

## 균체외 $\alpha$ -galactosidase를 생산하는 *Streptomyces* sp. YB-4의 분리 및 효소 특성

김소영 · 조기행<sup>1</sup> · 김창진<sup>2</sup> · 박동진<sup>2</sup> · 윤기홍\*

우송대학교 식품생명과학부, <sup>1</sup>씨티씨바이오 중앙연구소, <sup>2</sup>한국생명공학연구원

**Characterization of Extracellular  $\alpha$ -galactosidase Produced by *Streptomyces* sp. YB-4. Kim, So-Young, Ki Haeng Cho<sup>1</sup>, Chang-Jin Kim<sup>2</sup>, Dong-Jin Park<sup>2</sup>, and Ki-Hong Yoon\*.** School of Food Science & Biotechnology, Woosong University, 17-2, Jayang-dong, Dong-ku, Daejeon 300-718, <sup>1</sup>R&D Center, CTCBIO Inc., Seoul 305-600, <sup>2</sup>KRIBB, Yusong-ku, Daejeon 305-600, Korea – A strain YB-4 producing the extracellular  $\alpha$ -galactosidase was isolated from soil, and has been identified as *Streptomyces* sp. on the basis of its cultural, morphological and physiological properties. The partially purified  $\alpha$ -galactosidase was most active on par-nitrophenyl- $\alpha$ -D-galactopyranoside at pH 6.0 and 60°C. The enzyme retained 90% of its maximum activity between pH 4.0 and pH 10.0 after pre-incubation for 1 h. The enzyme was able to hydrolyze oligomeric substrates such as melibiose, raffinose and stachyose to liberate galactose residue, indicating that the  $\alpha$ -galactosidase of *Streptomyces* sp. YB-4 hydrolyzed  $\alpha$ -1,6 linkage.

**Key words:** *Streptomyces*, identification,  $\alpha$ -galactosidase, property, reaction product

$\alpha$ -Galactosidase( $\alpha$ -D-galactoside galactohydrolase, EC 3.2.1.22)는 식물, 미생물, 동물에 널리 분포되어 있으며, galactose 잔기를 함유한 galactomannan 다당류나 melibiose (galactose- $\alpha$ -1,6-glucose), raffinose(galactose- $\alpha$ -1,6-sucrose), stachyose(galactose- $\alpha$ -1,6-raffinose)와 같은 저당류에서  $\alpha$ -1,6 결합의  $\alpha$ -galactose 잔기를 가수분해한다[4]. 이러한 활성을 지니는  $\alpha$ -galactosidase는 산업용 효소로 이용되고 있는데, 제당산업에서 당밀 함유된 raffinose가 축적되어 그 함량이 6~10%에 달하면 sucrose의 결정화가 중지되어 폐당밀로 폐기되는 원인이 되므로 당밀에  $\alpha$ -galactosidase를 처리하여 raffinose를 가수분해시키면 원당에서 sucrose의 회수율이 증가된다[8,16]. 또한, 두과류에 존재하는 raffinose와 stachyose가 장내 가스를 발생시키는 고창증의 원인이 되므로 콩을 원료로 사용하는 식품에  $\alpha$ -galactosidase를 처리하면 이러한 증후군을 제거할 수 있어 두유 식품의 영양적인 질의 개선을 이룰 수 있으며[5], 대두박이 사료의 주요성분으로 이용되므로  $\alpha$ -galactosidase는 사료첨가용 효소로도 유용성이 높다[12]. 한편, 연질목 유래 hemicellulose의 주요성분인 galactomannan에 존재하는 갈락토스 측쇄는 mannanase의 가수분해능을 방해할 수 있으며  $\alpha$ -galactosidase는 갈락토스 측쇄를 제거하여 mannanase와 동시에 처리하면, 연질목의 galactomannan 분해능을 향상시킬 수 있어 펄프와 제지산업에서 그 응용성이 주목을 받고 있다[2].

다수의 곰팡이가 세포외  $\alpha$ -galactosidase를 생산하는데 주로 *Aspergillus niger*[18], *A. nidulans*[20], *A. awamori*[19], *A. ficuum* [25]을 포함하는 *Aspergillus* 속 균주로부터 생산되는 효소는 대부분이 당단백질로 확인되었다. 그리고, *A. niger* [3] *A. tamarii*[1], *Trichoderma reesei*[26], *Penicillium simplicissimum*[17]은 최소한 2개 이상의  $\alpha$ -galactosidase를 생산하는 것으로 알려져 있다. 또한, *Saccaromyces cerevisiae*와 *Hansenula polymorpha*에서 세포외 분비효소로 생산하며[9], *Mortierella vinacea*의 경우 균체내  $\alpha$ -galactosidase를 생산한다[21]. 세균에서는 *Pseudomonas fluorescens*[11], *Bifidobacterium adolescentis*[15], *Bacillus stearothermophilus* [23], *Thermus brockianus*[7]와 *Clostridium josui*[14] 등에서 효소와 그 유전자의 특성이 밝혀졌으며, 특히 *B. stearothermophilus*는 75°C, *T. brockianus*는 90°C~95°C에서 각각 최고의 활성을 보이는 내열성  $\alpha$ -galactosidase를 생산하는 것으로 알려졌다.

한편, 각종 항생물질 뿐 아니라 세포외 분비 효소의 생산 균으로도 관심을 받고 있는 방선균 중에서도 균체내·외  $\alpha$ -galactosidase를 생산하는 *Streptomyces erythrus*가 보고되었다[6]. 본 연구에서는 국내 토양으로부터  $\alpha$ -galactosidase를 생산하는 *Streptomyces* sp. 균주를 분리하여, 분리균이 생산하는  $\alpha$ -galactosidase의 반응특성을 조사하였다.

### 재료 및 방법

$\alpha$ -Galactosidase 생산균의 탐색 및 방선균의 분리는 토양

\*Corresponding author

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

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

시료 1 g을 생리식염수 10 ml에 현탁하고, 현탁액의 적당량을 취하여 방선균 분리용 humic acid vitamin 평판배지 humic acid 1.0 g/L, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.05 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5 g/L, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.01 g/L, CaCO<sub>3</sub> 0.02 g/L, KCl 0.7 g/L, thiamine-HCl 0.5 mg/L, riboflavin 0.5 mg/L, niacin 0.5 mg/L, inositol 0.5 mg/L, pyridoxin-HCl 0.5 mg/L, Ca-pantothenate 0.5 mg/L, biotin 0.25 mg/L, uminobenzoic acid 0.5 mg/L, cycloheximide 50 mg/L, validixic acid 50 mg/L, agar 18 g/L(pH 7.2))에 도달한 후 20°C에서 7일간 배양하였다. 형성된 콜로니 중에서 서로 다른 모양을 보이는 콜로니를 방선균 배양용 G.S.S 배지(soluble starch 10 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.25 g/L, soybean meal 25 g/L, beef extract 1 g/L, yeast extract 4 g/L, NaCl 2 g/L, glucose 20 g/L, CaCO<sub>3</sub> 2 g/L(pH 7.2))에 접종하여 28°C에서 4일간 배양하였다. 방선균 배양액을 원심분리하여 얻은 배양상등액의 α-galactosidase 활성을 측정함으로써 α-galactosidase를 생산하는 방선균을 탐색하였다.

**분리균주 동정**

분리균주의 동정은 Bergey's Manual of Systematic bacteriology[10]와 International Streptomyces Project(ISP) 방법 [22,24]에 준하여 실시하였다. 배양 특성의 조사는 ISP 방법에 따라 ISP 평판배지(Difco, USA) No. 2, 3, 4, 5, 7과 Bennett 평판배지 및 Czapeck solution 평판배지에 접종한 후 28°C에서 7일, 14일, 21일 간격으로 기균사의 색깔, 배면 색깔, 배지색깔, 생육정도, 가용성 색소 생성 유무 및 펠라닌 색소 생성 유무를 관찰하였다. 탄소원 이용성은 arabinose, xylose, rhamnose, fructose, sucrose, inositol, mannitol, cellulose 등을 부가탄소원으로 첨가한 Bennett 평판배지에서 배양한 후 성장정도를 비교하여 결정하였다. 분리균주의 형태적 특성은 포자의 사슬형태, 표면상태, 포자형성능 등을 관찰을 통해 실시하였으며 포자형성능은 oatmeal 평판배지를 이용하여 28°C에서 21일간 배양한 후 조사하였다.

**α-Galactosidase 조효소액 제조**

*Streptomyces* sp. YB-4를 대부분과 glucose 첨가량을 조절한 G.S.S 배지에 접종하여 28°C에서 4일 동안 배양한 후 원심분리하여 상등액을 취하여 α-galactosidase를 분리·정제하였다. 상등액에 15~60% ammonium sulfate를 처리한 후, 12,000 rpm에서 40분 동안 원심분리 한 후 침전물을 취하여 25 mM Tris · HCl buffer(pH 8.0)에 녹이고 동일 buffer에 투석하였다. 투석한 단백질 용액을 25 mM Tris · HCl buffer(pH 8.0)로 평형시키고 DEAE-Sepharose column에 loading하고 NaCl 농도를 0.5 M이 되도록 농도구배를 주어 증가시키면서 흡착된 α-galactosidase를 용출하였다. α-Galactosidase 활성을 보이는 분획을 모아 농축한 후 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 1 M이 되도록 첨가한 후 동일 완충액으로 평

형화된 Phenyl-Sepharose column에 단백질을 흡착시키고 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 0 M까지 농도구배를 주어 α-galactosidase를 용출하였다. 용출된 분획 중 α-galactosidase의 활성이 높은 분획을 모아 20 mM phosphate buffer (pH 6.0)에 투석하여 조효소액을 제조하였다.

**α-Galactosidase 활성 측정**

α-Galactosidase의 활성은 다음의 과정에 의해 측정하였다. 1 mM p-nitrophenyl-α-D-galactopyranoside(pNP-Gal)과 50 mM sodium phosphate buffer(pH 6.0)를 포함한 반응액에 효소를 첨가하여 45°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. 효소의 활성도는 1분 동안 1 μmole의 para-nitrophenol을 유리시키는 효소량을 1 unit로 정의하였다.

**α-Galactosidase 활성에 미치는 온도와 pH의 영향**

α-Galactosidase 활성에 미치는 반응 온도의 영향을 알아보기 위하여, 30°C~70°C까지의 온도에서 각각 α-galactosidase 활성을 측정하였으며, 활성에 미치는 pH의 영향을 알아보기 위해서는 pH 3.0에서 pH 10.0까지의 범위에서 α-galactosidase 활성을 각각 측정하였다. pH 3.0~6.0의 범위에서는 citrate buffer, pH 6.0~8.0에서는 sodium phosphate buffer, pH 8.0~10.0에서는 KCl-borate buffer를 각각 사용하였다. α-Galactosidase의 열 안정성을 조사하기 위하여 효소 용액을 각각의 온도에서 일정시간 방치한 후 잔존활성을 측정하였으며, pH 안정성을 조사하기 위해서는 0.1 M pH 완충용액에 소량의 효소액을 혼합한 후 4°C에서 일정시간 방치한 후 잔존활성을 각각 측정하였다.

**반응산물 분석**

Melibiose, raffinose, stachyose를 각각 반응기질로 하여 효소반응을 수행한 후에 반응액을 3분 동안 95°C에서 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 acid와 glacial acetate 몇 방울을 혼합한 발색제 용액을 뿌린 후, 120°C에서 10분간 방치하였다.

**결과 및 고찰**

**α-Galactosidase 생산균주의 분리과 동정**

토양시료를 적정량 회석하여 humic acid vitamin 한천 배지에 도달하고 28°C에서 7일간 배양하여 총 500주의 방선

균을 순수 분리하였다. 분리된 방선균을 G.S.S 복합 액체배지에 접종하여 28°C에서 4일간 배양한 후 pNP-Gal을 기질로 하여 배양상등액에 존재하는 α-galactosidase의 활성을 측정하였다. 그 결과 다수의 분리균주가 α-galactosidase를 생산하는 것으로 확인되었으며 이들 중 melibiose의 분해능이 있고 α-galactosidase의 생산성이 가장 높은 균주를 최종적으로 선발하여 선발된 균주를 YB-4로 명명하였다.

선발된 YB-4의 형태적 특성을 조사한 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 포자의 표면은 매끄럽고 실린더형이며 그 크기는 0.4~0.5×0.8~1.2 μm이었다. 포자는 30~50개 이상이 연결되어 나선형사슬 구조를 이루는 것으로 확인되었다. YB-4의 배양학적 특성을 확인하기 위해 ISP 배지를 포함한 9종의 평판배지에서 7, 14, 21일 동안 배양하여 균의 성장, 기균사의 색깔, 배면의 색깔, 수용성의 색소생성 등을 관찰한 결과 Table 1과 같이 대부분의 배지에서 균의 성장이 양호하였으며, 콜로니 표면의 색깔은 주로 회색과 노란색을 띄고 콜로니 배면은 주로 갈색과 노란색을 보이는 것으로 확인되었다. Peptone-yeast extract-iron 평판배지와 tyrosine 평판배지상에서는 멜라닌 색소가 생성되었다.



Fig. 1. Scanning electron microscopic photograph (1.19×10<sup>4</sup> fold) of the isolate YB-4 grown on oatmeal agar medium for 21 days.

선발된 YB-4 균주의 생리화학적 특성은 관찰한 결과 Table 2에 보인바와 같이 탈지유와 전분의 가수분해능을 보였으나 gelatin은 액화하지 못하였으며, melanoid 색소를 생성하였다. 또한 각종 탄수화물을 1%가 되도록 첨가한 배지와 이를 첨가하지 않은 배지에서 분리균의 성장정도를 비교한 결과 YB-4는 D-glucose, L-arabinose, D-galactose를 탄소원으로 잘 이용하였으나, D-xylose, D-mannitol, D-fructose, L-rhamnose, raffinose, cellulose, melibiose, mannose, maltose는 잘 이용하지 못하였다.

실제 당의 이용성을 판단하는 것은 glucose를 첨가한 배지와 당을 첨가하지 않은 배지에서 균의 성장정도를 대조군으로 하여 비교함으로써 결정하는 것인 만큼 그 정확도가 낮다고 판단되지만, melibiose와 raffinose는 α-galactosidase에 의해 galactose와 glucose로 분해됨에도 불구하고 YB-4가 glucose나 galactose를 첨가한 배지에서는 성장정도가 양호한데 비해 melibiose나 raffinose를 첨가한 배지에서는 성장정도가 배지에 당을 첨가하지 않았을 때와 유사한 것으로 나타난 것은 사용된 Bennett 배지에서는 YB-4의 효소 생산성이 매우 낮아 배지내에 존재하는 melibiose와 raffinose를 거의 분해하지 못하여 이들 당을 탄소원으로 이용하지 못한 때문으로 판단된다.

Table 2. Physiological characteristics of *Streptomyces* sp. YB-4.

Unit character	Description	Unit character	Description
Melanoid pigment	+	L-Arabinose	+
Soluble pigment	-	D-Xylose	-
Liquefaction of gelatin	-	D-Mannitol	-
Coagulation of milk	-	D-Fructose	-
Peptonization of milk	+	L-Rhamnose	-
Reduction of nitrate	-	Raffinose	-
Hydrolysis of starch	+	D-Galactose	+
Hydrolysis of skim milk	+	Cellulose	-
<b>Cell chemistry</b>		Melibiose	-
Diaminopimelic acid	LL type	Mannose	-
<b>Carbohydrate utilization</b>		Maltose	-
D-Glucose	+		

+, positive; -, negative

Table 1. Cultural characteristics of *Streptomyces* sp. YB-4.

Media	Growth	Aerial mycelium	Substrate mycelium	Soluble pigment
Yeast extract-malt extract agar (ISP No.2)	Good	Gray	Pale brown	Brown
Oatmeal agar (ISP No.3)	Good	Gray	Pale yellow	None
Inorganic salts-starch agar (ISP No.4)	Moderate	Whitish gray	Pale yellow	None
Glycerol-asparagine agar (ISP No.5)	Good	Gray	Pale brown	None
Peptone-yeast extract-ironagar (ISP No.6)	Good	Pale yellow	Dark brown	Black
Tyrosine agar (ISP No.7)	Moderate	Gray	Dark brown	Black
Glucose-asparagine agar	Moderate	Whitish gray	Pale yellow	ND
Bennett's agar	Good	Gray	Pale yellow	ND
Nutrient agar	Moderate	Pale yellow	Pale yellow	ND

ND. not determined

한편, 분리균의 세포벽에 존재하는 diaminopiemic acid의 형태를 TLC를 통해 분석한 결과 YB-4은 LL형의 liaminopiemic acid를 지니고 있어 *Streptomyces* 속에 속하는 것으로 판단된다.

***Streptomyces* sp. YB-4의 α-galactosidase 생산성**

*Streptomyces* sp. YB-4 균주를 G.S.S와 Bennett 배지에 접종하여 28°C, 160 rpm으로 baffled flask에서 진탕 배양하면서 배양상등액에 존재하는 α-galactosidase의 활성을 측정 한 결과 Bennett 배지상에서는 효소 생산성이 아주 낮았으며, GSS 배지상에서는 배양 4일째 효소 생산성이 최대에 이르는 것으로 나타났다(data not shown).

G.S.S 배지에서 효소 생산성에 영향을 미치는 배지성분을 알아보기 위하여 G.S.S 배지 성분 중 대두분, 수용성 전분, CaCO<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, glucose 등을 각각 제거한 배지에 배양한 후 배양상등액에 존재하는 α-galactosidase 활성을 측정 한 결과 대두분이나 glucose를 제거하였을 때 효소 생산성이 매우 저조한 것으로 확인되었다. *Streptomyces* sp. YB-4는 G.S.S 배지에서 glucose 대신 fructose, mannose, sucrose, lactose, maltose, galactose, melibiose, trehalose, raffinose 등을 각각 1%씩 첨가하였을 때 효소 생산에 미치는 영향을 검토한 결과 glucose를 첨가한 배지에서 효소 생산성이 가장 우수하고 다른 당을 첨가한 배지에서는 모두가 glucose를 첨가한 배지에서 보다 그 생산성이 30% 이하 정도의 수준이었다. 이와는 달리 균체내·외의 α-galactosidase를 동시에 생산하는 *S. erythrus*는 대두밀과, galactose, melibiose, raffinose의 존재하에서 효소 생산성이 증가하며[6], *A. nidulans*도 galactose에 의해 α-galactosidase 생산성이 증가된다는 것이 알려져 있다[20]. 한편, *A. niger*에 있어서 galactomannan, arabinoxylan과 벚꽃이[18], *P. simplicissimum*의 경우는 중기처리된 귀리껍질[17] 각각 α-galactosidase 생산성을 증가시키는 것으로 알려져 있으므로, 분리균 YB-4의 효소 생산성에 α-cellulose, 밀기울, 벚꽃, oat spelt xylan, avicell 및 locust bean gum과 같은 고분자 탄수화물이 미치는 영향을 조사한 결과 α-galactosidase의 생산성이 이들에 의해 증가되지 않는 것으로 확인되었다. 따라서, G.S.S 배지성분 중 대두분과 glucose이 *Streptomyces* sp. YB-4의 α-galactosidase 생산성에 영향을 미치므로 이들 성분의 양을 달리하였을 때 효소 생산성을 조사하였다. 대두분의 농도(0~5%)를 달리하여 첨가한 G.S.S 배지에서 4일간 배양하면서 배양상등액의 α-galactosidase 활성을 측정 한 결과 2.5%~3% 대두분을 첨가한 배지에서 효소 생산성이 가장 높았다(data not shown). 그러므로 대두분을 2.5% 첨가한 G.S.S 배지에 glucose의 첨가량을 달리하여 배양한 후 효소 생산성을 조사한 결과 2% glucose 첨가시의 α-galactosidase 생산성이 가장 높았으며 그 이상을 첨가하였을 때는 급격히 효소 생산성이 감소하는 것으로 확인되었다(Table 3).

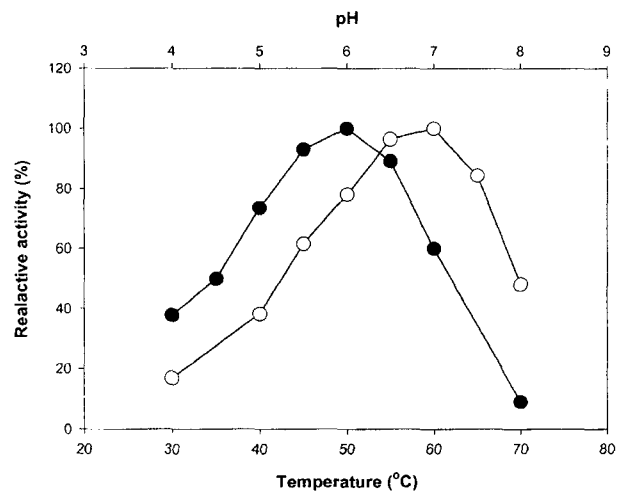
**Table 3. α-Galactosidase production of *Streptomyces* sp. YB-4 grown on G.S.S medium supplemented with various amount of glucose.**

Glucose amount (%)	α-Galactosidase productivity (U/ml)	Relative productivity (fold)
none	0.01	1.0
0.5	0.05	5.0
1.0	0.10	10.0
1.5	0.13	13.0
2.0	0.39	39.0
3.0	0.24	32.0
4.0	0.17	17.0
5.0	<0.01	0.5

**α-Galactosidase의 반응 특성**

*Streptomyces* sp. YB-4가 세포외로 분비 생산하는 α-galactosidase의 반응특성을 조사하기 위해 G.S.S 배지성분 중 glucose(2%)와 대두밀(2.5%)의 양을 조절 한 배지에서 *Streptomyces* sp. YB-4를 배양하여 얻은 배양상등액을 15%~60% ammonium sulfate로 분획하고, DEAE-Sepharose column과 Phenyl-Sepharose column 크로마토그래피 과정을 거쳐 α-galactosidase를 부분 정제하고 이를 조효소액으로 사용하였다. 반응온도와 pH를 달리하여 α-galactosidase 활성을 측정함으로써 반응온도와 pH가 xylanase 활성과 안정성에 미치는 영향을 조사한 결과 Fig. 2에서 표시바와 같이 60°C와 pH 6.0에서 최대 활성을 보였다.

열안정성을 조사하기 위해 온도와 시간을 달리하여 조효



**Fig. 2. Effects of reaction temperature and pH on the α-galactosidase activity.** Temperature profile (—○—) was obtained by measuring the α-galactosidase activities at pH 6.0 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 citrate; pH 6.0 to 8.0, 50 mM sodium phosphate; pH 8.0 to 10.0, 50 mM KCl-Borate.

소액을 각 온도에서 방치한 후 잔존활성을 측정된 결과 60°C 이상에서 활성이 급격히 저하되어 3시간 이상에서는 완전히 실활되었으며, 50°C 이하에서는 방치시간에 따라 서서히 실활되어지는 것으로 확인되었다(Fig. 3). pH에 대한 안정성을 조사한 결과 pH 4.0~10.0에서는 2시간 방치한 후에도 90% 이상의 활성을 유지하였으나 pH 3.0에서는 급격히 활성을 상실하였다. 따라서, pH 3.0, pH 3.5, pH 4.0에서 각각 일정 시간 방치한 후 방치시간에 따른 잔존활성을 측정된 결과 Fig. 4에 보인바와 같이 pH 4.0에서는 시간이 지나도 거의 실활되지 않으나 pH 3.0에서는 30분 후에 급격히 실활되어 잔존활성이 40% 이하로 되며 방치시간을 길게 하였을 때 약 30% 정도의 활성을 유지하고 있는 것으로 확인되었다. pH 3.5에서도 30분 이내에 잔존활성이 약 80% 정도로 낮아지지만, 그 후에는 더 이상의 실활이 일어나지 않고 안정하게 유지되었다.

반응산물의 분석

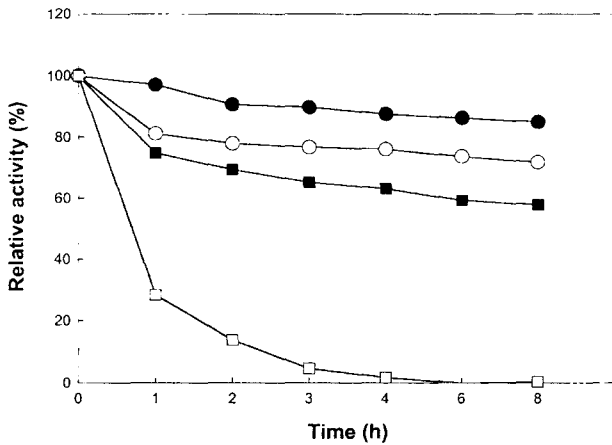


Fig. 3. Thermostability of  $\alpha$ -galactosidase. The residual activity was measured at various times after incubation at 40°C (●), 45°C (○), 50°C (■) and 60°C (□) with a fixed pH (6.0).

*Streptomyces* sp. YB-4의  $\alpha$ -galactosidase가  $\alpha$ -1,6 결합으로 연결된 말단 galactosyl group을 함유한 당을 가수분해하는지 조사하기 위해 시간을 달리하여 반응시킨 후 각 가수분해 산물을 TLC로 분석하였다. Melibiose는 galactose와 glucose가  $\alpha$ -1,6 결합을 이루고 있는 이당류인데 이를 기질로 하여 반응산물을 조사한 결과 galactose와 glucose가 생성되는 것이 확인되었으며, 장시간 반응 후에도 기질인 melibiose가 완전히 분해되지 않는 것으로 나타났다(Fig. 5A). Galactose와 sucrose의 glucose 잔기기에  $\alpha$ -1,6 결합을 이루고 있는 삼당류인 raffinose도  $\alpha$ -galactosidase에 의해 분해되어지며, 분해산물은 galactose와 sucrose로 확인되었으나 완전한 가수분해가 일어나지 않았다(Fig. 5B). Stachyose를 기질로 하였을 때도 반응산물로 galactose, sucrose, raffinose가 생성되는 것이 확인되었는데(Fig. 5C), stachyose는 galactose가 raffinose의 galactose 잔기에  $\alpha$ -1,6 결합을 하고 있는 사당류이므로 반응산물로 raffinose가 형성된 것으로 보아 galactose와 glucose가  $\alpha$ -1,6 결합 뿐만 아니라 galactose간

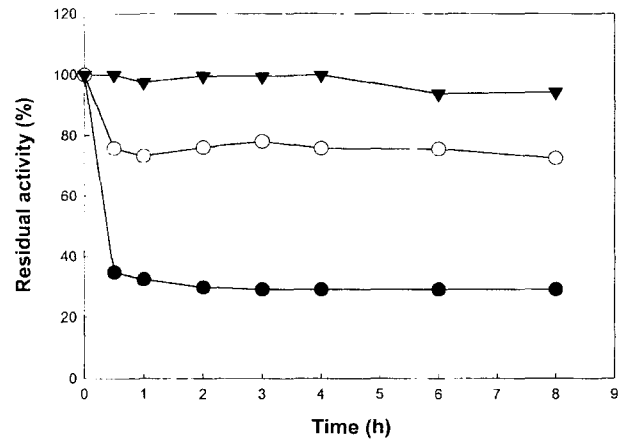


Fig. 4. pH Stability of  $\alpha$ -galactosidase. The residual activity was measured at various times after incubation at pH 3.0 (●), pH 3.5 (○) and pH 4.0 (▼) with a fixed temperature (4°C).

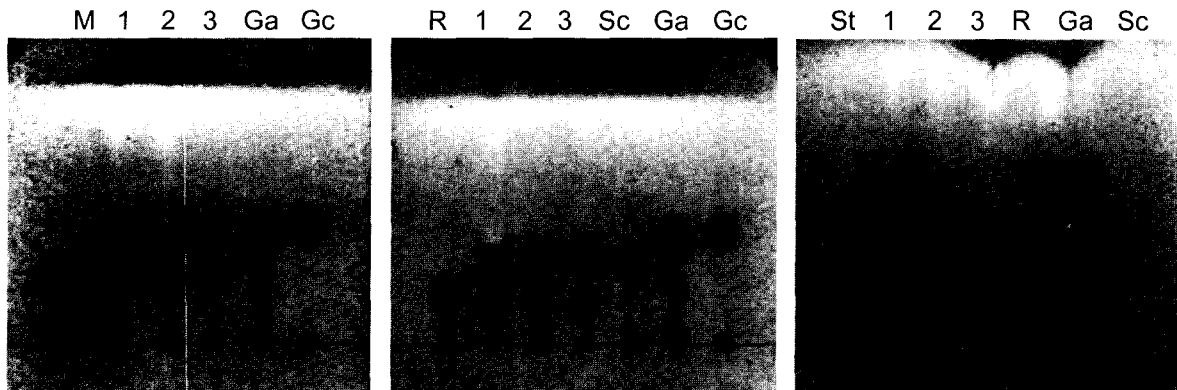


Fig. 5. Thin-layer chromatograms of hydrolysis products from melibiose (A), raffinose (B) and stachyose (C). Reaction was done at 45°C for 6 h (lane 1), 12 h (lane 2), and 24 h (lane 3), respectively, and the reaction mixture was withdrawn at each time mixture. After boiling for 3 min, the reaction mixture was used for TLC. M, melibiose; R, raffinose; Ga, galactose; Gc, glucose; Sc, sucrose; St, stachyose.

기 α-1,6 결합도 가수분해하는 것을 알 수 있다. 또한, tachyose의 반응산물 중 위의 3 종류 당외에 다른 당 성분이 TLC에서 관찰되지 않는 것으로 보아 stachyose는 먼저 galactose와 raffinose로 분해된 후 raffinose가 galactose와 ucrose로 분해되는 것으로 추측된다.

상기의 결과로 보아 *Streptomyces* sp. YB-4가 생산하는 효소는 galactose와 glucose 또는 galactoses 간의 α-1,6 결합을 가수분해 하지만 완전히 가수분해하지는 못하는 것으로 확인되었다. 이는 반응산물인 galactose가 효소반응을 저해하는 것 때문으로 판단된다. *C. josui*가 생산하는 α-galactosidase 경우도 raffinose, melibiose를 가수분해하지만 완전히 가수분해 하지 못하는 것으로 보고되었다[14]. 한편 *Thermus* sp. T2의 효소는 stachyose와 melibiose는 거의 분해하며, raffinose는 완전히 분해하지 못하는 것으로 알려져 있는데[13], 이로 보아 α-galactosidase는 종류에 따라 가수분해 기작에 차이가 많은 것으로 추측된다.

요 약

토양으로부터 세포외로 α-galactosidase를 분비 생산하는 광선균 YB-4가 분리되었으며, 분리균의 배양 · 형태 · 생리적 특성을 조사한 결과 *Streptomyces* 속 균주로 확인되었다. 분리균의 배양상등액으로부터 부분정제된 α-galactosidase를 조효소액으로 사용하였을 때 para-nitrophenyl-α-D-galactopyranoside는 pH 6.0과 60°C의 반응조건에서 가장 잘 분해되었으며, 조효소액을 pH 4.0에서 pH 10.0 범위에서 1시간 이상 방치한 후에도 약 90% 이상의 α-galactosidase 활성을 유지하였다. 또한 분리균이 생산하는 α-galactosidase는 melibiose, raffinose와 stachyose와 같은 저당류를 가수분해할 수 있으며 분해산물로 galactose를 방출하는 것으로 보아 α-1,6 결합을 분해한 것으로 확인되었다.

REFERENCES

1. Civas, A., R. Eberhard, P. Le Dizet, and F. Patek. 1984. Glycosidases induced in *Aspergillus tamarii*: Secreted α-D-galactosidase and beta-D-mannanase. *Biochem. J.* **219**: 857-863.

2. 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.

3. 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 β-galactosidase gene from *Aspergillus niger*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2453-2460.

4. Dey, P. M. and E. D. Campillo. 1984. α-Galactosidase. *Adv.*

*Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **56**: 141-249.

5. 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.

6. Elshafei, A. M., M. S. Foda, E. Abdel-Mobde, and N. H. Ali. 2001. Optimization of α-galactosidase production in *Streptomyces erythrus*. *Acta Microbiol. Pol.* **50**: 53-63.

7. 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.

8. 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.

9. Giuseppin, 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.

10. Goodfellow, M., T. Cross, and H. A. Lechevalier. 1989. Suprageneric classification of Actinomycetes, pp 2333-2450. In S. T. Williams, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol 4, Williams and Wilkins, Baltimore.

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. 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.

13. 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.

14. 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.

15. Leader, S., W. Hartmeier, and S. P. Mark. 1999. α-Galactosidase of *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083. *Curr. Microbiol.* **38**: 101-106.

16. Linden, J. C. 1982. Immobilized α-galactosidase in the sugar beet industry. *Enzyme Microb. Technol.* **4**: 130-136.

17. 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.

18. Manzanares, P., L. H. de Graff, and J. Visser. 1998. Characterization of galactosidases from *Aspergillus niger*: purification of a novel  $\alpha$ -galactosidase activity. *Enzyme Microb. Technol.* **22**: 383-390.
19. Neustroev, K. N., A. S. Krylov, O. N. Abiroskina, L. M. Firsov, V. V. Nasonov, and A. Y. Khorlin. 1991. Isolation and properties of  $\alpha$ -galactosidase from *Aspergillus awomori*. *Biochemistry (Moscow)*. **56**: 288-296.
20. Rios, S., A. M. Pedregosa, I. F. Monostrol, and F. Laborda. 1993. Purification and molecular properties of an  $\alpha$ -galactosidase synthesized and secreted by *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **112**: 35-42.
21. 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  $\alpha$ -galactosidase from *Mortierella vinacea*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**: 592-598.
22. Shirling, E. B. and D. Gottlieb. 1966. Methods for the characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **16**: 313-340.
23. Talbot, G. and J. Sygusch. 1990. Purification and characterization of thermostable  $\beta$ -mannanase and  $\alpha$ -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**: 3505-3510.
24. Williams, S. T., M. Goodfellow, G. Alderson, E. M. H. Wellington, P. H. A. Sneath, and M. Sackin. 1983. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 1743-1813.
25. Zapter, I. G., A. H. J. Ullah, and R. J. Wodzinski. 1990. Extracellular  $\alpha$ -galactosidase (EC 3.2.1.22) from *Aspergillus ficuum* NRRL 3135: purification and characterization. *Prep. Biochem.* **20**: 263-296.
26. Zeilinger, S., D. Kristufek, I. Arisan-atack, R. Hodits, and C.P. Kubicek. 1993. Conditions of formation, purification, and characterization of an  $\alpha$ -galactosidase of *Trichoderma reesei* RUT C-30. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1347-1353.

(Received Aug. 29, 2002/Accepted Oct. 30, 2002)