

청국장 유래 *Bacillus licheniformis*의 β -Galactosidase 특성

윤기홍*

우송대학교 식품생물학과

Received : February 7, 2012 / Revised : March 8, 2012 / Accepted : March 10, 2012

Properties of β -Galactosidase from *Bacillus licheniformis* Isolated from Cheongkookjang. Yoon, Ki-Hong*. Department of Food Science & Biotechnology, Woosong University, Daejeon 300-718, Korea – A bacterial strain was isolated from homemade Cheongkookjang as a producer of the β -galactosidase, capable of hydrolyzing lactose to liberate galactose and glucose residues. The isolate YB-1105 has been identified as *Bacillus licheniformis* on the basis of its 16S rDNA sequence, morphology and biochemical properties. β -Galactosidase activity was detected in both the culture supernatant and the cell extract of *B. licheniformis* YB-1105. The enzymes of both fractions demonstrated maximum activity for hydrolysis of *para*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (pNP- β Gal) under identical reaction conditions of pH 6.5 and 50°C. However, β -galactosidase activity from the culture filtrate was affected more than that from the cell free extract at acidic pHs and high temperatures. The hydrolyzing activity of both β -galactosidases for pNP- β Gal was dramatically decreased by the addition of low concentrations of galactose, but was only marginally decreased by high concentrations of glucose or mannose.

Keywords: *Bacillus licheniformis*, identification, β -galactosidase, property

서 론

β -Galactosidase (β -D-galactoside galactohydrolase)는 유당과 같은 β -D-galactopyranosides에서 비환원 말단 β -D-galactose를 가수분해하거나 galactose의 전이반응을 촉매하며, 미생물을 비롯하여 동식물에서 두루 존재하는 효소로 그 가수분해 활성은 우유와 유제품의 유당을 가수분해하여 유제품 섭취시 유당 불내증을 막아주며[18], 당 전이활성은 장내 유용미생물의 성장을 증진시키는 갈락토올리고당의 제조에 이용된다[15]. β -Galactosidase는 그 유래에 따라 유당 가수분해능과 당 전이효율을 비롯한 반응특성이 달라 산업적 활용에 적합한 효소적 특성과 생산성을 확보하기 위해 여러 균주에 대해 연구되었으며 *Kluyveromyces lactis*와 *Aspergillus niger* 유래의 효소가 가장 잘 알려져 있다.

*Bacillus*속 균주는 가수분해 효소의 생산성이 우수하여 산업용 효소 생산균으로 개발된 예가 많으며, β -galactosidase에 대해서도 *B. megaterium*, *B. licheniformis*, *B. circulans*, *B. stearothermophilus*와 *B. coagulans*를 중심으로 효소와 그 유전자의 특성이 보고되었다. *B. stearothermophilus*[8], *B. circulans*[20]와 *B. coagulans*[2]는 3종 이상의 β -galactosidase isozyme을 생산하는데, 온천에서 분리된 *B.*

coagulans RCS3의 isozyme III은 다른 isozyme과는 달리 균체외로 분비되며 lactose 분해능이 우수한 것으로 확인되었다. 또한 *B. circulans*의 효소는 당 전이반응능이 높고 isozymes간에는 당 전이능에 차이가 크며[20], 고정화한 효소를 이용하여 당 전이반응이 수행되었고[7] Daisakase사의 효소 상품 Biolacta N5에는 이들 효소가 포함된 것으로 알려졌다[10]. *B. stearothermophilus*의 효소를 고정화할 경우 열안정성이 증대되고 유당분해에 활용성이 있는 것으로 보고되었다[4]. *B. licheniformis*는 당 전이효율은 낮으나 유당분해에 적합한 효소를 생산하며[11], *B. megaterium* KM 균주는 이량체와 단량체로 존재하는데 이량체가 효소활성을 갖는 것으로 알려졌다[16].

전통발효 식품인 청국장 발효미생물로 protease 활성이 우수한 균주들이 분리되고[12] 이들이 청국장의 이취를 감소시키거나 맛을 향상시킨다고 보고되었다[9]. 대부분 청국장을 끓여서 섭취하고 있지만, 청국장의 기능성을 유지하기 위해 생청국장이나 건조청국장 형태로 복용하거나 이를 우유와 혼합하여 복용하기도 한다. 이와 같이 청국장 복용방법도 다양해짐에 따라 본 연구에서는 β -galactosidase 활성을 갖는 청국장 발효균을 이용하여 우유와 혼합한 청국장을 섭취할 때 발생 가능성이 있는 유당 불내증 현상을 방지하고자 가정에서 제조된 청국장으로부터 β -galactosidase 활성이 우수한 균주를 분리하고 이의 효소반응 특성을 검토하였다.

*Corresponding author

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

E-mail: ykh@wsu.ac.kr

재료 및 방법

β-Galactosidase 생산균의 탐색

청국장을 적정량의 생리식염수에 현탁하고 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 채취하여 1 mM *p*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (pNP-βGal)을 포함한 20 mM sodium phosphate 완충용액(pH 7.0)에 현탁한 후 37°C에서 1시간 동안 방치한 후 반응액의 색깔을 관찰함으로써 β-galactosidase 활성을 갖는 균을 탐색하였다.

분리균주의 동정

분리균의 형태적 관찰을 위해서는 그람염색과 포자염색을 실시하였으며, 배양균체 현탁액을 API 20E와 API 50 CHB(Biomereux사, France) kits에 제조사의 지침을 따라 접종하고 37°C에서 배양하면서 1일과 2일째 각각 관찰하여 탄수화물 이용능과 생화학적 특성을 판별하였다. 분리균의 16S rRNA 유전자 염기서열을 분석하기 위해서 분리균의 총 염색체 DNA를 주형으로 하고, 세균의 16S rRNA 유전자의 보존적 지역의 염기서열 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'(E. coli 16S rRNA 유전자 염기서열 8~27), 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'(E. coli 16S rRNA 유전자 염기서열 1492~1510)을 primer로 사용하여 중합효소 연쇄반응(PCR)을 실시하였다. 증폭된 PCR 산물을 정제하여 ABI PRISM BigDye terminator cycle sequencing kit와 373A automatic DNA sequencer(Perkin Elmer Co., USA)를 사용하여 염기서열을 결정하고 이를 NCBI database와 비교하였다.

β-Galactosidase 조효소액 제조

분리균 *B. licheniformis* YB-1105를 LB 배지에서 하룻밤 배양한 후 배양액을 1%(v/v)가 되도록 동일 성분의 본 배양액에 접종하고 37°C에서 24-26시간 동안 진탕배양 하였다. 배양액을 원심분리하여 얻은 배양상등액을 ammonium sulfate(20~75%)로 처리하고 침전된 단백질을 10 mM 인산 완충용액(pH 6.5)에 현탁하여 동일 완충용액으로 투석한 후 조효소액으로 사용하였다. 또한 배양균체를 10 mM 인산 완충용액(pH 6.5)으로 현탁하고 lysozyme을 첨가하여 37°C에서 30분간 방치한 후 초음파 파쇄하고, 원심분리하여 얻은 균체파쇄상등액도 조효소액으로 사용하였다.

β-Galactosidase 활성 측정

1 mM pNP-βGal와 50 mM sodium phosphate 완충용액(pH 6.5)을 포함한 반응액에 효소를 첨가하여 50°C에서 10분간 반응시킨 후 반응액의 2배 부피의 1 M Na₂CO₃ 용액을 첨가하여 반응을 종결시키고 405 nm에서 흡광도를 측정

하였다. 효소의 활성도 1 unit는 1분 동안 1 μmol의 *para*-nitrophenol을 유리시키는 효소량으로 정의하였다.

β-Galactosidase 반응특성 분석

β-Galactosidase 활성에 미치는 반응 온도와 pH의 영향을 조사하기 위하여 30~65°C와 pH 5.0~9.0의 범위에서 β-galactosidase 활성을 각각 측정하였다. 이때 pH 5.0~6.0의 범위에서는 citrate 완충용액, pH 6.0~8.0에서는 phosphate 완충용액, pH 8.0~9.0의 범위에서는 Tris 완충용액을 각각 사용하였다. β-Galactosidase에 의한 lactose의 분해산물을 분석하기 위해서는 1.0% lactose와 과량의 효소를 포함한 최적 pH의 반응액을 40°C에서 5시간 반응시킨 후 95°C에서 3분간 열처리하여 원심분리한 다음 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 크로마토그래피를 수행하였다. 전개된 물질을 발색시키기 위해서는 9 mL ethanol, 0.5 mL *p*-anisaldehyde, 0.5 mL sulfuric acid와 glacial acetate 및 방울을 혼합한 발색제 용액을 뿌린 후, 120°C에서 10분간 방치하였다.

결과 및 고찰

β-Galactosidase 생산균의 분리와 동정 및 특성

가정에서 제조된 청국장을 14점 수집하여 생리식염수로 희석하고 LB 한천 배지에 도말한 후 37°C에서 하룻밤 배양한 결과 각 시료당 콜로니의 모양이 다른 것으로 보이는 균주가 3~8씩 분리되었다. 분리균 중 β-galactosidase 활성을 갖는 균을 탐색하기 위해 콜로니를 채취하여 pNP-βGal의 분해능을 관찰한 결과 대부분 미약한 활성을 보였고 활성이 높은 한 균주를 얻어 YB-1105로 명명하였다. 분리균의 고분자 물질을 분해능을 조사하기 위해 1% skim milk, 0.2% potato starch, 1% tributyrin과 0.5% carboxymethyl cellulose를 각각 첨가한 평판배지에서 하룻밤 배양하여 분해현을 관찰하였으며 그 결과 분리균은 이들 물질을 모두 분해하여 protease, amylase, esterase와 cellulase 활성을 보였다.

분리균 YB-1105는 포자를 형성하는 그람양성 간균이며 API 50 CHB와 20E kit를 사용하여 생화학적 특성을 조사한 결과 *B. licheniformis*와 유사도가 99.9%로 가장 높게 나타났다. 당 이용성 중 sorbitol 이용능만이 차이가 있었으며 분리균은 이를 이용하지 못하였다. 또한 분리균은 arginine dehydrolase, gelatinase, oxidase와 nitrate 환원 활성을 보였으며, lysine decarboxylase, ornithine decarboxylase, urease, tryptophane deaminase 등의 활성과 citrate 이용능력이 없고 acetoin, indole과 황화수소를 생성하지 못하였다. 또한 분리균의 16S rRNA 유전자를 PCR로 증폭한 후 1,430 bp 크기의 염기서열(Genbank accession No. JQ292848)을 결정하였

으며, 이를 미국 NCBI의 BLAST 검색방법을 사용하여 기존에 등록된 세균들의 상응하는 염기서열과 비교한 결과, 우유로 끓인 죽이나 분유에서 분리된 *B. licheniformis* 균주들의 염기서열(FJ641025, HQ850703)과 동일하였다. 따라서 분리균 YB-1105는 형태적, 생화학적 특성 및 16S rDNA 서열로 볼 때 *B. licheniformis*로 판단되는데 청국장 발효 미생물 중에 *B. licheniformis*는 주요 발효균으로 보고된 바 있다[12].

***B. licheniformis*의 균체내·외로 생산된 β-galactosidase의 반응특성**

B. licheniformis YB-1105를 LB 액상배지에 접종하여 37°C에서 약 24시간 배양 후 pNP-βGal을 기질로 하여 배양상등액과 균체파쇄상등액에 존재하는 β-galactosidase활성을 조사한 결과 배양액 부피기준으로 30 mU/mL과 450 mU/mL로 각각 나타나, 분리균이 생산하는 β-galactosidase는 대부분이 균체내에 존재하며 소량의 활성이 균체외에서 관찰되었다. 균체외에서 관찰된 효소가 분비된 효소인지 배양 중 용균된 균체에서 유래된 것인지는 확실하지 않은 상태이나, *B. coagulans* RCS3의 경우 5개의 isozyme 중 한 개가 배양상등액에서 관찰된 바 있으며[2] 대부분의 β-galactosidase는 *B. stearothermophilus*[5, 8], *B. megaterium* ATCC 14581 [19], *B. subtilis* KL88[17]에서 균체내 효소로 보고되었다.

분리균이 생산하는 균체내 효소와 균체의 효소의 반응특성을 비교하기 위해 배양상등액과 균체파쇄상등액으로 각각 제조한 조효소액의 β-galactosidase 활성에 미치는 반응온도와 반응 pH의 영향을 조사하였다. 그 결과 Fig. 1에 보인바와 같이 두가지 조효소액에서 최적 반응pH는 6.5로 나타났지만, pH 6.0에서 효소활성에 차이를 보였다. 균체파쇄상등액의 β-galactosidase 활성은 pH 6.0에서 사용된 완충용액의 종류에 따라 큰 차이를 보이지 않았으나, 배양상등액의 효소활성은 인산완충 용액에서는 구연산 완충용액에 비해 그

활성이 크게 낮은 것으로 나타났다. 또한 두 조효소액의 효소활성이 정도의 차이는 있지만 산성 범위에서 급격하게 저하되는 현상을 보였는데 이는 *B. stearothermophilus* 유래의 효소에서도 보고된 바 있다[6].

반응온도에 따른 효소활성을 검토하였을 때 최적반응 온도는 50°C로 동일하며 반응온도 30-50°C 범위에서는 배양상등액이나 균체파쇄상등액이 유사한 반응활성을 보였으나, 55°C 이상에서는 균체파쇄상등액에 비해 배양상등액의 효소활성이 급격히 감소하였다(Fig. 1). 이러한 현상은 각 조효소액에 존재하는 효소의 특성 차이로 판단되지만, 균체파쇄상등액의 단백질 농도가 높아 고온에서 안정성이 유지되어 이로 인한 효소활성이 배양상등액보다 지속적으로 유지된 때문일 수도 있다. 실제 *B. stearothermophilus* 유래 β-galactosidase의 열안정성이 단백질량에 따라 크게 영향을 받는 것으로 보고되었다[6]. 이로써 분리균 YB-1105 유래의 효소는 *B. licheniformis* DSM 13[11]와 *B. subtilis* [1]의 β-galactosidase와 동일하게 50°C와 pH 6.5에서 최대 활성을 보이는 것으로 확인되었다. *B. coagulans*[2]와 *B. stearothermophilus*[5]의 효소는 최적반응 pH가 6-7 범위로 분리균과 유사하고, *B. megaterium* 2-37-4-1의 효소는 최적 pH는 7.5-8이며[14] 대장균에 클로닝된 *B. licheniformis*의 효소는 pH 5.7과 45°C에서 최대활성을 갖는 것으로 알려졌다[21]. 그리고 분리균 효소의 최적 반응온도는 *B. coagulans* RCS3, *B. megaterium* 2-37-4-1과 *B. stearothermophilus*의 효소에 비해 낮았다.

열안정성을 비교하기 위해 pH 6.5로 조절된 조효소액을 30-60°C 범위의 온도에서 1시간 방치한 후 잔존활성을 측정 한 결과 균체파쇄상등액에 존재하는 β-galactosidase는 45°C 이하에서는 안정하였고 50°C에서는 약 35%가 실활되었다. 그러나 배양상등액의 효소는 균체파쇄상등액의 효소에 비해 열안정성이 낮아 45°C 이상에서 급격하게 실활

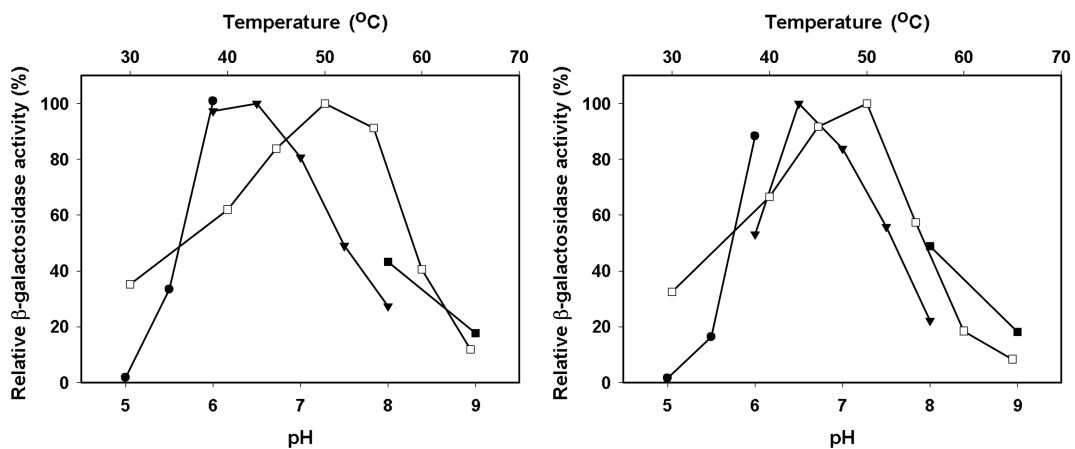


Fig. 1. Effects of reaction temperature and pH on the β-galactosidase activity of cell-free extract (left) and culture supernatant (right). Temperature profile (open symbols) was obtained by measuring the β-galactosidase activities at different temperatures and pH 6.5. The reactions were done at 45°C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

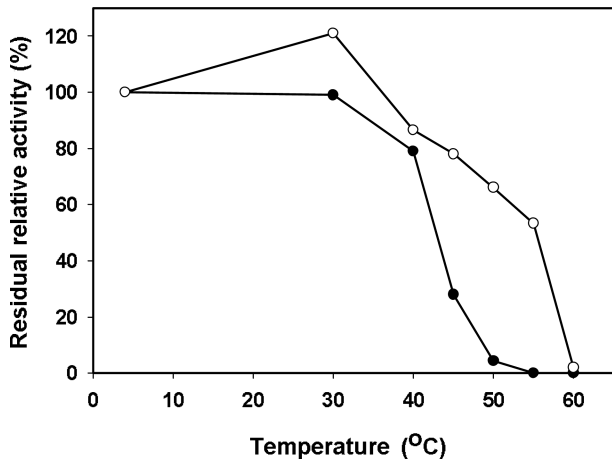


Fig. 2. Thermostability of the β-galactosidase in culture filtrate and cell-free extract. Thermostability was determined by measuring the residual activities of culture filtrate (-●-) and cell-free extract (-○-) after pre-incubation for 1 h at the different temperatures.

되었다(Fig. 2). 따라서 분리균 YB-1105가 생산하는 β-galactosidase는 65°C에서 반감기가 2시간인 *B. coagulans* RCS3[3]와 50시간인 *B. stearothermophilus* 유래 효소[5]에 비해 열안정성이 낮은 것으로 확인되었다.

β-Galactosidase의 가수분해 활성에 미치는 당의 영향

β-Galactosidase, β-glucosidase, β-xylosidase와 α-galactosidase 등을 포함하는 glycosidase는 가수분해 반응시 그 반응산물에 의해 활성이 저해되는 것으로 알려져 있다. 따라서 YB-1105의 β-galactosidase 활성에 미치는 당의 영향을 분석하기 위해 1 mM pNP-βGal을 기질로하여 glucose, galactose, xylose, mannose의 첨가농도를 달리하고 효소활성을 측정하였다(Fig. 3). Glucose와 mannose가 고농도로 존재할 때는 pNP-βGal의 가수분해능이 저해되는 현상이 두

종류 조효소액에서 모두 동일하게 관찰되었으나, xylose에 의해서는 균체파쇄상등액의 효소활성은 약하게 저해되는데 반해 배양상등액의 효소활성은 200 mM 이하의 xylose가 존재할 경우 효소활성이 약하게 증가되었다. 그러나 galactose에 의해서는 효소활성이 크게 저해되었는데, 4 mM 이상이 존재할 경우 두 조효소액에서 모두 50% 이상의 효소활성이 저해되었다.

분리균의 효소와는 달리 *B. licheniformis* DSM 13의 효소는 galactose와 glucose에 의해 모두 ortho-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside 분해반응이 강력하게 저해되며[11], *B. subtilis* KL88의 효소도 두 당에 의해 모두 부분적으로 활성이 저해되는 것으로 보고되었다[17]. 또한 *B. coagulans* RCS3[22]와 *B. stearothermophilus*[6]의 효소는 galactose에 의해서 강하게 효소활성이 저해되는 것으로 알려졌으며 분리균의 효소는 이와 유사한 것으로 판단된다. *Streptomyces* sp. YB-10 유래의 균체의 β-galactosidase도 분리균의 배양상등액 효소와 같이 xylose 존재하에서 pNP-βGal 가수분해능이 증가하며 그 정도가 YB-1105의 효소보다 더 높은 것으로 알려졌다[13].

pNP-βGal 대신 lactose를 기질로 하여 분해능을 조사하기 위해 반응산물을 박층크로마토그래피로 분석한 결과 두 조효소액 모두 lactose를 분해하여 glucose와 galactose가 생성되는 것이 확인되었으나, lactose의 분해능은 낮아 분해반응 후에도 반응액에 상당량의 lactose가 분해되지 않은 상태로 존재하였다. 이는 pNP-βGal의 가수분해를 강력하게 억제하는 galactose가 lactose의 분해산물로 생성되므로 lactose 분해능이 저해된 것으로 판단된다. 또한 반응산물 중에는 당 전이반응에 의해 생성될 수 있는 lactose 보다 중합도가 큰 물질이 관찰되지 않았다. 이는 *B. licheniformis* DSM 13 유래의 효소도 갈락토올리고당을 생성하는 당 전이반응이 매우 낮다고 보고된 바와 일치하는 결과로 판단된다[11]. 이와는 달리 *B. circulans*의 효소는 당 전이반응능이 높아

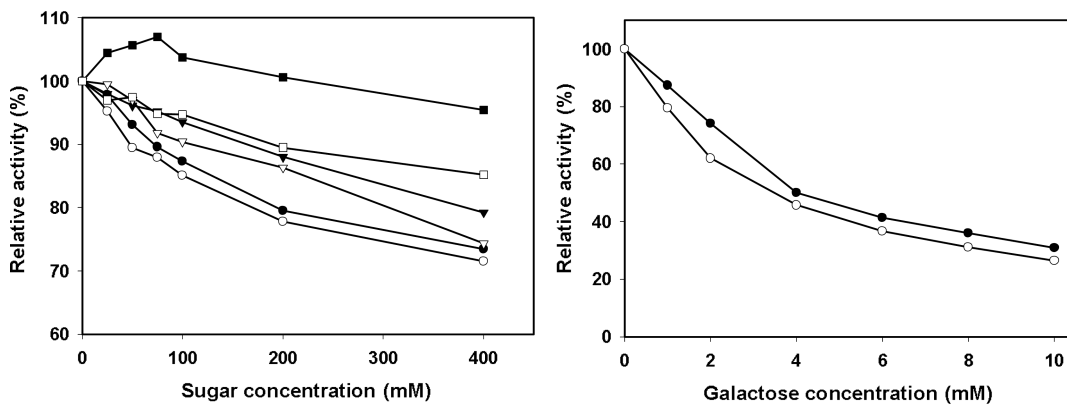
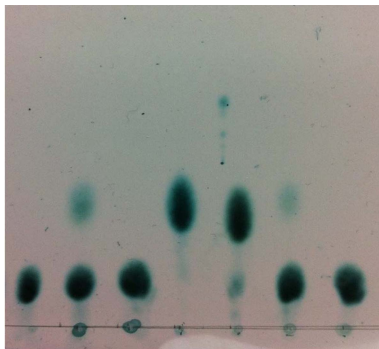


Fig. 3. Effects of sugar on the β-galactosidase activities of the cell-free extract and culture filtrate. The relative activity was determined by measuring β-galactosidase activity of cell-free extract (open symbols) and culture filtrate (closed symbols) for pNP-βGal (1.0 mM) in the presence of various concentrations of each sugar including glucose (○, ●), mannose (▽, ▼), xylose (□, ■), and galactose (right panel), respectively.



Lc 1 2 Gc Ga 3 4

Fig. 4. Thin-layer chromatogram of hydrolysis product of lactose. Reactions were done using lactose as a substrate by cell-free extract (lanes 1 and 2) or culture filtrate (lanes 3 and 4) at 40°C for 5 h, respectively. Reaction products were analyzed from reaction mixtures before (lanes 2 and 4) and after reaction (lanes 1 and 3). Authentic sugar abbreviations are as follows: Ga, galactose; Gc, glucose; Lc, lactose.

lactose로부터 삼당류, 사당류 등이 생성되며[20], *B. stearothermophilus* ATCC 8005는 유당분해와 당 전이반응능이 모두 높은 것으로 보고되었다[5].

요 약

가정에서 제조된 청국장으로부터 lactose를 glucose와 galactose로 가수분해하는 β-galactosidase의 생산균을 분리하였다. 분리균 YB-1105는 형태적 특성, 생화학적 성질 및 16S rRNA 유전자 염기서열에 근거하여 *Bacillus licheniformis*로 확인되었다. *B. licheniformis* YB-1105의 배양상등액과 균체파쇄액에서 모두 β-galactosidase 활성이 관찰되었으며 이들은 모두 pH 6.5와 50°C의 반응조건에서 *para*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside의 가수분해 활성이 최대로 나타났다. 그러나 균체파쇄상등액에 비해 배양상등액의 β-galactosidase 활성은 산성 pH와 고온에서 크게 영향을 받았다. 한편 두 분획의 가수분해 활성은 낮은 농도의 galactose에 의해도 급격하게 저해되었으나, glucose와 mannose는 고농도에 의해서는 약하게 저해를 받는 것으로 확인되었다.

REFERENCES

1. Anema, P. J. 1964. Purification and some properties of β-galactosidase of *Bacillus subtilis*. *Biochim. Biophys. Acta.* **89**: 495-502.
2. Batra, N., J. Singh, A. Joshi, and S. Bhatia. 2011. Applications of β-gal-III isozyme from *Bacillus coagulans* RCS3, in lactose hydrolysis. *Int. J. Biol. Macromol.* **49**: 879-884.
3. Batra, N., J. Singh, U. C. Banerjee, P. R. Patnaik, and R. C. Sobti. 2002. Production and characterization of a thermostable β-galactosidase from *Bacillus coagulans* RCS3.

- Biotechnol. Appl. Biochem.* **36**: 1-6.
4. Chen, W., H. Chen, Y. Xia, J. Yang, J. Zhao, F. Tian, H. P. Zhang, and H. Zhang. 2009. Immobilization of recombinant thermostable β-galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* for lactose hydrolysis in milk. *J. Dairy Sci.* **92**: 491-498.
5. Chen, W., H. Chen, Y. Xia, J. Zhao, F. Tian, and H. Zhang. 2008. Production, purification, and characterization of a potential thermostable galactosidase for milk lactose hydrolysis from *Bacillus stearothermophilus*. *J. Dairy Sci.* **91**: 1751-1758.
6. Goodman, R. E. and D. M. Pederson. 1976. β-Galactosidase from *Bacillus stearothermophilus*. *Can. J. Microbiol.* **22**: 817-825.
7. Hernaiz, M. J. and D. H. G Crout. 2000. A highly selective synthesis of *N*-acetylglucosamine catalyzed by immobilised β-galactosidase from *Bacillus circulans*. *J. Mol. Catalysis B.* **10**: 403-408.
8. Hirata, H., S. Negoro, and H. Okada. 1984. Molecular basis of isozyme formation of β-galactosidases in *Bacillus stearothermophilus*: isolation of two β-galactosidase genes, *bgA* and *bgB*. *J. Bacteriol.* **160**: 9-14.
9. Hong, S. W., J. Y. Kim, B. K. Lee, and K. S. Chung. 2006. The bacterial biological response modifier enriched Cheongkukjang fermentation. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **38**: 548-553.
10. Ito, Y. and T. Sasaki. 1997. Cloning and characterization of the gene encoding a novel β-galactosidase from *Bacillus circulans*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**: 1270-1276.
11. Juajun, O., T. H. Nguyen, T. Maischberger, S. Iqbal, D. Haltrich, and M. Yamabhai. 2011. Cloning, purification, and characterization of β-galactosidase from *Bacillus licheniformis* DSM 13. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **89**: 645-654.
12. Lee, G. H. and K. -H. Yoon. 2009. Sensory comparison of fermented soybeans (Cheongkookjang) inoculated with various *Bacillus* species by principal component analysis. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* **52**: 726-730.
13. Lee, K. S., C. -J. Kim, and K. -H. Yoon. 2003. Characterization of the β-galactosidase produced by *Streptomyces* sp. YB-10. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 151-156.
14. Li, Y., H. Wang, L. Lu, Z. Li, X. Xu, and M. Xiao. 2009. Purification and characterization of a novel β-galactosidase with transglycosylation activity from *Bacillus megaterium* 2-37-4-1. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **158**: 192-199.
15. Montero, E., J. Alonso, F. J. Canada, A. Fernandez-Mayoralas, and M. Martin-Lomas. 1997. Regioselectivity of the enzymatic transgalactosidation of D- and L-xylose catalysed by β-galactosidases. *Carbohydr. Res.* **305**: 383-391.
16. Pollard, H. B. and E. Jr. Steers. 1973. *Bacillus megaterium*, KM β-galactosidase: purification by affinity chromatography and characterization of the active species. *Arch. Biochem. Biophys.* **158**: 650-661.
17. Rahim, K. A. and B. H. Lee. 1991. Specificity, inhibitory studies, and oligosaccharide formation by β-galactosidase

- from psychrotrophic *Bacillus subtilis* KL88. *J. Dairy Sci.* **74**: 1773-1778.
18. Sanni, A. I., A. A. Onilude, and O. R. Ogundoye. 1997. Effect of bacterial galactosidase treatment on the nutritional status of soybean seeds and its milk derivative. *Food/Nahrung* **41**: 18-21.
19. Shaw, G. C., H. S. Kao, and C. Y. Chiou. 1998. Cloning, expression, and catabolite repression of a gene encoding β -galactosidase of *Bacillus megaterium* ATCC 14581. *J. Bacteriol.* **180**: 4734-4738.
20. Song, J., K. Abe, H. Imanaka, K. Imamura, M. Minoda, S. Yamaguchi, and K. Nakanishi. 2011. Causes of the production of multiple forms of β -galactosidase by *Bacillus circulans*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **75**: 268-278.
21. Tran, L. S., L. Szabo, L. Fulop, L. Orosz, T. Sik, and A. Holzinger. 1998. Isolation of a β -galactosidase-encoding gene from *Bacillus licheniformis*: purification and characterization of the recombinant enzyme expressed in *Escherichia coli*. *Curr. Microbiol.* **37**: 39-43.