

β-Galactosidase를 생산하는 *Streptomyces* sp. YB-10의 분리 및 효소 특성

이경섭 · 김창진¹ · 윤기홍*
우송대학교 식품생명과학부, ¹한국생명공학연구원

Characterization of the β-Galactosidase Produced by *Streptomyces* sp. YB-10. Lee, Kyung-Seob, Chang-Jin Kim¹, and Ki-Hong Yoon*. School of Food Science & Biotechnology, Woosong University, 17-2, Jayang-dong, Dong-ku, Daejeon 300-718, ¹KRIBB, Yusong-ku, Daejeon 305-600, Korea – A strain YB-10 was isolated from soil as a producer of the extracellular β-D-galactosidase, which catalyzes the hydrolysis of lactose. The strain YB-10 was identified as *Streptomyces* sp. on the basis of its cultural, morphological and physiological properties. After treating culture supernatant of the isolate with ammonium sulfate, the precipitated protein was used as a crude β-galactosidase for analyzing its reaction properties with para-nitrophenyl-β-D-galactoside (pNP-βGal) as a substrate. The β-galactosidase showed its maximal activity at pH 6.0 and 60°C. The enzyme was also active on lactose. The hydrolyzing activity of β-galactosidase for pNP-βGal and lactose was decreased by galactose. Its hydrolyzing activity for lactose was also decreased by glucose, but the activity for pNP-βGal was increased to 1.8-folds by glucose.

Key words: *Streptomyces*, identification, β-galactosidase, property, reaction product

β-Galactosidase (β-D-galactoside galactohydrolase)는 유당과 같은 β-D-galactopyranosides에서 비환원 말단 β-D-galactose를 가수분해하거나, galactose의 전이반응을 촉매하며 여러종류의 미생물을 비롯하여 식물과 동물에서 두루 발견된다. 이 효소의 가수분해 활성과 당 전이 활성은 모두 산업적 응용성이 있다. 가수분해 활성은 우유와 유제품의 유당을 가수분해하여 유당 불내증을 막아주며 감미도를 높여 주고[14], 당 전이 활성은 인간의 장내 유용미생물인 bifidobacteria의 성장을 증진시키는 갈락토올리고당의 제조에 이용된다[10].

*Bifidobacterium*속 균주가 생산하는 β-galactosidase로 *B. infantis* HL96[7]에서 3 종류의 효소, *B. adolescentis*[19]에서 2종류의 효소가 각각 밝혀졌으며, 이들은 동일한 균종에서 생산된 효소라 할지라도 당 전이반응의 특이성과 반응속도에 차이가 큰 것으로 확인되었다. *B. breve*, *B. bifidum*과 *B. longum* 및 장내에서 분리된 많은 종류의 bifidobacteria [16]에서도 β-galactosidases의 활성이 보고되었다. 또한 *Lactobacillus*속, *Lactococcus*속, *Streptococcus*속, *Pediococcus*속의 다양한 유산균 균주들이 생산하는 β-galactosidase의 특성이 밝혀졌다[5]. 특히 장내 유용균의 경우는 생균제로서의 기능을 향상시키기 위해 β-galactosidase의 생산성을 증가시킨 변이주의 개발도 이루어지고 있다[8]. 갈락토올리

고당의 생산을 위해 당 전이반응의 특이성이 다른 β-galactosidase가 *Bacillus circulans*[3], *Aspergillus aculeatus*[18], *Saccharomyces fragilis*[20] 등에서 분리되었으며, 고온의 공정에서도 사용될 수 있는 내열성 효소에 관한 연구도 *Pyrococcus woesei*[1], *Sulfolobus solfataricus*[13], *Sterigmatomyces elviae*[12], *Thermotoga maritima*[4], *Saccharopolyspora rectivirgula*[11], *Thermus*속 균주[17] 등에서 진행되었다.

한편 방선균은 항생물질 뿐 아니라 세포외 분비되는 가수분해 효소의 생산균으로도 관심을 받고 있으며, 균체내·외 α-galactosidase를 생산하는 *Streptomyces erythrus*[2]와 균체외 α-galactosidase를 생산하는 *Streptomyces* sp.가 보고되었다[9]. 본 연구에서는 현재까지 β-galactosidase에 대한 보고가 많지 않은 방선균을 대상으로 새로운 효소자원을 확보하기 위해 국내 토양에서 β-galactosidase를 생산하는 *Streptomyces* sp. 균주를 분리하여 동정하고, 분리균이 생산하는 β-galactosidase의 반응특성을 조사하였다.

재료 및 방법

β-Galactosidase 생산균의 탐색

방선균의 분리는 토양시료 1g을 생리식염수 10 ml에 현탁하고, 현탁액의 적당량을 취하여 방선균 분리용 humic acid vitamin 평판배지 (humic acid 1.0 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.05 g/L, Na₂HPO₄ 0.5 g/L, FeSO₄·7H₂O 0.01 g/L, CaCO₃ 0.02 g/L, KCl 1.7 g/L, thiamine-HCl 0.5 mg/L, riboflavin 0.5 mg/L, niacin 0.5 mg/L, inositol 0.5 mg/L, pyridoxin-

*Corresponding author
Tel. 82-42-630-9742, Fax: 82-42-636-2676
E-mail: ykh@lion.woosong.ac.kr

HCl 0.5 mg/L, Ca-pantothenate 0.5 mg/L, biotin 0.25 mg/L, aminobenzoic acid 0.5 mg/L, cycloheximide 50 mg/L, nalidixic acid 50 mg/L, agar 18 g/L(pH 7.2))에 도달한 후 28°C에서 7일간 배양하였다. 형성된 콜로니 중에서 서로 다른 모양을 보이는 콜로니를 방선균 배양용 G.S.S 배지(soluble starch 10 g/L, K₂HPO₄ 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, CaCO₃ 2 g/L(pH 7.2))에 접종하여 28°C에서 5일간 배양하였다. 방선균 배양액을 원심분리하여 얻은 배양상등액의 β -galactosidase 활성을 측정함으로써 β -galactosidase를 생산하는 방선균을 탐색하였다.

분리균주 동정

분리균주의 동정은 Bergey's Manual of Systematic bacteriology[6]와 International Streptomyces Project(ISP) 방법[15,21]에 준하여 실시하였다. 배양 특성의 조사는 ISP 방법에 따라 ISP 평판배지(Difco, USA) No. 2, 3, 4, 5, 7 과 glucose asparagine 평판배지 및 Bennett 평판배지에 접종한 후 28°C에서 7일, 14일, 21일 간격으로 기균사의 색깔, 배면색깔, 배지색깔, 생육정도, 가용성 색소 생성 유무 및 멜라닌 색소 생성 유무를 관찰하였다. 탄소원 이용성은 arabinose, xylose, rhamnose, fructose, sucrose, inositol, mannitol, raffinose 등을 부가탄소원으로 첨가한 Bennett 평판배지에서 배양한 후 성장정도를 비교하여 결정하였다. 분리균주의 형태적 특성은 포자의 사슬형태, 표면상태, 포자형성능 등의 관찰을 통해 실시하였으며 포자형성능은 oatmeal 평판배지를 이용하여 28°C에서 21일간 배양한 후 조사하였다.

β -Galactosidase 조효소액 제조

분리균을 G.S.S 배지에 접종하여 28°C에서 5일 동안 진탕 배양한 후 원심분리하여 얻은 배양상등액을 얻었다. 배양상등액에 30~70% ammonium sulfate를 처리하고 12,000 rpm에서 30분 동안 원심분리 한 후 침전물을 취하여 20 mM sodium phosphate buffer(pH 6.0)에 녹이고 동일 buffer에 투석하여 조효소액을 제조하였다.

β -Galactosidase 활성 측정

1 mM p-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside(pNP- β Gal)와 50 mM sodium phosphate buffer(pH 6.0)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 μ mole의 para-nitrophenol을 유리시키는 효소양을 1 unit로 정의하였다.

β -Galactosidase 활성에 미치는 온도와 pH의 영향

β -Galactosidase 활성에 미치는 반응 온도의 영향을 조사

하기 위하여 30°C~75°C까지의 온도에서 각각 β -galactosidase 활성을 측정하였으며, 활성에 미치는 pH의 영향을 알아보기 위해서는 pH 4.0에서 pH 8.0까지의 범위에서 β -galactosidase 활성을 각각 측정하였다. 이때 pH 4.0~6.0의 범위에서는 citrate buffer, pH 6.0~8.0에서는 sodium phosphate buffer를 각각 사용하였다. β -Galactosidase의 열 안정성을 조사하기 위하여 효소 용액을 각각의 온도에서 일정시간 방치한 후 잔존활성을 측정하였다.

β -Galactosidase 활성에 미치는 당의 영향

β -Galactosidase 활성에 미치는 당의 영향을 분석하기 위하여, pNP- β Gal을 기질로 사용한 반응액에 xylose, glucose, fructose, mannose, galactose를 각각 농도를 달리 첨가하고 반응을 수행한 후 활성을 측정하였다.

반응산물 분석

Lactose를 반응기질로 하여 60°C, pH 6.0에서 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)) 혼합 용액을 전개용액으로 하여 silica gel-precoated thin layer plate(Merck Kiesegel, No. 5748)에서 박층 크로마토그래피를 수행하였다. 전개된 물질을 발색시키기 위해서는 ethanol, p-anisaldehyde와 sulfuric acid(9 : 0.5 : 0.5(v/v))를 혼합한 발색제 용액을 뿌린 후, 120°C에서 5~10 분간 방치 후 관찰하였다.

결과 및 고찰

β -Galactosidase 생산균주의 분리과 동정

다양한 환경에서 채취한 시료를 생리식염수로 희석하여 humic acid vitamin 평판배지에 도말하고 28°C에서 7일간 배양하여 총 600주의 방선균을 순수 분리하였다. 분리된 방선균을 G.S.S 복합 액체배지에 접종하여 28°C에서 5일간 진탕 배양한 후 pNP- β Gal을 기질로하여 배양상등액에 존재하는 β -galactosidase의 활성을 측정하였다. 그 결과 다수의 분리균주가 β -galactosidase를 생산하는 것으로 확인되었으며 이들 중 lactose의 분해능이 있으며 β -galactosidase의 생산성이 높은 균주를 최종적으로 선발하여 선발된 균주를 YB-10으로 명명하였다.

선발된 YB-10의 형태적 특성을 조사한 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 포자의 표면은 매끄럽고 실린더형이며 그 크기는 0.5~0.8 \times 0.8~1.0 μ m이었다. 포자는 15~50개 이상이 연결되어 나선형사슬 구조를 이루는 것으로 확인되었다. YB-10의 배양학적 특성을 확인하기 위해 ISP 배지를 포함한 8종의 평판배지에서 5, 15일 동안 배양하여 균의 성장, 기균사의 색깔, 배면의 색깔, 수용성의 색소생성 등을 관찰한 결

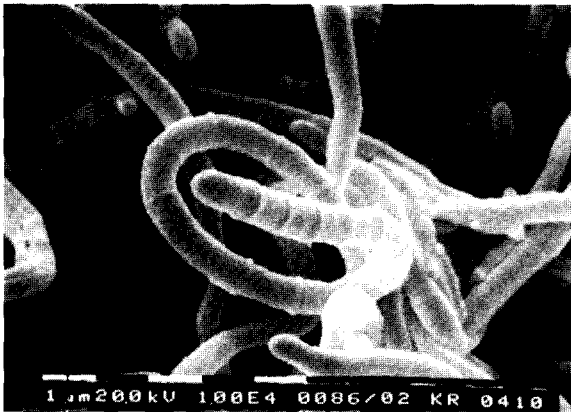


Fig. 1. Scanning electron microscopic photograph (1.00×10^4) of the isolate YB-10 grown on oatmeal agar medium for 21 days.

과 Table 1과 같이 모든 배지에서 균의 성장이 양호하고 수용성 색소를 생성하지 않으며, 콜로니 표면의 색깔은 주로 회색을 띠고 콜로니 배면은 주로 노란색을 보이는 것으로 확인되었다.

선발된 YB-10 균주의 생리화학적 특성은 관찰한 결과 Table 2에서 보인바와 같이 탈지유와 전분의 가수분해능을 보이며 탈지유를 응고시키는 것으로 확인되었고 melanoid 색소를 생성하지 않았다. 또한 각종 탄수화물을 1%가 되도록 첨가한 배지와 이를 첨가하지 않은 배지에서 분리균의 성장정도를 비교한 결과 YB-10는 D-glucose, L-arabinose, D-xylose, D-fructose, sucrose를 탄소원으로 잘 이용하였으나, inositol과 raffinose의 이용성은 우수하지 못하며 D-mannitol과 L-rhamnose는 이용하지 못하였다.

한편 분리균의 세포벽에 존재하는 diaminopimelic acid의 형태를 TLC를 통해 분석한 결과 YB-10은 LL형의 diaminopimelic acid를 지니고 있어 *Streptomyces*속에 속하는 것으로 판단된다.

β-Galactosidase의 반응 특성

Streptomyces sp. YB-10 균주를 G.S.S배지에 접종하여 28°C, 200 rpm으로 baffled flask에서 진탕 배양하면서 배양상등액에 존재하는 β-galactosidase의 활성을 측정된 결과 배양 5일째 효소 생산성이 최대에 이르는 것으로 나타났다

Table 2. Physiological characteristics of *Streptomyces* sp. YB-10.

Unit character	Description	Unit character	Description
	-	Carbohydrate utilization	
Melanoid pigment	-	D-Glucose	+
Soluble pigment	+	L-Arabinose	+
Coagulation of milk	-	D-Xylose	+
Peptonization of milk	+	Inositol	±
Hydrolysis of starch	+	D-Mannitol	-
Hydrolysis of skim milk		D-Fructose	+
Cell chemistry		L-Rhamnose	-
Diaminopimelic acid	LL type	Sucrose	+
		Raffinose	±

+, positive; -, negative; ±, faint positive

(data not shown). 따라서 *Streptomyces* sp. YB-10이 세포외로 분비 생산하는 β-galactosidase의 반응특성을 조사하기 위해 G.S.S 배지에서 5일간 배양하여 얻은 배양상등액을 30%~70% ammonium sulfate로 분획하여 β-galactosidase를 부분 정제하고 이를 조효소액으로 사용하였다.

반응온도와 pH를 달리하여 β-galactosidase 활성을 측정함으로써 반응온도와 pH가 β-galactosidase활성에 미치는 영향을 조사한 결과 Fig. 2에서 나타낸 바와 같이 60~65°C와 pH 6.0에서 최대 활성을 보였으며, citrate 완충용액을 사용하였을 때보다 phosphate 완충용액을 사용하였을 때 활성이 훨씬 높은 것으로 확인되었다.

효소의 열안정성을 분석하기 위해 50~70°C 범위에서 30분간 각각 열처리한 후 효소의 잔존 활성을 측정된 결과 55°C 이상에서는 급격히 실패되는 것으로 나타났다 (data not shown). 열처리 온도 40°C~50°C 범위에서 열처리 시간을 달리하면서 잔존활성을 조사하였을 때 Fig. 3에 나타낸 바와 같이 40°C에서는 8시간 방치한 후에도 효소활성이 그대로 유지되고 있는 것으로 확인되었으며, 45°C에서는 1시간 방치 후에 약 95% 이상의 수준으로 효소활성이 유지되었고 8시간 방치 후에는 잔존활성이 약 90% 정도로 나타나 45°C에서는 안정성이 유지된다고 하겠다. 그러나 50°C에서는 열처리시간이 늘어나면서 급격히 잔존 효소활성이 낮아짐을 알 수 있으며, 8시간 후에는 약 20% 정도의 활성이 남아 있었다. 또한 40°C와 45°C에서 열처리시 30~60분 정도 열처

Table 1. Cultural characteristics of *Streptomyces* sp. YB-10.

Media	Growth	Aerial mycelium color	Reverse side color	Soluble pigment
Yeast extract-malt extract agar (ISP No.2)	Good	Gray	Yellowish brown	None
Oatmeal agar (ISP No.3)	Good	Gray	Pale yellow	None
Inorganic salt-starch agar (ISP no.4)	Good	Gray	Pale yellow	None
Glycerol-asparagine agar (ISP No.5)	Good	Pale gray	Pale yellow	None
Peptone-yeast extract-iron agar (ISP No.6)	Good	Pale gray	Pale yellow	None
Tyrosine agar (ISP No.7)	Good	Whitish gray	Pale yellow	None
Glucose-asparagine agar	Good	Gray	Pale yellow	None
Bennets agar	Good	Gray	Pale yellow	None

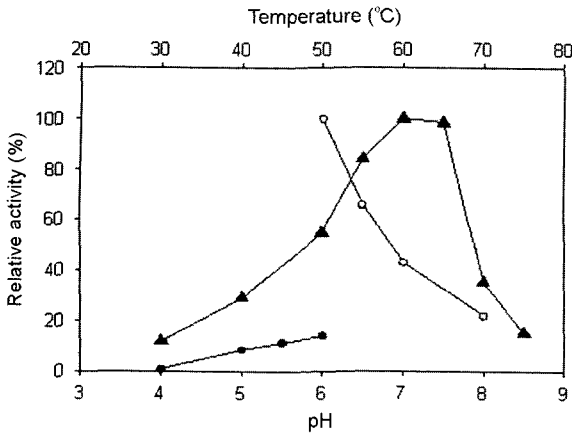


Fig. 2. Effects of reaction temperature and pH on the β -galactosidase activity. Temperature profile (- \blacktriangle -) was obtained by measuring the β -galactosidase activities at pH 6.0 and different temperatures. The reactions were done at 60°C and various pHs for determining the pH profile. The following buffer systems were used: pH 4.0 to 6.0, 50 mM citrate (- \bullet -); pH 6.0 to 8.0, 50 mM sodium phosphate (- \circ -).

리를 하였을 때는 미약하지만 효소활성이 높아지는 것으로 확인되었는데 이는 조효소액 중에 효소반응을 저해하는 요소가 열처리 과정 중에 제거되었기 때문으로 판단된다.

반응산물의 분석

β -Galactosidase가 β -1,4 결합으로 연결된 말단 galactosyl group을 함유한 당을 가수분해하는지 조사하기 위해 반응시킨 후 반응시간에 따른 각 가수분해 산물을 TLC로 분석하였다(Fig. 4). 그 결과 반응시간에 따라 반응액에 잔존하는 lactose의 양이 감소하면서 galactose와 glucose가 생성되는 것이 확인되었으며, 장시간 반응후에도 반응산물에 소량의 lactose가 잔존하는 것으로 나타났다. 이로부터 *Streptomyces*

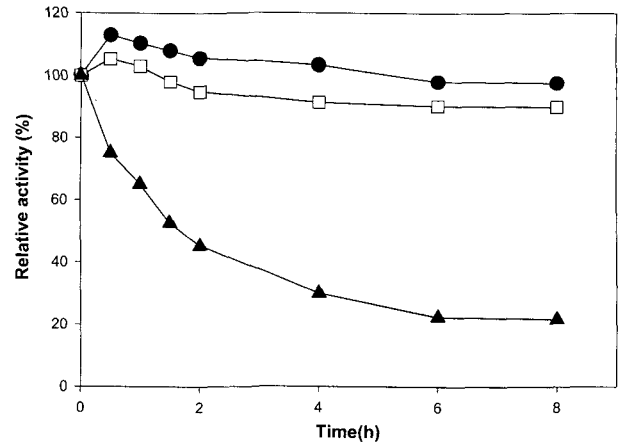


Fig. 3. Thermostability of β -galactosidase. The residual activity was measured at various times after incubation at 40°C (- \bullet -), 45°C (- \square -) and 50°C (- \blacktriangle -) with a fixed pH 6.0.

sp. YB-10의 β -galactosidase는 galactose와 glucose 간의 β -1,4 결합을 가수분해 하지만 완전히 가수분해하지는 못하는 것을 알 수 있는데, 이는 lactose 분해시 반응산물인 galactose와 glucose가 효소반응을 저해한 때문으로 판단된다.

한편 β -galactosidase 반응시 반응산물인 glucose와 galactose의 양을 달리하여 첨가한 상태에서 lactose의 가수분해 정도를 측정할 결과 50~100 mM glucose를 첨가하였을 때는 이를 첨가하지 않았을 때와 유사한 정도로 lactose가 분해되었으나, galactose의 경우 50 mM을 첨가하였을 때 lactose의 분해정도가 이를 첨가하지 않았을 때보다 낮은 것으로 확인되었다. 또한 galactose와 glucose의 첨가량을 증가시켰을 때는 lactose의 분해정도가 저하되었다. 이는 10 mM glucose가 존재할 때 lactose의 가수분해능은 거의 저하되지 않으나, 10 mM galactose의 존재시에는 lactose의 가수분해 활성이 50% 이상 저하되는 것으로 알려진 *B. infantis* HL96의 β -

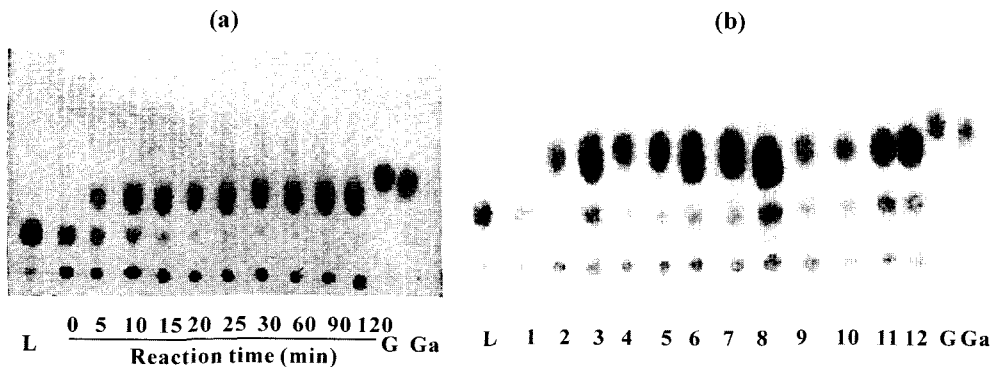


Fig. 4. Thin-layer chromatograms of the hydrolysis products of lactose with the crude β -galactosidase. In panel A, reaction was done for various times at 60°C. In panel B, reactions were done with various concentrations of glucose (lanes 4~7) and galactose (lanes 9~12) or without them (lane 2), respectively, for 2 h at 60°C. Concentrations of glucose and galactose added to reaction mixture are 10 mM (lane 9), 50 mM (lanes 4 and 10), 100 mM (lanes 3, 5, 8 and 11), 200 mM (lane 6) and 250 mM (lanes 7 and 12). Lanes 1, 3, and 8 are corresponding to reaction mixture supplemented with no additional sugar, glucose, and galactose, respectively, before β -galactosidase reaction. Authentic sugar abbreviations are as follows: L, lactose; G, glucose; Ga, galactose.

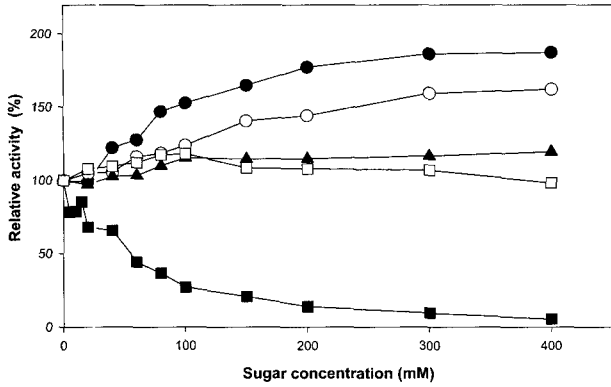


Fig. 5. Effects of sugars on the β-galactosidase activity. The relative activity was determined by measuring β-galactosidase activity for pNP-βGal (1 mM) in the presence of various concentrations of sugars including glucose (●), xylose (○), fructose (▲), mannose (□), galactose (■), respectively.

galactosidase와 비교해 볼 때 *Streptomyces* sp. YB-10가 생산하는 β-galactosidase의 lactose 가수분해능은 glucose 보다 galactose에 의해 저해를 많이 받으며, 저해 정도는 크지 않는 것으로 판단된다.

β-Galactosidase 활성에 미치는 첨가당의 영향

B. infantis HL96의 β-galactosidase는 *o*-nitrophenyl-β-D-galactoside를 기질로 하였을 때 10 mM 농도의 glucose나 galactose에 의해 효소 활성이 저해되지 않으며, 10 mM fructose에 의해서는 약 20% 정도의 활성이 저해되는 것으로 보고되었다[7]. *Streptomyces* sp. YB-10의 β-galactosidase 활성에 미치는 당의 영향을 분석하기 위해 pNP-βGal을 기질로 하여 glucose, galactose, xylose, mannose, fructose 등의 단당을 첨가하여 효소 반응을 실시하였다. 그 결과 *B. infantis*의 β-galactosidase와는 달리 분리균이 생산하는 효소는 10 mM galactose가 존재할 경우 약 20% 정도의 활성이 저해되었으며, 다른 당의 경우 20 mM이 존재하여도 효소 활성에 큰 변화가 없는 것으로 확인되었다.

반응에 첨가하는 당의 농도를 증가시키면서 pNP-βGal의 분해활성을 측정하였을 때 Fig. 5에 나타낸 바와 같이 glucose와 xylose의 농도를 증가시킬수록 β-galactosidase 활성이 증가하였으며 glucose의 경우 200 mM 이상에서 약 180% 효소 활성, xylose의 경우에는 300 mM 이상에서 약 160%의 효소 활성을 각각 보였다. 고 농도의 glucose의 존재하에서 *Streptomyces* sp. YB-10가 생산하는 β-galactosidase에 의한 lactose의 분해반응이 저해 받는 것으로 나타난 결과와는 달리 기질을 pNP-βGal로 사용하였을 때는 오히려 기질분해 효소 활성이 1.8배 증가하였으며 이러한 결과는 기존에 보고된 β-galactosidase에서는 알려지지 않은 흥미로운 결과라 하겠다. Fructose는 농도를 증가시킬수록 효소활성을 증가하였으나, 100 mM 이상의 농도를 첨가하였을

때는 약 110%의 효소활성을 유지하는 것으로 관찰되었다. Mannose를 첨가하였을 때는 100 mM의 농도에서는 효소활성이 약 110%까지 증가하였으나 그 이상의 농도에서는 100%의 활성을 유지하여 효소 활성에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 그러나 galactose는 농도를 증가시킬수록 효소활성이 급격히 감소하여 400 mM 이상의 농도에서는 약 5% 정도의 효소활성을 보였으며, 이러한 결과는 lactose를 기질로 사용하였을 때 galactose가 존재하면 lactose의 분해 정도가 감소하는 결과와 일치하였다.

요 약

토양으로부터 세포외로 β-galactosidase를 분비 생산하는 방선균 YB-10이 분리되었으며, 분리균의 배양·형태·생리적 특성을 조사한 결과 *Streptomyces*속 균주로 확인되었다. 분리균의 배양상등액을 30%~70% ammonium sulfate로 처리하고 투석하여 얻은 β-galactosidase를 조효소액으로 사용하였을 때 para-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (pNP-βGal)는 pH 6.0과 60°C의 반응조건에서 가장 잘 분해되었으며, lactose는 galactose와 glucose로 가수분해되는 것으로 확인되었다. 분리균이 생산하는 β-galactosidase는 galactose에 의해 lactose와 pNP-βGal의 가수분해 활성이 모두 저해되었으나, glucose에 의해서는 lactose의 가수분해 활성만 저해되었다. 특히 pNP-βGal의 가수분해 활성은 glucose에 의해 약 1.8배 증진되었다.

감사의 말

본 연구는 우송대학교 산학협력연구 과제로 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

REFERENCES

1. Dabrowski, S., J. Maciunski, and J. Synowiecki. 1998. Cloning and nucleotide sequence of the thermostable beta-galactosidase gene from *Pyrococcus woesei* in *Escherichia coli* and some properties of the isolated enzyme. *Mol. Biotechnol.* **10**: 217-222.
2. 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.
3. Fujimoto, H., M. Miyasato, Y. Ito, T. Sasaki, and K. Ajisaka. 1998. Purification and properties of recombinant beta-galactosidase from *Bacillus circulans*. *Glycoconj. J.* **15**: 155-160.
4. Gabelsberger, J., W. Liebl, and H. Schleifer. 1993. Purification and properties of recombinant beta-galactosidase of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**: 44-52.
5. Garman, J., T. Coolbear, and J. Smart. 1996. The effect of

- cations on the hydrolysis of lactose and the transferase reactions catalysed by beta-galactosidase from six strains of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **46**: 22-27.
6. Goodfellow, M., T. Cross, and H.A. Lechevalier. 1989. Suprageneric classification of Actinomyces, 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.
 7. Hung, M.N., Z. Xia, N.T. Hu, and B.H. Lee. 2001. Molecular and biochemical analysis of two beta-galactosidases from *Bifidobacterium infantis* HL96. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 4256-4263.
 8. Ibrahim, S.A. and D.J. O'Sullivan. 2000. Use of chemical mutagenesis for the isolation of food grade beta-galactosidase overproducing mutants of bifidobacteria, lactobacilli and *Streptococcus thermophilus*. *J. Dairy. Sci.* **83**: 923-930.
 9. Kim, S.-Y., K.H. Cho, C.-J. Kim, D.-J. Park, and K.-H. Yoon. 2002. Characterization of extracellular α -galactosidase produced by *Streptomyces* sp. YB-4. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 332-338.
 10. 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 beta-galactosidases. *Carbohydr. Res.* **305**: 383-391.
 11. Nakao, M., M. Harada, Y. Kodama, T. Nakayama, Y. Shibano, and T. Amachi. 1994. Purification and characterization of a thermostable beta-galactosidase with high transgalactosylation activity from *Saccharopolyspora recitivirgula*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**: 657-663.
 12. Onishi, N. and T. Tanaka. 1995. Purification and properties of a novel thermostable galacto-oligosaccharide-producing beta-galactosidase from *Sterigmatomyces elviae* CBS8119. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 4026-4030.
 13. Pisani, F.M., R. Rella, C.A. Raia, C. Rozzo, R. Nucci, A. Gambacorta, M. Rosa, and M. Rossi. 1990. Thermostable beta-galactosidase from the archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus*. Purification and properties. *Eur. J. Biochem.* **187**: 321-328.
 14. 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. *Nahrung.* **41**: 18-21.
 15. Shirling, E.B. and D. Gottlieb. 1966. Methods for the characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **16**: 313-340.
 16. Smart, J.B., C.J. Pillidge, and J.H. Garman. 1993. Growth of lactic acid bacteria and bifidobacteria on lactose and lactose-related mono-, di- and trisaccharides and correlation with distribution of beta-galactosidase and phospho-beta-galactosidase. *J. Dairy Res.* **60**: 16-22.
 17. Takase, M. and K. Horikoshi. 1998. A thermostable beta-glucosidase isolated from a bacterial species the genus *Thermus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**: 55-60.
 18. van Casteren, W.H., M. Eimermann, L.A. van den Broek, J.P. Vincken, H.A. Schols, and A.G. Voragen. 2000. Purification and characterisation of a beta-galactosidase from *Aspergillus aculeatus* with activity towards (modified) exopolysaccharides from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B39 and B891. *Carbohydr. Res.* **329**: 75-85.
 19. van Laere, K.M., T. Abee, H.A. Schols, G. Beldman, and A.G. Voragen. 2000. Characterization of a novel beta-galactosidase from *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083 active towards transgalactooligosaccharides. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 1379-1384.
 20. Wendorff W.L. and C.H. Amundson. 1971. Characterization of β -galactosidase from *Saccharomyces fragilis*. *J. Milk Food Technol.* **34**: 300-306.
 21. 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.

(Received Feb. 9, 2003/Accepted Apr. 14, 2003)