

## *Bacillus licheniformis* 분리균 2종의 $\alpha$ -Galactosidase 생산성과 효소특성

진현경, 윤기홍\*  
우송대학교 바이오식품과학전공

Received: June 1, 2015 / Revised: June 29, 2015 / Accepted: June 29, 2015

### Production and Characterization of $\alpha$ -Galactosidases from Two *Bacillus licheniformis* Isolates

Hyun Kyung Jin and Ki-Hong Yoon\*

Food Science & Biotechnology Major, Woosong University, Daejeon 300-718, Republic of Korea

Two bacterial strains, *Bacillus licheniformis* YB-1413 and YB-1414, producing extracellular  $\alpha$ -galactosidase, were obtained from homemade *Doenjang*. On the basis of their biochemical properties, 16S rRNA sequences and random amplified polymorphic DNA patterns by polymerase chain reaction, they were found to be somewhat different from one another.  $\alpha$ -Galactosidase productivities of the two isolates were increased by wheat bran, but drastically decreased by melibiose, raffinose and sucrose which were used as carbon sources. The enzyme productivities were increased by yeast extract as a nitrogen source with maximum levels of 1.87 U/ml for YB-1413 and 1.69 U/ml for YB-1414, respectively. The enzymes of both isolates exhibited maximum activity for hydrolysis of *para*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-galactopyranoside (pNP- $\alpha$ Gal) under reaction conditions of pH 6.0 and 45°C. Their hydrolyzing activities for pNP- $\alpha$ Gal were drastically decreased by the addition of low concentrations of ribose and galactose. They were capable of hydrolyzing completely  $\alpha$ -1,6 linked galactosyl residue in melibiose, raffinose and stachyose, which are known to be anti-nutritional factors in products of soybean and legume. In relation to the latter, the isolates YB-1413 and YB-1414 have potential applicability in improving soybean-fermented foods and the nutritional value of soybean feed.

**Keywords:** *Bacillus licheniformis*,  $\alpha$ -galactosidase, productivity, property

## 서론

$\alpha$ -Galactosidase는 galactose 잔기를 함유한 melibiose, raffinose 및 stachyose와 같은  $\alpha$ -갈락토올리고당 ( $\alpha$ -GOS)의 비환원성 말단이나 galactomannan (guar gum, locust bean gum) 다당류에서 측쇄로 존재하는  $\alpha$ -1,6 결합의 D-galactosyl 잔기를 가수분해할 뿐 아니라 당단백질과 당지질의 가수분해에도 관여하는 exo-glycosidase이며[13], 기질의 농도가 높을 때는 당 전이반응도 촉매한다[20, 27, 30]. 아미노산 배열의 상동성에 따라  $\alpha$ -galactosidase는 glycosyl hydrolase (GH) family 4, 27, 32, 36, 57, 97, 110에 속하는 것으로 알려져 있으며 진핵세포 생물 유래의 효소는 대개 GH 27 그리고 원핵세포 생물의 효소는 대부분 GH 36에 속한다.

또한  $\alpha$ -galactosidase는 그 기질특이성이 달라 2종류로 구분되는데 하나는 저중합도의 올리고당이나 galactomann 유래의 단쇄 단편과 같은 저분자량의 기질에만 작용하고[2], 다른 하나는 저분자 기질뿐 아니라 galactomannan 다당류를 가수분해하는 활성이 있다[18].

$\alpha$ -Galactosidase는 산업적 활용성이 높으며 제당, 식품가공, 사료 효율개선, 펄프 가공 분야 뿐만 아니라 의약 및 prebiotic 생산 분야에서도 관심이 증대되고 있는 효소이다. 대두를 비롯한 콩은 단백질, 식이섬유, 미량영양소와 phytochemical을 함유하고 있어 영양이 우수하며 대두는 사료 단백질 성분의 50% 이상을 차지하고 있다. 인간과 단위 동물들은 소화기관내에  $\alpha$ -galactosidase가 결핍되어 있어 콩에 함유된  $\alpha$ -GOS가 소장에서 소화되지 못하고 대장에 존재하는 미생물에 의해 발효되어 이산화탄소, 수소와 메탄 가스가 발생되며 이는 고창증을 비롯한 소화기 장관의 장애를 일으키는 원인이 되므로 이를 방지하기 위해  $\alpha$ -galactosidase는 소화용 효소로 사용되고 있다[13]. 또한 대두사료에는 raffinose와 stachyose와 함께 galactomannan 다당류가 다

### \*Corresponding author

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

E-mail: ykh@wsu.ac.kr

© 2015, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

량 함유되어 있어 가축의 장관내 소화물의 점도를 높이고 사료 영양분에 대한 소장내 소화효소의 작용을 감소시켜 사료의 이용 효율도 저하되며 가축 배설물의 수분함유량도 높아 사육환경의 위생에 문제가 된다. 그러므로  $\alpha$ -galactosidase는  $\alpha$ -GOS를 가수분해하며, 동시에 mannanase와 함께 작용하여 galactomannan을 가수분해함으로써 가축의 사료 이용능을 높이는 사료 첨가용 효소로 유용성이 높다[16]. 제당산업에서도  $\alpha$ -galactosidase를 사용하여 사탕무 당밀에 축적된 raffinose를 분해할 경우 raffinose에 의한 sucrose 결정화 저해 현상을 개선함과 동시에 raffinose로부터 생성된 sucrose도 동시에 회수할 수 있는 장점이 있다[7]. 또한 대부분의 펄프는 galactomannan의 함유량이 15~20%인 연질목으로 제조되는데 리그닌은 반섬유소와 결합되어 있으므로 mannanase와  $\alpha$ -galactosidase로 반섬유소의 주성분인 galactomannan을 가수분해하여 리그닌을 제거함으로써 친환경적인 표백과정을 수행할 수 있다[5].

인간의 리소좀내  $\alpha$ -galactosidase A의 결핍으로 인하여 glycosphingolipid가 체내 기관에 축적되어 치사에 이르게 하는 선천성 대사질환인 패브리병의 효소 치료요법에  $\alpha$ -galactosidase가 사용되며[3], B 혈액형의 적혈구 세포에서  $\alpha$ -1,3 결합의 galactose 잔기를 제거하여 O형으로 전환시키는  $\alpha$ -galactosidase의 활성도 보고되었다[24]. 한편 *Geobacillus stearothermophilus* [19], *Bifidobacterium breve* [30]와 *Lactobacillus reuteri* [27] 유래  $\alpha$ -galactosidases의 당 전이 활성을 이용하여 신규 올리고당이 합성되었다.

$\alpha$ -Galactosidase의 상업적 생산균으로는 *Aspergillus niger*가 주로 사용되며, 동물, 식물과 미생물의 다양한 생물체 유래의  $\alpha$ -galactosidase에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 *Aspergillus* [6, 11], *Rhizomucor* [13], *Neosartorya* [26] 속의 중온성 또는 고온성 곰팡이, *Saccharomyces*와 *Hansenula* [8] 및 *Debaryomyces* [25] 속의 효모, *Bifidobacterium* [30], *Lactobacillus* [1, 22, 27, 29], *Bacillus* [2, 17, 21, 28], *Geobacillus* [9, 10, 19], *Paenibacillus* [20], *Streptomyces* [4]와 *Sphingomonas* [31] 속의 세균을 포함한 여러 종류 미생물의  $\alpha$ -galactosidase에 대해 효소와 유전자의 특성 및 효소의 활용과 생산조건 확립에 관한 연구 결과가 다수 보고되었다. 본 연구에서는 된장 발효균을 탄소원과 질소원으로 대두분을 함유한 배지에서 증균 배양한 후  $\alpha$ -galactosidase 생산성이 우수한 균주를 분리하고 효소 생산성과 효소 반응특성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### $\alpha$ -Galactosidase 생산균의 탐색 및 동정

$\beta$ -Galactosidase를 분비 생산하는 *Bacillus licheniformis*

YB-1414를 분리할 때와 동일하게 Spizizen 최소배지[23]의 탄소원인 포도당과 sodium citrate 및 질소원인 ammonium sulfate 대신에 대두분(1%)이 첨가된 변형 배지에서 된장과 발효균을 증균하여 여러 종류의 *Bacillus*속 균주를 분리하였다[12]. 분리균을 LB 액체 배지에서 24시간 동안 진탕 배양한 후 배양상등액을 회수하여 1 mM *para*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-galactopyranoside (pNP- $\alpha$ Gal; Sigma, USA)를 포함한 20 mM sodium phosphate 완충액(pH 6.0)에 첨가하고 45°C에서 3시간 동안 방치한 후 반응액의 색깔을 관찰함으로써  $\alpha$ -galactosidase 활성을 갖는 균을 탐색하였다. 분리균의 동정을 위해서는 API 20E와 API 50CHB (Biomereux사, France) kits를 사용하여 생화학적인 특성을 조사하고, 16S rRNA 유전자의 보존적 지역의 염기서열을 갖는 oligonucleotides를 primers로 사용하여 증폭된 중합효소 연쇄반응(PCR) 산물을 정제하여 16S rRNA 염기서열을 분석하였다.

### $\alpha$ -Galactosidase 조효소액 제조

분리균 *B. licheniformis* YB-1413과 YB-1414를 효소 생산에 적합한 배지에서 약 36시간 배양한 후 원심분리하여 얻은 배양상등액을 ammonium sulfate (25~75%)로 처리하고 침전된 단백질을 10 mM sodium phosphate 완충액(pH 6.0)에 현탁하여 동일 완충액으로 투석한 후 조효소액으로 사용하였다.

### $\alpha$ -Galactosidase 반응특성 분석

$\alpha$ -Galactosidase 활성을 결정하기 위해서는 1 mM pNP- $\alpha$ Gal과 50 mM sodium phosphate 완충액 (pH 6.0)을 포함한 반응액에 효소를 첨가하여 50°C에서 10분간 반응시킨 후 반응액의 2배 부피의 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액을 첨가하여 반응을 종결시키고 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. *para*-Nitrophenol (pNP)을 표준물질로 하여 얻은 검량곡선을 사용하여 효소 반응에 의해 생성된 pNP의 양을 결정하였으며 효소의 활성도 1 unit는 1분 동안 1  $\mu$ mol의 pNP를 유리시키는 효소량으로 정의하였다. 효소 활성에 미치는 반응 온도와 pH의 영향을 조사하기 위하여 30~55°C와 pH 5.0~8.0의 범위에서 각각  $\alpha$ -galactosidase 활성을 측정하였다. 열 안정성을 조사하기 위하여 조효소액을 서로 다른 온도에서 30분과 60분간 방치한 후 그 잔존활성을 측정하였다.  $\alpha$ -Galactosidase에 의한 최종 가수분해산물을 조사하기 위해 기질(1%)과 과량의 조효소액을 포함한 반응액을 40°C에서 5시간 동안 반응시킨 후 반응액을 열처리하여 그 상등액을 취해 chloroform, acetic acid와 증류수(4.3 : 5 : 0.7, (v/v)) 혼합용액을 전개용액으로 하여 silica gel-precoated thin layer plate (Merck, Germany)에서 박층 크로마토그래피를 수행하였다. 전개된 물질을 발색시키기 위해서는 9 ml ethanol, 0.5 ml *p*-anisaldehyde,

0.5 ml sulfuric acid와 glacial acetic acid 몇 방울을 혼합한 발색제 용액을 뿌린 후, 120°C에서 10분간 방치하였다. 첨가당이 효소 활성에 미치는 영향을 분석하기 위하여 기질로 pNP-αGal (1 mM)을 포함한 반응액에 당의 종류와 첨가농도를 달리한 상태에서 α-galactosidase 활성을 측정하였다.

임의증폭 DNA 다형성(RAPD-PCR)

Bacterial genomic prep kit (Solgent, Korea)를 사용하여 분리균 YB-1413과 YB-1414로부터 총 유전체 DNA를 분리하여 주형 DNA로 사용하였다. Primers는 10 nucleotides로 구성된 oligonucleotides를 사용하였으며, 분리균 유전체 DNA (50 ng)와 한 종류의 primer (50 pmol)를 포함한 반응액의 부피를 50 μl로 조절하여 Taq DNA polymerase로 PCR 반응을 실시하였다. PCR 반응조건은 95°C에서 5분간 변성한 후, 95°C에서 15초, 30°C에서 1분, 72°C에서 30초 반응의 과정을 35회 반복하였고, 최종적으로 72°C에서 8분간 반응을 수행하였다. 반응산물은 1.2% agarose gel에서 전기영동을 수행하고 이를 ethidium bromide로 염색하여 관찰하였다.

결과 및 고찰

α-Galactosidase 생산균의 분리와 특성

가정에서 수집된 된장을 탄소원과 질소원으로 대두분을 첨가한 최소배지에 접종하여 증균 배양한 후 분리된 된장 발효균 중에서 β-galactosidase를 균체외로 분비 생산하는 *B. licheniformis* YB-1414가 분리된 바 있다[12]. 동일한 조건에서 분리 배양된 된장 분리균의 배양상등액을 사용하여 pNP-αGal을 분해하는 α-galactosidase 활성을 조사한 결과

β-galactosidase 생산균 보다는 적게 발견되었지만 일부 균주가 α-galactosidase를 생산하는 것으로 확인되었다. 이들 중 YB-1413과 YB-1414는 α-galactosidase의 생산성이 우수하였는데, YB-1413은 YB-1414와 같이 β-galactosidase도 동시에 균체외로 분비 생산하였다.

분리균 YB-1414는 이미 *B. licheniformis*로 확인되었으므로 API 50CHB와 20E kit를 사용하여 새롭게 분리된 YB-1413의 당 이용성과 생화학적 특성을 조사하고 이를 YB-1414와 비교한 결과 lactose 이용성을 제외한 모든 특성이 서로 일치하였다. 또한 YB-1413의 16S rRNA의 염기서열도 (Genbank accession No. KM660626) YB-1414와 동일하였으며 YB-1413은 YB-1414와 같이 *B. licheniformis*와 가장 유사성이 높은 것으로 확인되었다. 그리고 두 균주는 고분자 물질의 분해능도 동일하여 단백질, 전분과 섬유소 분해활성을 보였고 xylan의 분해능은 없었다. 이와 같이 두 균주는 lactose의 이용성을 제외하고는 그 특성이 완전히 동일하였으므로 이들 균주가 서로 다른 균주인지를 확인하기 위해 RAPD-PCR을 수행하여 그 유전체의 유사성을 비교하였다.

Table 1. Nucleotide sequence of the oligonucleotides used as primers.

Primers	Nucleotide sequence	Length (nucleotides)
RAPD-7	5'-GAAACGGGTG-3'	10
RAPD-9	5'-CTGAGACGGA-3'	10
RAPD-10	5'-GTTTCGCTCC-3'	10
RAPD-12	5'-TGACGCGCTC-3'	10
RAPD-13	5'-CCCGCCGTTG-3'	10
RAPD-14	5'-TACGATGACG-3'	10

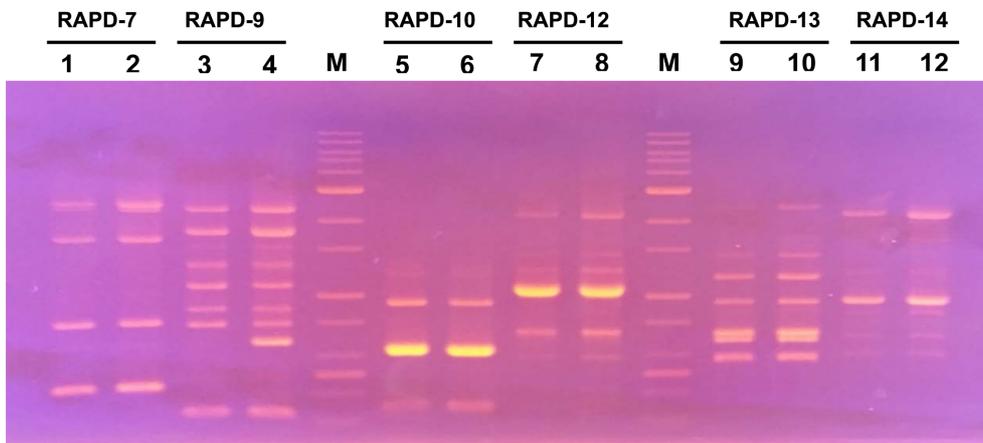
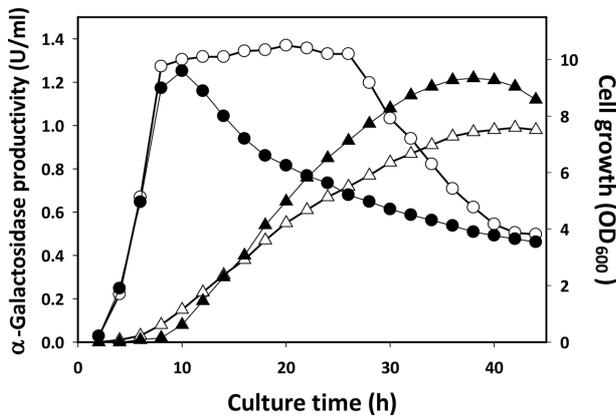


Fig. 1. Genomic comparison between YB-1413 and YB-1414 according to RAPD-PCR products. Six kinds of oligonucleotides including RAPD-7, RAPD-9, RAPD-10, RAPD-12, RAPD-13, and RAPD-14 were used as primers for PAPD-PCR, respectively. Lanes 1, 3, 5, 7, 9 and 11 are corresponding to *B. licheniformis* YB-1413, and lanes 2, 4, 6, 8, 10 and 12 are to YB-1414.

크기가 10 nucleotides로 구성되고 염기서열이 다른 6종류의 oligonucleotides (Table 1)를 primers로 각각 사용하여 RAPD-PCR을 수행한 후 PCR 산물을 agarose gel 전기영동으로 분석한 결과 0.3–2.5 kb 범위에 속하는 여러 종류의 DNA 단편이 관찰되었다(Fig. 1). Primers RAPD-7, 10, 12, 13과 14에 의한 증폭산물은 두 균주간에 서로 일치하였으며 primer RAPD-9에 의해서도 동일한 크기의 DNA 단편들이 증폭되었으나, YB-1413에서는 증폭되지 않은 0.7 kb DNA 단편이 YB-1414에서 특이적으로 관찰되었다. 따라서 이들



**Fig. 2. Growth and  $\alpha$ -galactosidase production of two *B. licheniformis* isolates.** *B. licheniformis* YB-1413 (closed symbols) and YB-1414 (open symbols) were grown at 37°C in LB medium. The cell growths (circles) were determined by measuring absorbance of the cell culture at wavelength of 600 nm.  $\alpha$ -Galactosidase activities (triangles) were determined with the culture filtrate. The curve for  $\alpha$ -galactosidase production represents the average of three independent experiments within standard errors of 1.5% between them.

균주는 그 유사성이 매우 높지만 동일한 균은 아니라는 사실이 확인되었다. 한편 된장을 증균하지 않고 직접 분리한 균주 중에서  $\alpha$ -galactosidase 를 생산하는 것으로 보고된 *B. licheniformis* YB-42의 16S rRNA (AJ582722)와 YB-1413과는 8개 염기서열에 차이가 있었다[14].

***B. licheniformis* YB-1413과 YB-1414의  $\alpha$ -galactosidase 생산성**

분리균 *B. licheniformis* YB-1413과 YB-1414의 성장과 효소 생산성과의 관계를 조사하기 위해 LB 액체배지에서 진탕 배양하면서 일정시간마다 배양액을 채취하여 600 nm에서 흡광도와 배양상등액에 존재하는  $\alpha$ -galactosidase의 활성을 측정하였다. YB-1413과 YB-1414는 최대 성장도에 이르는 배양시간이 유사하였으나, YB-1414와는 달리 YB-1413은 최대 성장도에 이른 후 빠르게 사멸기로 접어들었다(Fig. 2).  $\alpha$ -Galactosidase의 생산은 두 균주가 모두 최대 성장에 이르렀을 때부터 시작하여 사멸기에 도달한 후에도 지속적으로 증가하였으며, YB-1413은 38시간이 되었을 때 1.2 U/ml로 최대에 이른 후 배양상등액에 존재하는 효소활성이 미약하게 감소한 반면에 YB-1414는 배양시간이 42시간이 되었을 때 효소 생산성이 0.99 U/ml로 최대에 이르렀다.

일반적으로 효소의 생산성은 배지의 탄소원과 질소원에 의해 영향을 받으므로 분리균의  $\alpha$ -galactosidase 생산에 적합한 배지성분을 조사하기 위해 potassium phosphate (0.01%)와 magnesium sulfate (0.1%)를 기본 성분으로 하고 탄소원과 질소원을 달리하여 분리균의 효소 생산성을 비교하였다. 질소원으로 peptone (0.5%)을 함유하는 배지에 서로 다른 탄소원을 0.5%가 되도록 각각 첨가한 상태에서 분리균을 접종

**Table 2. Effects of additional carbon sources on the  $\alpha$ -galactosidase production from *B. licheniformis* YB-1413 and YB-1414.**

Additional carbon sources (0.5%)	$\alpha$ -Galactosidase productivity (U/ml)		Amount (%) of wheat bran	$\alpha$ -Galactosidase productivity (U/ml)	
	YB-1413	YB-1414		YB-1413	YB-1414
None	0.21 ± 0.01	0.17 ± 0.01	None	0.22 ± 0.01	0.19 ± 0.01
Glucose	0.03 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.3	0.31 ± 0.01	0.23 ± 0.01
Sucrose	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.5	0.26 ± 0.01	0.22 ± 0.01
Lactose	0.24 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.7	0.29 ± 0.01	0.23 ± 0.01
Galactose	0.26 ± 0.01	0.24 ± 0.01	1.0	0.24 ± 0.01	0.19 ± 0.01
Arabinose	0.01 ± 0.00	0.06 ± 0.00	1.5	0.31 ± 0.01	0.15 ± 0.01
Melibiose	0.02 ± 0.00	0.12 ± 0.01	2.0	<0.01 ± 0.00	0.17 ± 0.01
Raffinose	0.01 ± 0.00	<0.01 ± 0.00	2.5	<0.01 ± 0.00	0.17 ± 0.01
Locust bean gum	0.31 ± 0.01	0.28 ± 0.01	3.0	<0.01 ± 0.00	0.15 ± 0.01
Guar gum	0.22 ± 0.01	0.24 ± 0.01			
Wheat bran	0.30 ± 0.01	0.30 ± 0.01			
Rice bran	0.26 ± 0.01	0.23 ± 0.01			

하여 37°C에서 36시간 동안 진탕 배양한 후 배양상등액의 효소 활성을 측정할 결과 Table 2에 보인 바와 같이 wheat bran을 비롯하여 rice bran, locust bean gum (LBG) 또는 galactose를 첨가한 배지에서 효소 생산성이 증가되었으며 sucrose, raffinose, melibiose, arabinose를 첨가한 배지에서는 탄소원을 첨가하지 않은 배지보다 두 균주가 모두 효소 생산성이 크게 감소하였다. 또한 glucose가 첨가된 배지에서는 YB-1414의 경우 효소 생산성에 변화가 없었으나, YB-1413은 효소 생산성이 크게 감소하였다. 한편 배지에 raffinose를 첨가하였을 때 *L. reuteri* [1], *L. plantarum* [22], *B. halodurans* [2]의  $\alpha$ -galactosidase 생산성은 증가하며, *L. curvatus* [29]의  $\alpha$ -galactosidase는 raffinose뿐 아니라 melibiose와 galactose에 의해서도 생산이 유도되는 것으로 보고되었다. 또한 *Bacillus* sp. JF2의 균체내  $\alpha$ -galactosidase도 melibiose에 의해서는 생산성이 증가되었으나, sucrose에 의해서는 감소하였으며[17] 이러한 현상은 *L. curvatus*에서도 확인되었는데 두 분리균도 sucrose 첨가배지에서는 효소가 생산되지 않았다. *Debaryomyces hansenii* [25]도 galactose에 의해 효소 생산성이 증가된다고 보고되었다. 따라서 다수의 미생물에서  $\alpha$ -galactosidase의 생산성이 raffinose, melibiose 또는 galactose에 의해 증가되었다는 결과와 비교해 보면 분리균의 경우 galactose에 의해서 효소 생산성이 증가하는 현상은 일치하지만 raffinose와 melibiose에 의해서는 급격하게 감소되는 특이한 현상을 보였다.

탄소원으로 LBG나 wheat bran을 첨가한 배지에서 두 균주는 모두 효소 생산성이 가장 크게 증가하였는데 LBG보다 값싼 wheat bran을 배지 성분으로 이용하는 것이 경제성 측면에서 유리하다고 판단되어 wheat bran의 농도를 달리한 배지에서 효소 생산성을 조사하였다. 그 결과 YB-1413은 wheat bran의 첨가량이 1.5% 이하일 때는 효소 생산성이 증가하였으나, 2.0% 이상 첨가한 상태에서는 효소 생산성이 급격하게 저하되어 배양상등액에서 효소활성이 매우 미약한 수준으로 관찰되었다. YB-1414는 wheat bran 첨가량이 0.7%가 될 때 효소 생산성이 최대로 증가하였으며 1% 이상

의 wheat bran이 첨가되었을 때는 효소 생산성이 약간 감소하는 경향을 보였으나 YB-1413과는 달리 2.0% 이상에서도 일정한 수준을 유지하였다. 한편 YB-1413은 wheat bran의 첨가량이 0.3%와 1.5%일 때  $\alpha$ -galactosidase 생산성이 최대이고, YB-1414는 0.3%와 0.7%일 때 최대로 나타났는데, YB-1413의  $\beta$ -galactosidase 생산성은 wheat bran 첨가량이 0.3%일 때 보다 1.5%일 때 약 1.8배 높으며(결과 미제시) YB-1414의  $\beta$ -galactosidase 생산성도 0.3%일 때 0.7%일 때 약 1.66배 더 높았다[12].

$\alpha$ -Galactosidase 뿐 아니라  $\beta$ -galactosidase의 생산에도 적합하도록 wheat bran 첨가량을 1.5% (YB-1413)와 0.7% (YB-1414)로 각각 고정하고 유기질소원(0.5%)의 종류를 달리한 배지에서 각 균주의 효소 생산성을 조사하였을 때 yeast extract가 첨가된 배지에서 효소 생산성이 가장 우수하였으며, tryptone, pepton이나 casein hydrolyzate가 첨가된 배지에서도 두 균주의 효소 생산성이 높았다. 그러나 corn steep powder가 함유된 배지에서는 효소가 거의 생산되지 않았으며, soytone 첨가배지에서는 YB-1414와는 달리 YB-1413의 효소 생산성이 저조하였다(Table 3). Yeast extract를 첨가하였을 때 가장 효소 생산성이 높았으므로 이를 3% 이하로 달리 배지에 첨가하여 배양한 결과 yeast extract의 첨가량이 많아질수록  $\alpha$ -galactosidase 생산성이 증가하였으며 YB-1413은 2.5%에서 1.87 U/ml, YB-1414는 3.0%에서 1.69 U/ml의 최대 생산성을 보였는데 YB-1414의 경우 yeast extract의 첨가량이 3%를 초과하도록 하였을 때는 효소 생산성이 좀 더 증가할 것으로 예측된다.

*L. reuteri*도 질소원으로 yeast extract를 사용하였을 때 효소 생산성이 10.55 U/ml로 증가하였으며[1], *L. curvatus*는 raffinose를 유일 탄소원으로 사용하였을 때 40 U/ml [29], *B. stearothermophilus*는 대두분을 탄소원으로 사용하였을 때 2.0 U/ml [10], *B. megaterium*은 최적 배양조건에서 1.9 U/ml [21]의 생산성을 보이는 것으로 각각 보고되었으며 된장에서 분리된 *B. licheniformis* YB-42는 LB 배지에서 0.7 U/ml로 확인된 바 있다[15]. 또한 *A. fumigatus*의 효소 유전자

**Table 3. Effects of additional nitrogen sources on the  $\alpha$ -galactosidase production from *B. licheniformis* YB-1413 and YB-1414.**

Additional nitrogen sources (0.5%)	$\alpha$ -Galactosidase productivity (U/ml)		Amount (%) of yeast extract	$\alpha$ -Galactosidase productivity (U/ml)	
	YB-1413	YB-1414		YB-1413	YB-1414
None	<0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.5	0.26 ± 0.01	0.33 ± 0.01
Corn steep powder	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.8	0.28 ± 0.01	0.35 ± 0.01
Soytone	0.14 ± 0.01	0.27 ± 0.01	1.0	0.54 ± 0.02	0.43 ± 0.01
Yeast extract	0.33 ± 0.01	0.35 ± 0.01	1.5	0.70 ± 0.02	0.72 ± 0.02
Tryptone	0.28 ± 0.01	0.30 ± 0.01	2.0	1.50 ± 0.02	1.23 ± 0.03
Peptone	0.24 ± 0.01	0.31 ± 0.01	2.5	1.87 ± 0.03	1.54 ± 0.03
Casein hydrolyzate	0.23 ± 0.01	0.29 ± 0.01	3.0	1.66 ± 0.02	1.69 ± 0.03

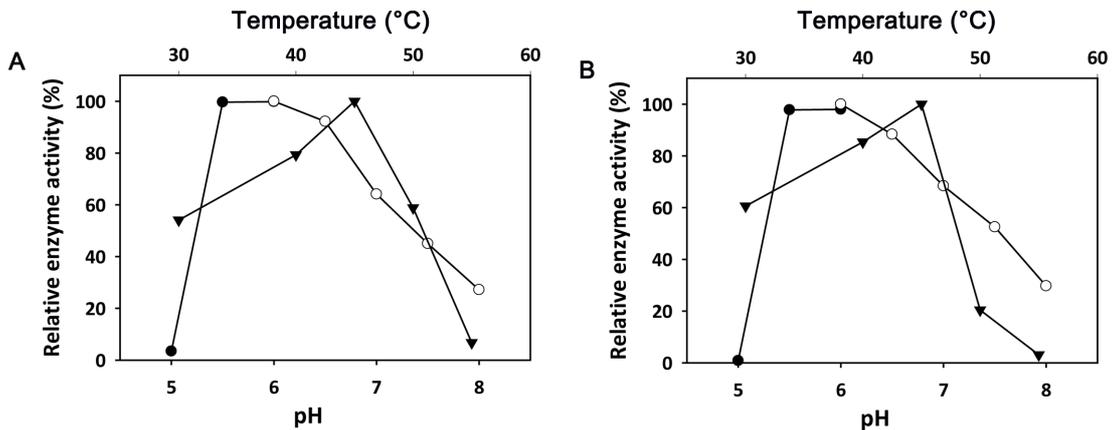
를 *A. sojae*에 도입하거나[11], *Neosartorya fischeri* [26]의 효소 유전자를 *Pichia pastoris*에 도입한 재조합 숙주균을 이용하여  $\alpha$ -galactosidase를 생산하였다.

**$\alpha$ -Galactosidase의 반응특성**

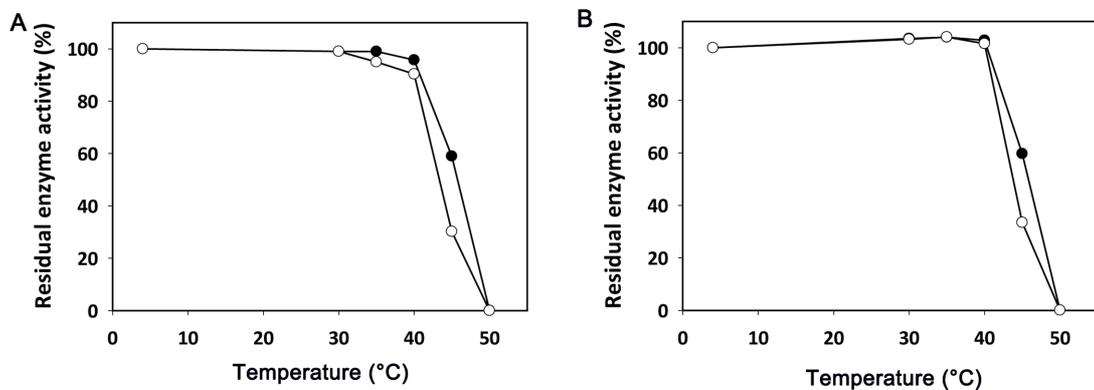
배양상등액을 ammonium sulfate (25–75%)로 처리하여 제조된 조효소액을 사용하여 반응 조건에 따른  $\alpha$ -galactosidase 활성을 측정한 결과 YB-1413과 YB-1414의 효소는 모두 pH 6.0과 45°C에서 최대활성을 나타냈으며, pH 5.5–6.5 범위에서는 최대활성의 90% 이상 수준으로 활성을 유지하였다(Fig. 3). 최적반응 온도는 동일하지만 50°C에서는 YB-1414에 비해 YB-1413의 효소활성이 높았다. *B. stearothersophilus* NCIM 5146의 효소는 pH 6.5–7.0과 65°C [9], *B. megaterium*의 효소는 pH 7.5와 55°C [21], *Rhizomucor miehei*의 효소

는 pH 4.5와 60°C [13], *B. licheniformis* YB-42의 효소는 pH 6.5와 45°C [14], *Paenibacillus* sp. LX-20의 효소는 pH 6.0-6.5와 45°C [20], *Sphingomonas* sp. JB13의 효소는 pH 5.0과 60°C [31], *N. fischeri*의 효소는 pH 4.5와 60–70°C [26], *Streptomyces* sp. S27 ACCC 41168의 효소는 pH 7.4와 35°C [4], 심해에서 분리된 *B. megaterium*의 효소는 pH 8.9-9.0와 35°C [28]에서 각각 최대 활성을 보이는 것으로 보고된 바 있으며 이들 중 *Paenibacillus* sp. LX-20와 *B. licheniformis* YB-42의 효소가 분리균 YB-1413과 YB-1414의 효소와 최적반응 조건이 가장 유사하였다.

30–50°C 범위의 온도에서 조효소액을 30분과 60분 동안 각각 열처리한 후 잔존활성을 조사한 결과 YB-1414의 효소는 40°C 이하에서는 60분간 방치하여도 안정하였으나 YB-1413의 효소는 미약하게 실활이 일어나는 것으로 나타났다



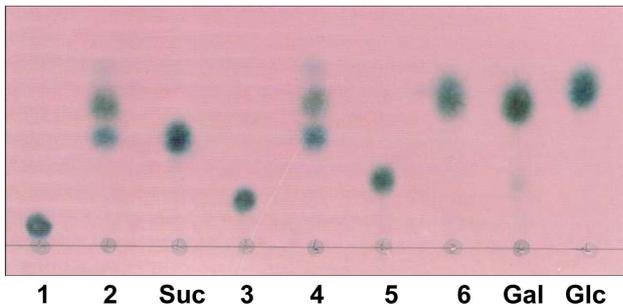
**Fig. 3.** Effects of reaction temperature and pH on the  $\alpha$ -galactosidase activity of YB-1413 (A) and YB-1414 (B). Temperature profile (triangles) was obtained by measuring the  $\alpha$ -galactosidase activities at different temperatures and pH 6.0. The reactions were done at 45°C and various pHs for determining the pH profile (circles). Buffers used were as follows: sodium citrate (●-), sodium phosphate (○-). Each curve represents the average of three independent experiments within standard errors of 1.8% between them.



**Fig. 4.** Thermostabilities of the  $\alpha$ -galactosidases in culture filtrates of YB-1413 (A) and YB-1414 (B). Thermostability was determined by measuring the residual activities of  $\alpha$ -galactosidase after pre-incubations for 30 min (●-) and 1 h (○-) at the different temperatures. Each curve represents the average of three independent experiments within standard errors of 2% between them.

(Fig. 4). 또한 두 균주의 효소는 모두 45°C에서 30분간 방치 하였을 때 잔존활성이 약 60% 수준으로 확인되었으며, 50°C에서 30분간 방치한 후에는 대부분 실패하였다. 한편 *Sphingomonas* sp. JB13의 효소는 60°C에서 60분 이상[31], *B. megaterium* VHM1의 효소는 55°C에서 120분[21], *B. stearothermophilus* NCIM 5146의 효소는 70°C에서 30분 [9]의 반감기를 각각 보였고, *R. miehei*의 효소는 55°C에서 30분간 열처리후에도 80%의 잔존활성을[13] 갖는 것으로 보아 분리균 YB-1413과 YB-1414의  $\alpha$ -galactosidase는 열안정성이 매우 낮았다.

$\alpha$ -Galactosidase에 의한 가수분해 산물을 조사하기 위해 melibiose, raffinose, stachyose를 반응 기질로 하여 효소 반응을 실시하고 TLC로 분석한 결과 두 균주의 효소는 모두 galactose와 glucose간의  $\alpha$ -1.6 결합 뿐만 아니라 galactose



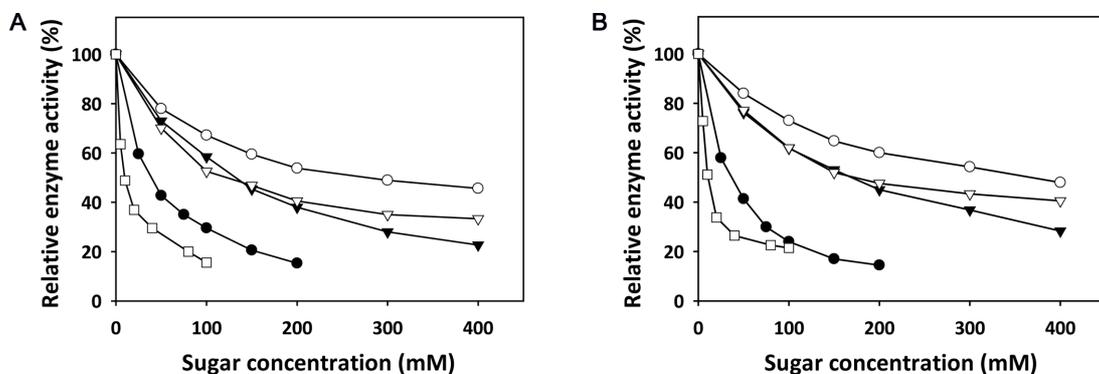
**Fig. 5.** Thin-layer chromatogram of the hydrolysis products of melibiose, raffinose and stachyose with the  $\alpha$ -galactosidase of YB-1413 or YB-1414. Reactions were done using stachyose (lanes 1 and 2), raffinose (lanes 3 and 4) and melibiose (lanes 5 and 6) as substrates at 40°C for 5 h, respectively. Reaction products were analyzed from reaction mixtures before (lane 1, 3 and 5) and after reaction (lane 2, 4 and 6). Authentic sugar abbreviations are as follows: Suc, sucrose; Gal, galactose; Glc, glucose.

간의  $\alpha$ -1.6 결합도 완전히 가수 분해하여 melibiose로부터는 galactose와 glucose를, raffinose와 stachyose로부터는 sucrose와 galactose를 최종 분해산물로 각각 생성하였다(Fig. 5).

#### $\alpha$ -Galactosidase의 가수분해 활성에 미치는 당의 영향

$\alpha$ -Galactosidase,  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -glucosidase와  $\beta$ -xylosidase 등을 포함하는 여러 종류의 glycosidases는 반응 산물이나 이와 유사한 구조를 갖는 당에 의해 효소 활성이 저해를 받는 것으로 알려져 있다. 따라서 당의 종류와 양이  $\alpha$ -galactosidase 활성에 미치는 영향을 조사하기 위해 glucose, galactose, xylose, mannose와 ribose의 첨가농도를 달리하면서 pNP- $\alpha$ Gal의 가수분해 활성을 측정하였다. 그 결과 Fig. 6에 보인 바와 같이 두 균주의 효소간에는 당에 의해 활성의 저해를 받는 정도가 큰 차이를 보이지는 않았지만, galactose는 YB-1414의 효소 활성을 약간 더 저해한 반면에 나머지 당(glucose, xylose, mannose, ribose)은 YB-1413의 효소 활성을 더 저해하는 경향을 보였다. 특이하게도  $\alpha$ -galactosidase에 의한 가수분해 산물인 galactose보다 오탄당인 ribose를 첨가하였을 때 pNP- $\alpha$ Gal의 활성이 더 크게 저해되어 ribose의 첨가농도가 10 mM 일 때 잔존활성이 약 50%인데 비해 galactose는 25 mM을 첨가하였을 때도 잔존활성이 55% 이상인 것으로 확인되었으며, ribose, galactose, mannose, xylose, glucose의 순서로 효소 활성을 저해하였다.

한편 *D. hansenii*의 균체내 효소는 2 mM의 galactose, melibiose와 glucose에 의해서도 활성이 저해되었으며[25], *B. licheniformis* YB-42의 효소는 분리균 YB-1413과 YB-1414의 효소와 유사하게 galactose, mannose, glucose 순서로 저해를 받는 것으로 보고되었다[14]. 그러나 특이하게 *R. miehei*의 효소는 100 mM의 galactose가 존재하여도 활성에 저해를 받지 않는 것으로 알려졌다[13].



**Fig. 6.** Effects of sugars on the  $\alpha$ -galactosidase activities of the culture filtrate by YB-1413 (A) and YB-1414 (B). The relative activity was determined by measuring  $\alpha$ -galactosidase activity of the culture filtrate for pNP- $\alpha$ Gal (1.0 mM) in the presence of various concentrations of each sugar including glucose (-○-), mannose (-▼-), xylose (-▽-), and galactose (-●-), ribose (-□-), respectively. Each curve represents the average of three independent experiments within standard errors of 2% between them.

## 요약

전통 발효된장으로부터  $\alpha$ -galactosidase를 분비 생산하는 두 종류 *Bacillus licheniformis* 균주로 YB-1413과 YB-1414를 분리하여 당 이용능을 비롯한 생화학적 특성 및 16S rRNA 염기서열과 중합효소 연쇄반응에 의한 임의증폭 DNA 다형성의 유전학적 특성을 비교한 결과 두 균주는 매우 유사하였지만 동일 균주는 아닌 것으로 확인되었다. 탄소원으로 wheat bran을 사용하였을 때는 두 균주의  $\alpha$ -galactosidase 생산성이 증가하였으나, melibiose, raffinose 또는 sucrose는 효소 생산성이 급격하게 감소하였다. 질소원으로 yeast extract가 첨가된 배지에서 효소 생산성이 높았으며, YB-1413은 1.87 U/ml, YB-1414는 1.69 U/ml의 효소 생산성을 보였다. 이들 균주가 생산하는  $\alpha$ -galactosidases는 pH 6.0과 45°C에서 모두 최대활성을 보였으며, 낮은 농도의 ribose와 galactose에 의해서도 효소활성이 급격하게 저해되었다. 한편 이들 효소는 대두와 콩과식품에 존재하는 항영양인자인 raffinose와 starchyose를 완전히 가수분해 하였는데, 이로 보아 분리균 YB-1413과 YB-1414는 콩 발효식품과 대두 사료의 영양가를 개선하는데 활용할 가치가 있다고 여겨진다.

## References

- Alazzeah AY, Ibrahim SA, Song D, Shahbazi A, AbuGhazaleh AA. 2009. Carbohydrate and protein sources influence the induction of  $\alpha$ - and  $\beta$ -galactosidases in *Lactobacillus reuteri*. *Food Chem.* **117**: 654–659.
- Anggraeni AA, Sakka M, Kimura T, Ratanakhaokchai K, Kitooka M, Sakka K. 2008. Characterization of *Bacillus halodurans*  $\alpha$ -galactosidase Mel4A encoded by the mel4A gene (BH2228). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**: 2459–2462.
- Asano N, Ishii S, Kizu H, Ikeda K, Yasuda K, Kato A, et al. 2000. *In vitro* inhibition and intracellular enhancement of lysosomal  $\alpha$ -galactosidase A activity in fabry lymphoblasts by 1-deoxygalactonojirimycin and its derivatives. *Eur. J. Biochem.* **267**: 4179–4186.
- Cao Y, Yuan T, Shi P, Luo H, Li N, Meng K, et al. 2010. Properties of a novel  $\alpha$ -galactosidase from *Streptomyces* sp. S27 and its potential for soybean processing. *Enzyme Microb. Technol.* **47**: 305–312.
- Clarke JH, Davidson K, Rixon JE, Halstead JR, Fransen MP, Gilbert HJ, et al. 2000. A comparison of enzyme-aided bleaching of softwood paper pulp using combinations of xylanase, mannanase and  $\alpha$ -galactosidase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**: 661–667.
- Ferreira JG, Reis AP, Guimaraes VM, Falkoski DL, Fialho Lda S, de Rezende ST. 2011. Purification and characterization of *Aspergillus terreus*  $\alpha$ -galactosidases and their use for hydrolysis of soymilk oligosaccharides. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **164**: 1111–1125.
- Ganter C, Bock A, Buckel P, Mattes R. 1988. Production of thermostable recombinant  $\alpha$ -galactosidase suitable for raffinose elimination from sugar beet syrup. *J. Biotechnol.* **8**: 301–310.
- Giuseppin ML, Almkerk JW, Heistek JC, Verrips CT. 1993. Comparative study on the production of guar  $\alpha$ -galactosidase by *Saccharomyces cerevisiae* SU50B and *Hansenula polymorpha* 8/2 in continuous cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 52–59.
- Gote MM, Khan MI, Gokhale DV, Bastawde KB, Khire JM. 2006. Purification, characterization and substrate specificity of thermostable  $\alpha$ -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* (NCIM-5146). *Proc. Biochem.* **41**: 1311–1317.
- Gote M, Umalkar H, Khan I, Khire J. 2004. Thermostable  $\alpha$ -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* (NCIM 5146) and its application in the removal of flatulence causing factors from soymilk. *Proc. Biochem.* **39**: 1723–1729.
- Gurkok S, Soyler B, Biely P, Ogel ZB. 2010. Cloning and heterologous expression of the extracellular  $\alpha$ -galactosidase from *Aspergillus fumigatus* in *Aspergillus sojae* under the control of *gpdA* promoter. *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic.* **64**: 146–149.
- Jin HK, Yoon K-H. 2014. Production and characterization of  $\beta$ -galactosidase from *Bacillus licheniformis* isolated from doenjang. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **42**: 339–346.
- Katrolia P, Jia H, Yan Q, Song S, Jiang Z, Xu H. 2012. Characterization of a protease-resistant  $\alpha$ -galactosidase from the thermophilic fungus *Rhizomucor miehei* and its application in removal of raffinose family oligosaccharides. *Bioresour. Technol.* **110**: 578–586.
- Kim HS, Lee KS, So JH, Lee MS, Choi J-H, Yoon K-H. 2004. Characterization of extracellular  $\alpha$ -galactosidase produced by *Bacillus licheniformis* YB-42. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **32**: 128–134.
- Kim HS, Lee KS, So JH, Yoon K-H. 2004. Hydrolysis activity of  $\alpha$ -galactosidase from *Bacillus licheniformis*. *Korean J. Microbiol.* **40**: 328–333.
- Kim SW, Knabe DA, Hong KJ, Easter RA. 2003. Use of carbohydrases in corn-soybean meal-based nursery diets. *J. Anim. Sci.* **81**: 2496–2504.
- Li X, Yang L, Yan P, Zuo F, Jin F. 1997. Factors regulating production of  $\alpha$ -galactosidase from *Bacillus* sp. JF2. *Let. Appl. Microbiol.* **25**: 1–4.
- Margolles-Clark E, Tenkanen M, Luonteri E, Three Penttila M. 1996.  $\alpha$ -galactosidase genes of *Trichoderma reesei* cloned by expression in yeast. *Eur. J. Biochem.* **240**: 104–111.
- Merceron R, Foucault M, Haser R, Mattes R, Watzlawick H, Gouet P. 2012. The molecular mechanism of thermostable  $\alpha$ -galactosidases AgaA and AgaB explained by x-ray crystallography and mutational studies. *J. Biol. Chem.* **287**: 39642–39652.

20. Park I, Lee J, Cho J. 2012. Partial characterization of  $\alpha$ -galactosidic activity from the antarctic bacterial isolate, *Paenibacillus* sp. LX-20 as a potential feed enzyme source. *Asian-Australas J. Anim. Sci.* **25**: 852–860.
21. Patil AG, Kumar P, Mulimani VH, Veeranagouda Y, Lee K. 2010.  $\alpha$ -Galactosidase from *Bacillus megaterium* VHM1 and its application in removal of flatulence-causing factors from soymilk. *J. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 1546–1554.
22. Songre-Ouattara LT, Mouquet-Rivier C, Icard-Verniere C, Humblot C, Diawara B, Guyot JP. 2008. Enzyme activities of lactic acid bacteria from a pearl millet fermented gruel (bensaalga) of functional interest in nutrition. *Int. J. Food Microbiol.* **128**: 395–400.
23. Spizizen J. 1958. Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **44**: 407–408.
24. Varbanets DL, Malanchuk VM, Buglova TT, Kuhlmann RA. 2001. *Penicillium* sp. 23  $\alpha$ -galactosidase: Purification and substrate specificity. *Carbohydr. Polym.* **44**: 357–363.
25. Viana PA, de Rezende ST, Passos FM, Oliveira JS, Teixeira KN, Santos AM, et al. 2009. *Debaryomyces hansenii* UFV-1 intracellular  $\alpha$ -galactosidase characterization and comparative studies with the extracellular enzyme. *J. Agric. Food Chem.* **57**: 2515–2522.
26. Wang H, Shi P, Luo H, Huang H, Yang P, Yao B. 2014. A thermophilic  $\alpha$ -galactosidase from *Neosartorya fischeri* P1 with high specific activity, broad substrate specificity and significant hydrolysis ability of soymilk. *Bioresour. Technol.* **153**: 361–364.
27. Wang Y, Black BA, Curtis JM, Ganzle MG. 2014. Characterization of  $\alpha$ -galacto-oligosaccharides formed via heterologous expression of  $\alpha$ -galactosidases from *Lactobacillus reuteri* in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**: 2507–2517.
28. Xu H, Qin Y, Huang Z, Liu Z. 2014. Characterization and site-directed mutagenesis of an  $\alpha$ -galactosidase from the deep-sea bacterium *Bacillus megaterium*. *Enzyme Microb. Technol.* **56**: 46–52.
29. Yoon MY, Hwang H-J. 2008. Reduction of soybean oligosaccharides and properties of  $\alpha$ -D-galactosidase from *Lactobacillus curvatus* R08 and *Leuconostoc mesenteroides* JK55. *Food Microbiol.* **25**: 815–823.
30. Zhao H, Lu L, Xiao M, Wang Q, Lu Y, Liu C, et al. 2008. Cloning and characterization of a novel  $\alpha$ -galactosidase from *Bifidobacterium breve* 203 capable of synthesizing Gal- $\alpha$ -1,4 linkage. *FEMS Microbiol. Lett.* **285**: 278–283.
31. Zhou J, Dong Y, Li J, Zhang R, Tang X, Mu Y, et al. 2012. Cloning, heterologous expression, and characterization of novel protease-resistant  $\alpha$ -galactosidase from new *Sphingomonas* strain. *J. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 1532–1539.