 흡착된 α-galactosidase를 용출하였다. α-Galactosidase 활성을 보이는 분획을 모아 한외초여과 과정을 수행하여 농축한 효소액을 20 mM Tris · HCl buffer(pH 8.0)에서 투석한 후 동일한 완충용액으로 평형화 시킨 Q-Sepharose column을 사용하여 DEAE-Sepharose column 크로마토그래피와 동일한 조건으로 정제과정을 수행하였다. 용출된 분획 중 α-galactosidase의 활성이 높은 분획을 모아 20 mM 인산 완충용액(pH 6.0)에 투석하여 부분정제 효소액을 제조하였다.

α-Galactosidase 활성 측정

α-Galactosidase의 활성은 다음의 과정에 의해 측정하였다. 0.5 mM *p*-nitrophenyl-α-D-galactopyranoside(*p*NP-αGal)와 50 mM 인산 완충용액(pH 6.5)를 포함한 반응액에 효소를 첨가하여 45°C에서 10분간 반응시킨 후 반응액의 2배 부피의 1 M Na₂CO₃ 용액을 첨가하여 반응을 종결시키고 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소의 활성도는 1분 동안 1 μmole의 *para*-nitrophenol을 유리시키는 효소량을 1 unit로 정의하였다.

α-Galactosidase 활성염색

B. licheniformis YB-42의 배양상등액과 균체 파쇄상등액 및 이들을 ammonium sulfate (20%~70%)로 분획한 조효소액을 사용하여 SDS-PAGE를 수행한 후, polyacrylamide gel을 renaturation 완충용액(25% iso-propanol, 50 mM sodium citrate(pH 6.0)으로 15 분씩 3 회 세척하여 SDS를 제거하였다. 이를 다시 50 mM 인산 완충용액(pH 6.5)로 15 분씩 2 회 세척하고 polyacrylamide gel을 0.2 mM 4-methylumbelliferyl-α-D-galactoside (MUαGal)를 함유한 동일한 완충용액에 20분간 방치하여 MUαGal이 gel내로 침투하게 한 후 gel을 건져내 45°C에서 1 시간 반응하였다. 반응이 끝난 후 polyacrylamide gel을 자외선을 조사하여 α-galactosidase 활성 밴드를 관찰하였다.

반응산물 분석

Melibiose, raffinose, stachyose를 각각 반응기질로 하여 효소반응을 수행한 후에 반응액을 95°C에서 3분 동안 열 처리한 후 원심 분리하여 단백질 침전물을 제거하고 상등액을 적정량 취해 chloroform, acetic acid와 증류수(4.3:5:0.7, (v/v)) 혼합용액을 전개용액으로 하여 silica gel-precoated thin layer plate(Merck Kiesegel, No. 5748)에서 박층 크로마토 그래피를 수행하였다. 전개된 물질을 발색시키기 위해서는 9 ml ethanol, 0.5 ml *p*-anisaldehyde, 0.5 ml sulfuric acid

와 glacial acetate 몇 방울을 혼합한 발색제 용액을 뿌린 후, 120°C에서 10분간 방치하였다.

결과 및 고찰

α -Galactosidase 생산균주의 분리와 동정

가정에서 제조된 된장시료를 56 점 수집하여 적정량의 생리식염수로 희석하고 LB 한천 배지에 도말한 후 37°C에서 하룻밤 배양하였다. 각각의 된장시료에서 콜로니의 모양이 다른 것으로 보이는 약 3~10개의 균주를 분리함으로써 약 300주의 분리균을 확보하였다. α -Galactosidase 생산균을 탐색하기 위해 분리된 균주를 LB 액체배지에 접종하여 37°C에서 배양한 후 배양상등액에서 높은 α -galactosidase의 활성을 보이는 균주를 분리하고 이를 YB-42로 명명하였다. 분리균의 고분자 물질의 분해능을 조사하기 위해 0.5% locust bean gum, 1% skim milk, 0.2% potato starch, 1% tributyrin과 0.5% carboxymethyl cellulose(CMC)를 각각 첨가한 평판배지에서 하룻밤 배양하여 분해능을 조사한 결과, 이들 물질을 모두 분해하였으며, 평판배지에 접종하여 30°C~60°C에 배양하였을 때 YB-42 균주는 55°C까지는 정상적인 성장을 하였으나 60°C 이상에서는 성장하지 못하는 것으로 확인되었다.

분리균 YB-42를 동정하기 위해 형태적 특성을 조사한 결과, 포자를 형성하는 그람양성 간균으로 확인되었다. API 50 CHB kit를 사용하여 조사한 YB-42의 탄수화물 이용성은 *B. licheniformis*와 유사도가 99.2%로 가장 높게 나타났다. 또한 PCR로 증폭된 16S rRNA의 DNA 단편을 직접 주형으로 사용함으로써 1,497 bp 크기의 염기서열을 결정하였고(GenBank accession number AY601721), 이를 BLAST 조사 프로그램을 사용하여[1] NCBI database에 있는 기존에

알려진 균주의 것과 비교한 결과 *B. licheniformis*의 16S rRNA(GenBank accession number AJ582722)와 일치하였다. 따라서 상기 특성으로 보아 분리균 YB-42는 *B. licheniformis*에 속하는 균으로 판단되었으며, 특히 분리균이 *B. licheniformis*의 특성인 55°C에서도 성장할 수 있는 성질과도 일치함을 알 수 있다.

B. licheniformis YB-42의 균체내·외의 α -galactosidase 활성

B. licheniformis YB-42가 배양상등액과 균체 파쇄상등액의 pNP- α Gal 가수분해 효소활성은 배양액 부피기준으로 109 mU/ml과 139 mU/ml로 각각 나타나, 분리균이 생산하는 α -galactosidase는 균체외에 약 44%, 균체내에 약 56%가 존재함이 확인되었다. 대조균으로 *B. licheniformis* KCTC 2215를 사용하여 효소 활성을 조사하였으나, 분리균 YB-42와는 달리 균체파쇄액과 배양상등액에서 모두 α -galactosidase의 활성이 관찰되지 않았으며 현재까지 α -galactosidase를 생산하는 *B. licheniformis*에 관한 보고된 바도 없다. 또한 곰팡이에서 생산되는 α -galactosidase와는 달리 대부분의 세균에서는 α -galactosidase가 균체내 또는 균체에 결합된 상태로 존재하고 있는 것으로 알려져 있다[4, 11, 16, 18, 21, 27]. *B. licheniformis* YB-42의 배양상등액에서 나타나는 α -galactosidase 활성이 배양 중 균체가 파괴되어 나타난 것인지 확실하지 않다.

균체내·외의 효소를 비교하기 위해 배양상등액과 균체 파쇄상등액을 ammonium sulfate(20%~70%)로 분획하여 얻은 조효소액을 사용하여 반응온도와 pH를 달리하면서 α -galactosidase 활성을 측정함으로써 반응온도와 반응 pH에 따른 효소활성을 조사하였다. 그 결과 Fig. 1에 보인 바와 같이 균체내 효소와 균체외 효소는 반응온도 30°C~60°C, 반응

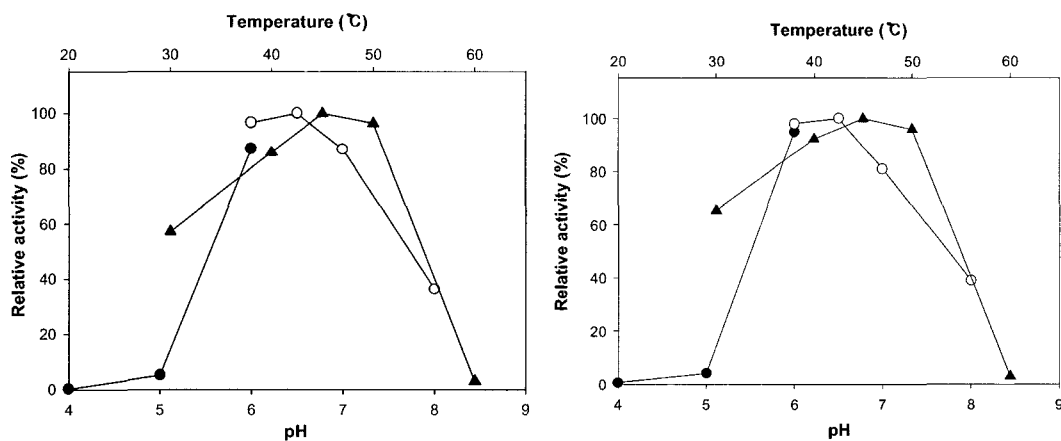


Fig. 1. Effects of reaction temperature and pH on the α -galactosidase activity of cell-free extract(left) and culture supernatant (right). Temperature profile(-▲-) was obtained by measuring the α -galactosidase activities at different temperatures and pH 6.5. The reactions was done at 45°C and various pHs for determining the pH profile(circle). Buffers used were as follows: sodium citrate(-●-), sodium phosphate(-○-).

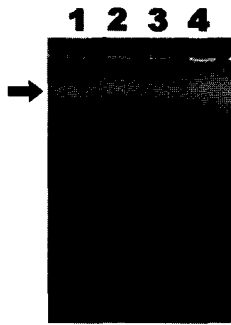


Fig. 2. Zymogram of α-galactosidase produced by *B. licheniformis* YB-42. The arrow indicates α-galactosidase showing the hydrolysis activity for 4-methylumbelliferyl-α-D-galactoside. The culture supernatant (lane 1), cell-free extract (lane 2) and their fractionates (lanes 3 and 4 corresponding to lanes 1 and 2, respectively) with ammonium sulfate of 20%~70% were used as α-galactosidase preparations.

pH 4.0~8.0에서 거의 동일한 반응성을 나타냈으며, 모두 45°C와 pH 6.5에서 최대 반응활성을 보이는 것으로 나타났다.

균체내·외의 효소의 차이를 조사하기 위해 조효소액을 SDS-PAGE를 수행한 후 MUαGal을 기질로 사용하여 α-galactosidase의 활성염색을 실시하였다. 그 결과 배양상등액과 균체 파쇄상등액 및 이들의 ammonium sulfate(20~70%) 분획 조효소액에 존재하는 효소는 polyacrylamide gel의 거의 동일한 위치에서 활성 band를 보였으며 큰 차이점이 발견되지 않았다(Fig. 2). 따라서 반응특성과 활성염색의 결과로 볼 때 균체내와 균체외로 분비된 α-galactosidase는 매우 유사하거나 동일한 효소로 추측된다.

배양상등액에 존재하는 α-galactosidase의 반응특성

B. licheniformis YB-42의 배양상등액에 존재하는 α-galactosidase의 반응특성을 조사하기 위해 배양상등액을 ammonium sulfate(20%~70%), DEAE-Sepharose column 크로마토그래피, 한외여과(PM10)와 Q-Sepharose column 크로마토그래피를 수행하여 얻은 활성분획을 α-galactosidase의 부분정제 효소액으로 사용하였다. 반응온도와 pH가 α-galactosidase 활성에 미치는 영향을 조사한 결과 Fig. 3에서 보인바와 같이 45°C와 pH 6.5에서 최대 활성을 보였다. 이는 상기의 ammonium sulfate로 분획한 조효소액의 결과와 일치하지만, 다른 범위의 반응온도와 반응 pH에서 활성에 약간의 차이가 있었으며, 특히 인산 완충용액을 사용한 pH 6.0에서 균체내와 균체외의 조효소액은 모두 최대활성의 97%~98%에 해당하는 활성을 보였으나, 부분정제 효소액은 약 70% 정도의 활성을 보였다. 이로보아 분리균 YB-42는 *M. vinacea*와 같이[26] 반응성질이 다른 2종류 이상의 α-galactosidase를 생산할 가능성이 있다고 여겨진다. 실제 부분정제 과정 중 배양상등액을 ammonium sulfate로 처리한 분획을 DEAE-Sepharose column 크로마토그래피를 수행하

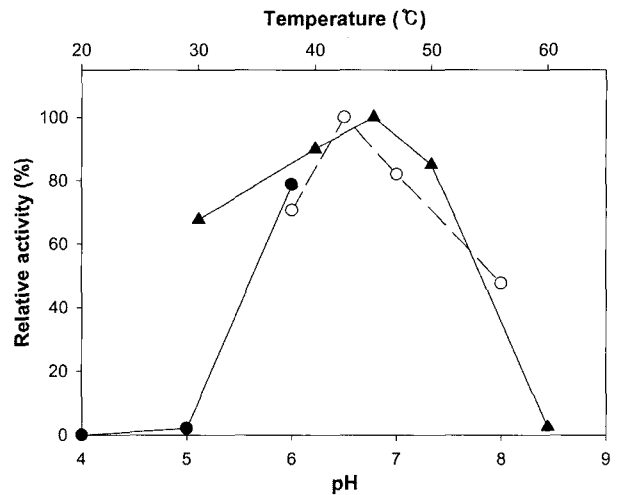


Fig. 3. Effects of reaction temperature and pH on the partially purified α-galactosidase activity. Temperature profile (-▲-) was obtained by measuring the α-galactosidase activities at pH 6.5 and different temperatures. The reactions was done at 45°C and various pHs for determining the pH profile. The following buffer systems were used: pH 4.0 to 6.0, 50 mM sodium citrate (-●-); pH 6.0 to 8.0, sodium phosphate (-○-).

는 과정에서 resin에 결합하지 않고 초기에 그대로 용출되는 효소활성이 관찰되었으나, 그 활성이 낮아 부분정제 효소액 제조과정에서는 이를 배제한 상태에서 부분 정제를 수행하였다. 한편, *B. stearothermophilus*는 75°C[28], *T. brockianus*는 90°C~95°C[8]에서 각각 최고의 활성을 보이는 내열성 α-galactosidase를 생산하는데, *B. licheniformis* YB-42가 생산하는 효소는 *C. piscicola*[4]와 유사한 중온성 α-galactosidase이다.

열안정성을 조사하기 위해 온도와 시간을 달리하여 부분

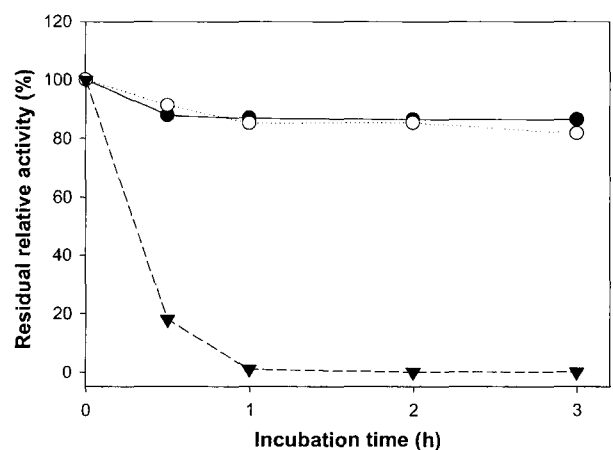


Fig. 4. Thermostability of the partially purified α-galactosidase. The residual relative activity was determined by measuring at various times after incubation at 40°C (-●-), 45°C (-○-) and 50°C (-▼-) with a fixed pH 6.5.

정제 효소액을 각 온도에서 방치한 후 잔존활성을 측정된 결과 50°C 이상에서 활성이 급격히 저하되어 1시간 이상에서는 거의 실패되었으며, 45°C 이하에서는 30분 이내에 잔존 활성이 약 90% 정도로 낮아지지만, 그 후에는 거의 실패가 일어나지 않고 안정하게 유지되었다(Fig. 4). pH에 대한 안정성을 조사하기 위해 pH 4.0~8.0에서 3시간 방치한 후 잔존활성을 측정된 결과 pH 6.0에서는 안정하였으나, pH 5.0 이하에서는 급격히 실패되었으며, pH 7.0~8.0에서도 약 50% 정도가 실패되었다(Fig. 5). *Streptomyces* sp. YB-4의 세포 외 α -galactosidase의 경우는 pH 4.0~10.0에서 2시간 방치한 후에도 90% 이상의 활성을 유지되는 것으로 보고되었다[17].

반응산물의 분석

B. licheniformis YB-42의 α -galactosidase가 α -1,6 결합으로 연결된 말단 galactosyl group을 함유한 당을 가수분해하는지 조사하기 위해 melibiose, raffinose, stachyose를 기질로 하여 반응시킨 후 각 가수분해 산물을 TLC로 분석하였다(Fig. 6). 그 결과 galactose와 glucose가 α -1,6 결합을 이루고 있는 melibiose는 galactose와 glucose로 완전히 분해되었고, galactose와 sucrose의 glucose 잔기에 α -1,6 결합을 이루고 있는 삼당류인 raffinose도 galactose와 sucrose로 완전히 가수분해 되었다. Stachyose는 galactose가 raffinose의 galactose 잔기에 α -1,6 결합을 하고 있는 사당류로 이를 가수분해 하였을 때 최종 반응산물로 galactose와 sucrose만 존재하는 것으로 보아, *B. licheniformis* YB-42의 α -galactosidase가 galactose와 glucose간의 α -1,6 결합 뿐만 아니라 galactose간의 α -1,6 결합도 완전히 가수분해한다는 것을 알 수 있다.

C. josui[16]와 *Streptomyces* sp.[17]에 의해 생산된 α -

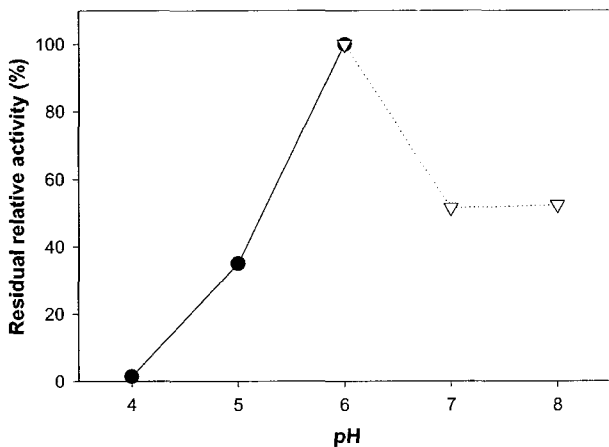
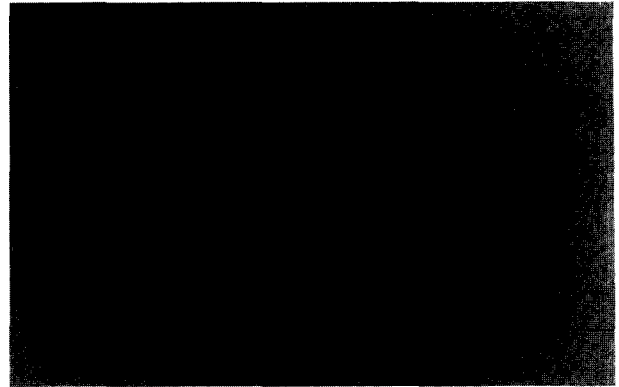


Fig. 5. pH stability of the partially purified α -galactosidase. The residual relative activity was determined by measuring after incubating for 3 h at various pHs with a fixed temperature (4°C). The following buffer systems were used: pH 4.0 to 6.0, 50 mM sodium citrate (●-); pH 6.0 to 8.0, sodium phosphate (-▽-).



1 2 Gc Ga 3 4 Sc 5 6 Ga

Fig. 6. Thin-layer chromatogram of hydrolysis products of melibiose (M), raffinose (R) and stachyose (S) with the partially purified enzymes. Reactions were done using melibiose (lanes 1 and 2), raffinose (lanes 3 and 4), and stachyose (lanes 5 and 6) as substrates at 40°C for 1 h, respectively. Reaction products were analyzed from reaction mixtures before (lanes 1, 3 and 5) and after reaction (lanes 2, 4, and 6). Authentic sugar abbreviations are as follows: Ga, galactose; Gc, glucose; Sc, sucrose.

galactosidases는 melibiose, raffinose, stachyose를 가수분해 하지만 완전히 가수분해하지는 못하는 것으로 보고되었다. 한편 *Thermus* sp. T2의 효소는 melibiose는 거의 분해하지만, raffinose는 완전히 분해하지 못하는 것으로 알려져 있는데[15], 이들과는 달리 melibiose, raffinose, stachyose를 완전히 가수분해 할 수 있는 *B. licheniformis* YB-42의 균체의 α -galactosidase는 산업적 유용성이 높은 효소로 여겨진다. 특히 YB-42의 효소가 가축의 장내조건으로 알려진 중온과 pH 6.5에서 최대 효소활성을 나타내는 점으로 미루어 보아 사료첨가용 효소로서의 가능성이 있으나, 이를 위해서는 내열성과 내산성이 필수적으로 개선되어야 할 것으로 판단된다.

α -Galactosidase 활성에 미치는 첨가당의 영향

α -Galactosidase와는 기질 특이성이 다르지만 lactose의 β -1,4 결합을 가수분해하는 효소인 β -galactosidase는 galactose가 존재할 경우 lactose와 *p*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (*p*NP- β Gal)의 가수분해 활성이 저해되는 현상이 *Streptomyces* 속 균주와 대장균에서 밝혀졌으며[12, 19, 20], *B. infantis* HL96의 β -galactosidase는 *o*-nitrophenyl- β -D-galactoside를 기질로 하였을 때 10 mM 농도의 glucose나 galactose에 의해 효소 활성이 저해되지 않는 것으로 보고되었다[13].

따라서 YB-42의 α -galactosidase가 당의 존재하에서 *p*NP- α Gal 가수분해 활성에 영향을 받는지를 조사하기 위해 반응액에 glucose, mannose와 galactose의 농도(10mM~400 mM)를 달리하여 첨가한 후 효소 반응을 실시하였다. 그 결과 Fig. 7에 나타낸 바와 같이 3 종류의 당이 모두 가수분해 활성을 저해하였으며, galactose에 의한 저해 정도가 높았고 glucose는 저해도가 낮았다. Galactose의 경우 50 mM

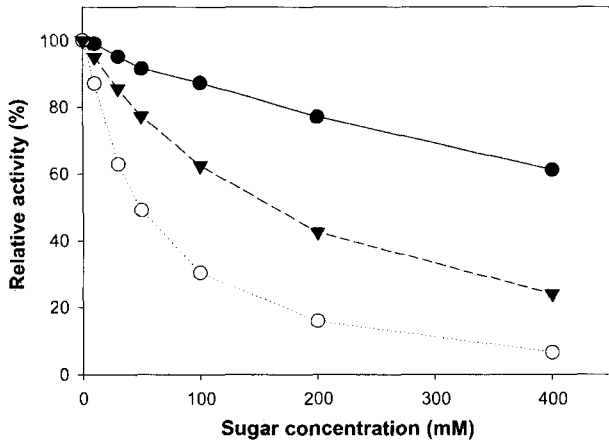


Fig. 7. Effects of sugar on the α-galactosidase activity of the partially purified enzymes. The relative activity was determined by measuring α-galactosidase activity for pNP-αGal (0.5 mM) in the presence of various concentrations of each sugar including glucose (●), mannose (▼), and galactose (○), respectively.

이 존재하면 약 50%의 활성이 저해되었으며, 400 mM이 존재하면 약 90% 이상의 활성이 저해되었다. Glucose의 경우 50 mM이 존재하여도 약 10% 미만의 활성저해가 일어났으며, 400 mM 범위의 농도로 첨가하였을 때는 약 40% 정도의 활성이 저해되었다. Mannose도 활성저해 정도가 높았으나, galactose보다는 낮은 것으로 나타나, 50 mM이 존재할 때 30% 이하, 400 mM이 존재할 때 약 75% 정도의 활성저해를 각각 나타냈다. 한편 YB-42 균주가 생산하는 α-galactosidase의 pNP-αGal 가수분해 활성이 glucose와 mannose에 의해서도 저해 받는 것과는 달리 *Streptomyces*속 균주가 생산하는 β-galactosidase의 pNP-βGal 가수분해 활

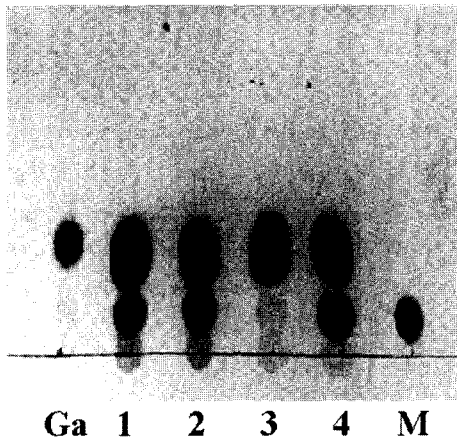


Fig. 8. Thin-layer chromatogram of the hydrolysis products of melibiose with the partially purified enzymes. In the presence of 100 mM concentration of galactose (lanes 1 and 2) and glucose (lanes 3 and 4), reactions were done using melibiose (15 mM) as substrate for 1h at 40°C. Reaction products were analyzed from reaction mixtures after reaction (lanes 1 and 3) and before reaction (lanes 2 and 4). Authentic sugar abbreviations are as follows: Ga, galactose; M, melibiose.

성은 glucose에 의해 증가되며, mannose에 의해서는 거의 영향을 받지 않는 것으로 알려져 있다[19, 20].

Melibiose를 기질로 하였을 경우 galactose와 glucose에 의한 가수분해 활성의 저해정도를 관찰하기 위해 melibiose(10 mM)와 함께 galactose 또는 glucose를 100 mM이 되도록 각각 첨가한 반응액의 최종 반응산물을 TLC로 분석한 결과 galactose를 첨가한 반응액에서 다량의 melibiose가 분해되지 못하고 잔존하였으나, glucose를 첨가한 반응액에서는 melibiose가 거의 분해되었다(Fig. 8). Fig. 7에 나타난 바와 같이 100 mM의 glucose가 존재할 때 pNP-αGal의 가수분해 활성이 87% 정도였으며, 100 mM의 galactose가 존재하였을 때는 30% 정도의 활성을 보이는 것으로 보아, melibiose의 가수분해도 glucose 보다는 galactose에 의해 훨씬 크게 저해를 받는 것으로 판단된다. 그러나 melibiose(10 mM)와 함께 10 mM의 galactose와 glucose를 각각 첨가한 반응액에서는 당의 첨가에 관계 없이 melibiose가 거의 분해되었는데 (data not shown), 이는 반응액에 기질인 melibiose와 동일한 농도의 galactose나 glucose가 존재할 때는 *B. licheniformis* YB-42의 α-galactosidase는 가수분해 활성의 저해도가 미미한 것으로 판단된다.

요 약

가정에서 제조된 된장으로부터 α-galactosidase의 생산균으로 분리된 YB-42는 형태적 특성, 생화학적 성질 및 16S rRNA의 염기서열에 근거하여 *Bacillus licheniformis*로 동정되었다. *B. licheniformis* YB-42의 α-galactosidase 활성은 균체내·외에서 모두 관찰되었다. 배양상등액으로부터 DEAE-Sephacel과 Q-Sephacel 컬럼 크로마토그래피를 통해 부분 정제된 α-galactosidase를 사용하여 para-nitrophenyl-α-D-galactopyranoside(pNP-αGal)의 가수분해 반응특성을 조사한 결과 45°C와 pH 6.5에서 최대활성을 보였다. Melibiose, raffinose와 stachyose는 부분 정제효소액에 의해 완전히 가수분해 되었으며, 분해산물로 galactose가 생성된 것으로 보아 α-1,6 결합이 분해된다는 것이 확인되었다. 한편 pNP-αGal과 melibiose의 가수분해 활성은 galactose에 의해 가장 크게 저해되었으며, galactose 보다는 낮지만 pNP-αGal의 가수분해 활성이 mannose와 glucose에 의해서도 저해되는 것으로 나타났다.

REFERENCES

- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.
- Boucher, I., C. Vadeboncoeur, and S. Moineau. 2003. Characterization of genes involved in the metabolism of α-galactosidases by *Lactococcus raffinolactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*

- 69: 4049-4056.
3. Clarke, J. H., K. Davidson, J. E. Rixon, J. R. Halstead, M. P. Fransen, H. J. Gilbert, and G. P. Hazlewood. 2000. A comparison of enzyme-aided bleaching of softwood paper pulp using combinations of xylanase, mannanase and α -galactosidase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**: 661-667.
 4. Coombs, J. and J. E. Brechley. 2001. Characterization of two new glycosyl hydrolases from the lactic acid bacterium *Carnobacterium piscicola* strain BA. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 5094-5099.
 5. de Vries, R. P., H. C. van den Broeck, E. Dekkers, P. Manzanares, L. H. de Graff, and J. Visser. 1999. Differential expression of three α -galactosidase genes and a single α -galactosidase gene from *Aspergillus niger*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2453-2460.
 6. Dey, P. M. and E. D. Campillo. 1984. α -Galactosidase. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **56**: 141-249.
 7. Dey, P. M., S. Patel, and M. D. Brownleader. 1993. Induction of α -galactosidase in *Penicillium ochrochloron* by guar (*Cyamopsis tetragonoloba*) gum. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **17**: 361-371.
 8. Fridjonsson, O., H. Watzlawick, A. Gehweiler, T. Rohrhirsch, and R. Mattes. 1999. Cloning of the gene encoding a novel thermostable α -galactosidase from *Thermus brockianus* ITI360. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **65**: 3955-3963.
 9. Ganter, C., A. Bock, P. Buckel, and R. Mattes. 1988. Production of thermostable recombinant α -galactosidase suitable for raffinose elimination from sugar beet syrup. *J. Biotechnol.* **8**: 301-310.
 10. Giuseppe, 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.
 11. Halstead, J. R., M. P. Fransen, R. Y. Eberhart, A. J. Park, H. J. Gilbert, and G. P. Hazlewood. 2000. α -Galactosidase a from *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa*: cloning, high level expression and its role in galactomannan hydrolysis. *FEMS Microbiol. Lett.* **192**: 197-203.
 12. Huber, R. E. and M. T. Gaunt. 1982. The inhibition of beta-galactosidase (*Escherichia coli*) by amino sugars and amino alcohols. *Can. J. Biochem.* **60**: 608-612.
 13. Hung, M. N. and B. H. Lee. 2002. Purification and characterization of a recombinant α -galactosidase with transgalactosylation activity from *Bifidobacterium infantis* HL96. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58**: 439-445.
 14. Irish, G. G., G. W. Barbour, H. L. Classen, R. T. Tyler, and M. R. Bedford. 1995. Removal of the α -galactosides of sucrose from soybean meal using either ethanol extraction or exogenous alpha-galactosidase and broiler performance. *Poult. Sci.* **74**: 1484-1494.
 15. Ishiguro, M., S. Kanedo, A. Kuno, Y. Koyama, S. Yoshida, G. -G. Park, Y. Sakakibara, I. Kusakabe, and H. Kobayashi. 2001. Purification and characterization of the recombinant *Thermus* sp. strain T2 α -galactosidase expressed in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 1601-1606.
 16. Jindou, S., K. Shuichi, F. Emi, F. Tsuchiyoshi, H. Hidenori, K. Tetsuya, S. Kazuo, and O. Kunio. 2002. α -Galactosidase Aga27A, an enzymatic component of the *Clostridium josui* cellulosome. *J. Bacteriol.* **184**: 600-604.
 17. Kim, S. -Y., K. H. Cho, C. -J. Kim, D. -J. Park, and K. -H. Yoon. 2003. Characterization of extracellular α -galactosidase produced by *Streptomyces* sp. YB-4. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 332-338.
 18. Leader, S., W. Hartmeier, and S. P. Mark. 1999. α -Galactosidase of *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083. *Curr. Microbiol.* **38**: 101-106.
 19. Lee, K. -S., C. -J. Kim, and K. -H. Yoon. 2003. Characterization of the α -galactosidase produced by *Streptomyces* sp. YB-10. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 151-156.
 20. Lee, K. -S., C. -J. Kim, and K. -H. Yoon. 2003. Characterization of the extracellular α -galactosidase produced from *Streptomyces* sp. YB-9. *J. Kor. Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **46**: 299-304.
 21. Li, X., L. Yang, P. Yan, F. Zuo, and F. Jin. 1997. Factors regulating production of alpha-galactosidase from *Bacillus* sp. JF2. *Lett. Appl. Microbiol.* **25**: 1-4.
 22. Linden, J. C. 1982. Immobilized α -galactosidase in the sugar beet industry. *Enzyme Microb. Technol.* **4**: 130-136.
 23. Luonteri, E., E. Alatalo, M. Siika-Aho, M. Penttila, and M. Tenkanen. 1998. α -Galactosidases of *Penicillium simplicissimum*: production, purification and characterization of the gene encoding AGLI. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **28**: 179-188.
 24. Rackis, J. J. 1981. Flatulence caused by soya and its control through processing. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **58**: 503-510.
 25. Scalabrini, P., M. Rossi, P. Spettoli, and D. Matteuzzi. 1998. Characterization of *Bifidobacterium* strains for use in soymilk fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* **39**: 213-219.
 26. Shibuya, H., H. Kobayashi, T. Sato, W. -S. Kim, W. Yoshida, S. Kaneko, K. Kasamo, and I. Kusakabe. 1997. Purification, characterization and cDNA cloning of novel α -galactosidase from *Mortierella vinacea*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**: 592-598.
 27. Silvestroni, A., C. Connes, F. Sesma, G. S. de Giori, and J. -C. Piard. 2002. Characterization of the *mela* locus for α -galactosidase in *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 5464-5471.
 28. Talbot, G. and J. Sygusch. 1990. Purification and characterization of thermostable β -mannanase and α -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**: 3505-3510.
 29. Zeilinger, S., D. Kristufek, I. Arisan-Atac, R. Hodits, and C. P. Kubicek. 1993. Conditions of formation, purification, and characterization of an α -galactosidase of *Trichoderma reesei* RUT C-30. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1347-1353.

(Received Apr. 4, 2004/Accepted May 25, 2004)