

## Bacillus licheniformis로부터 생산된 $\alpha$ -Galactosidase의 가수분해 활성

김현숙<sup>1</sup> · 이경섭<sup>1</sup> · 소재호<sup>1</sup> · 윤기홍<sup>1,2,\*</sup>

우송대학교, <sup>1</sup>응용식품 · 영양학부, <sup>2</sup>생물소재 응용연구센터

$\alpha$ -갈락토올리고 당인 melibiose, raffinose와 stachyose의  $\alpha$ -1,6으로 결합된 D-galactosyl 잔기를 완전히 가수분해하는 것으로 확인된 *Bacillus licheniformis* YB-42의  $\alpha$ -galactosidase는 사멸기에 도달하였을 때 배양상등액에서 최대 활성을 보였다.  $\alpha$ -갈락토올리고 당의 가수분해 정도를 TLC와 환원당 생성량으로 분석한 결과,  $\alpha$ -galactosidase는 melibiose, raffinose, stachyose 순서로 가수분해 활성이 높았다. 반응산물인 당을 첨가하여 반응하였을 때 첨가된 반응산물에 따라 가수분해 활성의 저해정도가 다르게 나타났으며, galactose에 의한 저해도가 가장 높았다. 첨가된 당의 농도 (20 mM)가 기질과 동일할 때는 가수분해 활성의 저해도가 미미하였으며 5배 농도로 첨가하였을 때도 가수분해 활성의 저해정도가 높지 않았다. 한편 소량의 효소로 melibiose를 가수분해 하였을 때 반응초기에 TLC 상에서 기질보다 이동도가 낮은 물질이 생성되었으며, 이로 보아 *B. licheniformis* YB-42의  $\alpha$ -galactosidase는 당 전이 활성을 갖는 것으로 여겨진다. 또한 대두분 추출액을  $\alpha$ -galactosidase로 처리한 후 최종 반응산물을 분석한 결과, 대두분에 존재하는 raffinose와 stachyose가 완전히 가수분해 되었다.

**Key words** □ *Bacillus licheniformis*,  $\alpha$ -galactosidase, hydrolysis activity, transferase activity

$\alpha$ -Galactosidase는 galactose 잔기를 함유한 melibiose, raffinose, stachyose와 같은 올리고당, galactolipids, galactomannan (guar gum, locust bean gum)의 비환원성 말단으로부터  $\alpha$ -1,6결합의 D-galactosyl 잔기를 가수분해하는 exo-glycosidase이다(5, 12). 이러한 활성을 지니는  $\alpha$ -galactosidase는 산업용 효소로 이용되고 있는데, 제당산업에서 당밀에 함유된 raffinose가 일정농도(6-10%) 축적되면 sucrose의 결정화가 중지되어 폐당밀로 폐기되는 원인이 되므로 당밀에  $\alpha$ -galactosidase를 처리하여 raffinose를 가수분해시키면 원당에서 sucrose의 회수율이 증가될 수 있다(7, 17). 인간과 단위동물들은 소화기관내에  $\alpha$ -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(19). 그러므로 콩을 원료로 사용하는 식품에  $\alpha$ -galactosidase를 처리하면 이러한 현상을 방지하여 두유 식품의 영양적인 질의 개선을 이룰 수 있으며(6) 사료내 대두박의 영양효율을 높일 수 있어 사료첨가용 효소로도 유용성이 높다(10). 인간의 경우 리소좀에 존재하는 가수분해 효소인  $\alpha$ -galactosidase A의 효소활성 결핍 또는 부족에 의한 결과로 나타나는 당지질의 선천성 대사이상증인 파브리병의 치료제로써  $\alpha$ -galactosidase가 이용되고 있다(14). *Thermus thermophilus*(17)에 의해 생산되는  $\alpha$ -galactosidase와 같이 내열성이 우수한  $\alpha$ -galacto-

sidase는 연질목의 galactomannan에 존재하는 galactose 측쇄를 제거하여 mannanase와 동시에 처리하면 galactomannan 분해능을 향상시킬 수 있어 펄프와 제지산업에 이용하고자 하는 시도가 이루어지고 있으며(2),  $\alpha$ -galactosidase를 생산하는 유산균을 두유발효에 이용하고자 하는 연구도 활발히 진행되고 있다(1).

$\alpha$ -Galactosidase는 인간을 포함하여 동물, 식물, 미생물에서 두루 존재하며, 미생물 유래의 효소가 산업적 응용성이 높으므로 미생물로부터 다양한 특성의  $\alpha$ -galactosidases가 발견되었다. 다수의 곰팡이가 세포외  $\alpha$ -galactosidase를 생산하는 것으로 알려져 있으며 *Aspergillus niger* (4)와 *Trichoderma reesei* (2)는 최소한 2 종류 이상의  $\alpha$ -galactosidase를 생산한다. 또한 *Saccharomyces cerevisiae*와 *Hansenula polymorpha*에서 세포외 분비효소로 생산한다(8). 세균에서는 *Pseudomonas fluorescens* (9), *Bifidobacterium adolescentis* (15), *Bacillus stearothermophilus* (20), *Clostridium josui* (12), *Lactobacillus plantarum* (19), *Carnobacterium piscicola* (3) 등에서 효소와 그 유전자의 특성이 밝혀졌다.

전통 발효식품인 된장으로부터  $\alpha$ -galactosidase의 생산균으로 분리된 YB-42 균주는 형태적 특성, 생화학적 성질 및 16S rRNA 염기서열 (GenBank accession No AY601721)에 따라 *B. licheniformis*로 동정되었으며(13), 분리균의  $\alpha$ -galactosidase는 melibiose, raffinose, stachyose에서  $\alpha$ -1,6 결합의  $\alpha$ -galactose 잔기를 완전히 가수분해 한다는 사실이 알려졌다. 본 연구에서는 *B. licheniformis* YB-42가 생산하는  $\alpha$ -galactosidase의 활성에 따른 기질간 가수분해 효율을 비교하고 대두분에 존재하는  $\alpha$ -galactoside 당의 가수분해능을 조사하였다.

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 042-630-9742, Fax: 042-636-2676  
E-mail: ykh@lion.woosong.ac.kr

## 재료 및 방법

### 사용 균주 및 조효소액 제조

원장에서 분리된 *B. licheniformis* YB-42를  $\alpha$ -galactosidase의 생산균으로 사용하였고, LB 액체배지(yeast extract, 5 g; tryptone, 10 g; NaCl, 5 g; water, 1 liter)를 이용하여 배양하였다.  $\alpha$ -Galactosidase 조효소액으로는 *B. licheniformis* YB-42를 LB 배지에 접종하여 37°C에서 20시간 배양한 후 배양상등액을 ammonium sulfate (20-70%) 분획화, DEAE-Sephrose, Q-Sephrose 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 부분정제된  $\alpha$ -galactosidase를 사용하였다(13).

### $\alpha$ -Galactosidase 활성 측정

$\alpha$ -Galactosidase의 활성은 다음의 과정에 의해 측정하였다. 0.5 mM *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-galactopyranoside (pNP- $\alpha$ Gal)와 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5)를 포함한 반응액에 최종 반응부피가 400  $\mu$ l 되도록 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  $\mu$ mol의 *p*-nitrophenol을 유리시키는 효소량을 1 unit로 정의하였다.

### 반응산물 분석

Melibiose, raffinose, stachyose를 각각 반응기질로 하여 효소반응을 수행한 후에 반응액을 3분 동안 95°C에서 열처리한 후 원심 분리하여 단백질을 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 크로마토그래피를 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.

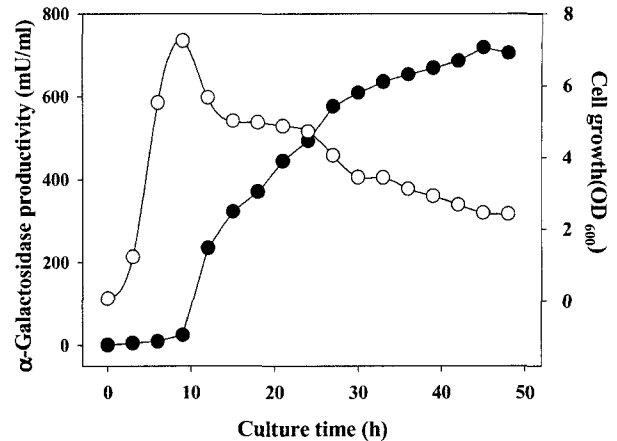
### 환원당 생성량 분석

$\alpha$ -Galactosidase에 의한 가수분해 반응 후 유리된 환원당은 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS)방법으로 다음과 같이 정량함으로써 측정하였다. 0.15  $\mu$ mol 기질(melibiose, raffinose, stachyose)과 50 mM sodium phosphate (pH 6.5)를 포함한 반응액에 효소액을 첨가하여 45°C에서 10분 동안 반응시켰다. DNS 시약을 첨가하여 반응을 정지시키고 끓는 물에서 5분 동안 방치하여 발색시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 환원당량은 galactose를 표준물질로 하여 결정된 검량곡선을 사용하여 계산하였다. 대부분 추출액은 대부분을 증류수에 20%(w/v)가 되도록 현탁하여 원심분리한 후 얻은 상등액으로 제조하여  $\alpha$ -galactosidase 가수분해 반응에 사용하였다.

## 결과 및 고찰

### *B. licheniformis* YB-42의 성장과 $\alpha$ -galactosidase 생산

*B. licheniformis* YB-42의 효소 생산성과 미생물의 성장정도와

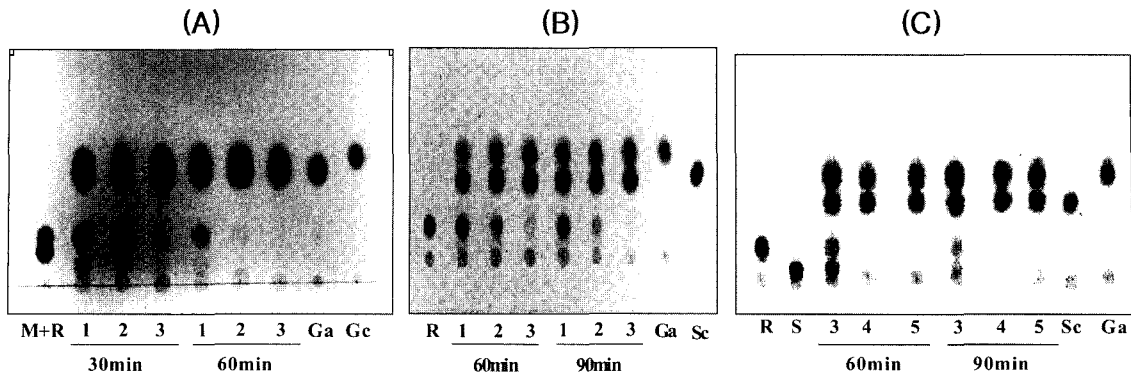


**Fig. 1.** Growth and  $\alpha$ -galactosidase production of *B. licheniformis* YB-42. *B. licheniformis* YB-42 was grown at 37°C in LB medium. The cell growth (-○-) was determined by measuring absorbance of the cell culture at wave length of 600 nm.  $\alpha$ -Galactosidase activities (-●-) were determined with the culture filtrate.

의 관계를 조사하기 위해 LB 액체배지에 배양하였으며, 이 때 균의 성장을 조사하기 위해 일정시간마다 채취한 배양액을 적당한 비율로 희석하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였고,  $\alpha$ -galactosidase의 생산성은 배양상등액에 존재하는 효소활성을 측정함으로써 결정하였다. *B. licheniformis* YB-42는 37°C에서 빠르게 성장하여 배양 10시간 만에 최대성장도를 나타냈고, 이후 배양시간에 따라 사멸함과 동시에 배양상등액에 존재하는 효소 활성이 지속적인 증가율을 보였으며 배양 45시간째에서  $\alpha$ -galactosidase의 생산성이 718 mU/ml에 이르렀다(Fig. 1). *B. licheniformis* YB-42의 균체내와 균체외에서 모두  $\alpha$ -galactosidase 활성이 존재하고 있다는 것이 이미 확인된바 있는데(13), 사멸기 이후에 배양상등액에 존재하는 효소활성이 지속적으로 증가한 것은 균체가 파괴되어 균체내 효소의 용출로 인해 배양상등액 효소활성이 증가된 것이거나 또는  $\alpha$ -galactosidase가 사멸기에 이르러 생산되기 때문으로 판단된다.

### 효소량과 반응시간에 따른 반응산물의 분석

*C. josui*(12), *Streptomyces* sp.(14)와 *Thermus* sp. T2(11)의 효소와는 달리 *B. licheniformis* YB-42의 배양상등액으로부터 부분정제된  $\alpha$ -galactosidase는  $\alpha$ -galactoside 당인 melibiose, raffinose와 stachyose를 모두 완전 가수분해 하는 것으로 확인되었다(13). 따라서 효소의 활성과 반응시간에 따른  $\alpha$ -galactoside 당의 가수분해 정도를 조사하기 위해 melibiose, raffinose, stachyose를 0.8  $\mu$ mol로 하여 각각 효소량과 반응시간을 달리하여 반응하였을 때 효소량과 반응시간이 증가될수록 가수분해도가 높았다. 반응시간과 효소량에 따른 기질간에 가수분해 효율을 TLC로 비교한 결과 Fig. 2에 나타난 바와 같이 60분간 반응하였을 때 melibiose는 20 mU, raffinose는 40 mU, stachyose는 80 mU의 효소를 사용하였을 경우 대부분의 기질이 가수분해 되었고, 또한 melibiose는 40 mU로 60분간, raffinose는 40 mU로 90분간, stachyose는



**Fig. 2.** Hydrolysis patterns of melibiose (A), raffinose (B) and stachyose (C) according to amounts of  $\alpha$ -galactosidase and reaction time. Enzymatic hydrolysis of the substrates (20 mM) was performed at 45°C with a reaction volume of 40  $\mu$ l. Reaction times were indicated at the bottom of TLC. Amounts of  $\alpha$ -galactosidase used for the reactions were as follows: lane 1, 10 mU; lane 2, 20 mU; lane 3, 40 mU; lane 4, 80 mU; lane 5, 160 mU. Authentic sugar abbreviations are as follows: M, melibiose; R, raffinose; S, stachyose; Ga, galactose; Gc, glucose; Sc, sucrose.

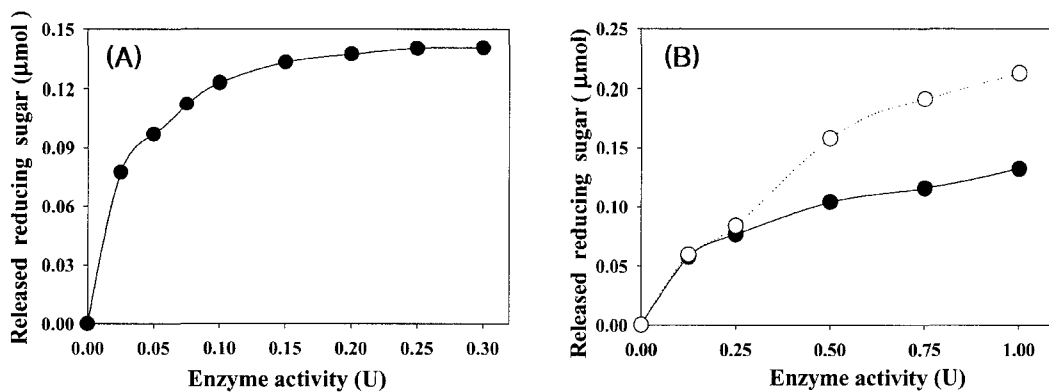
80 mU로 90분간 각각 반응시켰을 때 완전히 가수분해 되는 것으로 관찰되었다. 그러므로 *B. licheniformis* YB-42의  $\alpha$ -galactosidase에 의한 가수분해 활성은 melibiose, raffinose, stachyose 순으로 높다는 사실이 확인되었다.

$\alpha$ -Galactosidase의 기질간 가수분해 효율을 비교하기 위해 반응 중 생성된 환원당을 조사하였다. 0.15  $\mu$ mol의 melibiose, raffinose, stachyose를 기질로 하여 효소량을 달리하여 10분간 반응시킨 결과 melibiose는 0.25 U 이상의 효소를 사용하였을 때 0.14  $\mu$ mol의 환원당이 생성되어 약 93% 이상의 기질이 가수분해 되었다 (Fig. 3A). Raffinose와 stachyose는 효소량이 증가함에 따라 유리된 환원당이 계속적으로 증가하였으며, 1 U의 효소를 사용하였을 때 raffinose의 경우 0.13  $\mu$ mol의 환원당이 생성되어 88.0%의 가수분해 효율을 보였고(Fig. 3B), stachyose의 경우 0.21  $\mu$ mol의 환원당이 생성되어 70.8%의 가수분해 효율을 보였다(Fig. 3B).  $\alpha$ -Galactosidase 반응 후 생성된 환원당의 양을 기준으로 하였을 때 TLC로 분석하였을 때와 동일하게 melibiose, raffinose, stachyose 순으로 가수분해 효율이 높은 것으로 확인되었다.

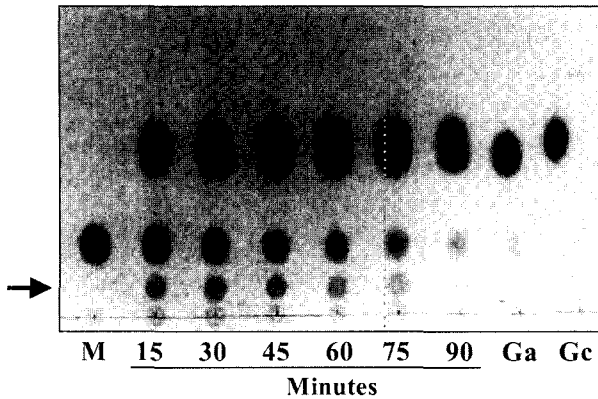
한편 다수의 glycosyl hydrolases가 기질의 가수분해 반응 중에 당 전이 활성을 보이는 것으로 알려져 있으며, *Bifidobacterium adolescentis*의  $\alpha$ -galactosidase도 당 전이 활성 갖는 것으로 보고 되었다(15). *B. licheniformis* YB-42의  $\alpha$ -galactosidase는  $\alpha$ -galactoside 당을 가수분해하는 과정에서 효소량이 적을 때 반응 초기에 기질보다 이동도가 낮은 물질이 생성되는 것으로 확인되었다. Fig. 4는 melibiose를 기질로 사용하였을 때 중간 반응산물을 TLC로 분석한 결과로 기질인 melibiose와 반응산물인 glucose, galactose 외에 melibiose보다 이동도가 낮은 물질이 생성되었으며, 반응시간이 길어질수록 기질의 양과 함께 감소되는 것으로 나타났다. 이로부터 반응 중간에 생성된 물질의 정체는 알 수 없으나,  $\alpha$ -galactosidase의 전이 활성에 의해 melibiose간의 결합이나, 반응산물과 melibiose간의 결합으로 생성된 당 중합도가 3개 이상인 물질로 추측된다.

**반응산물에 의한 가수분해 활성 저해**

pNP- $\alpha$ Gal를 기질로 하여 가수분해 활성을 조사하였을 때 *B.*



**Fig. 3.** Amounts of the reducing sugar liberated from melibiose, raffinose, and stachyose by  $\alpha$ -galactosidase. For enzymatic reaction, substrate sugars of 0.5 mM including melibiose (panel A), raffinose (closed circle of panel B) and stachyose (open circle of panel B) were used in a reaction volume of 0.3 ml, respectively. Reaction was performed for 10 min at 45°C with various amounts of  $\alpha$ -galactosidase. Amounts of the liberated reducing sugar were determined by DNS method.



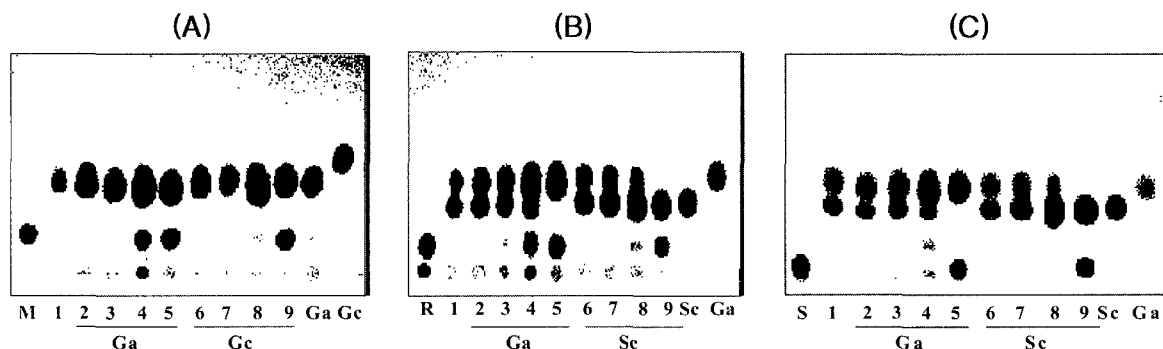
**Fig. 4.** Thin-layer chromatogram of the hydrolysis products of melibiose with low amount of  $\alpha$ -galactosidase. Reactions were done at 45°C for various times using melibiose (20 mM) as substrate with  $\alpha$ -galactosidase of 10 mU. Reaction times were indicated at the bottom of TLC. The arrow indicates unknown compound, which was transiently formed by  $\alpha$ -galactosidase. Authentic sugar abbreviations are as follows: M, melibiose; Ga, galactose; Gc, glucose.

*licheniformis* YB-42의  $\alpha$ -galactosidase는 galactose에 의해 가장 심하게 그 활성이 저해되는 것으로 보고되었다(13). 기질로 melibiose, raffinose, stachyose를 사용하였을 때 최종 반응산물에 의한 가수분해 활성의 저해도를 관찰하기 위해 최종 반응산물인 glucose, galactose, sucrose의 농도를 기질농도에 대비하여 0.5, 1.0, 5.0 배 첨가한 상태에서 반응을 수행하였다. Melibiose의 가수분해 저해도 조사를 위해서 glucose와 galactose, raffinose와 stachyose의 가수분해 저해도 조사를 위해서는 galactose와 sucrose를 각각 사용하였고 최종 반응산물을 TLC로 분석하였다. 그 결과 melibiose는 반응산물인 glucose나 galactose가 동량으로 존재하여도 대부분 가수분해 되었으나, 5배 농도로 최종반응 산물이 존재할 때는 소량의 melibiose가 가수분해 되지 않은 상태로 존재하

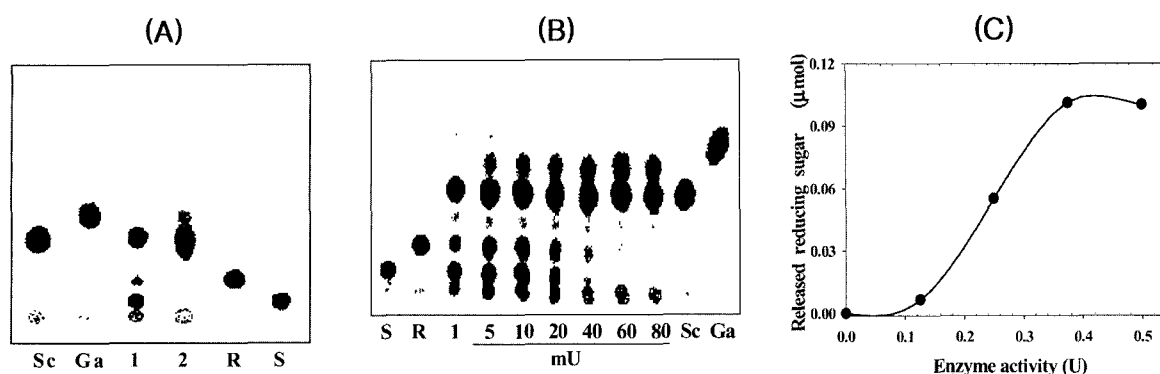
였다. 특히 glucose 보다는 galactose가 존재할 때 가수분해 되지 않고 잔존하는 melibiose의 양이 많았다(Fig. 5A). Raffinose (Fig. 5B)와 stachyose(Fig. 5C)도 반응산물인 galactose나 sucrose가 동량으로 존재하여도 대부분 가수분해 되었고, 5배 농도 존재하여도 소량만이 가수분해 되지 않은 상태로 존재하였다. 잔존한 기질의 양으로 볼 때 sucrose 보다는 galactose의 존재에 의한 raffinose와 stachyose의 가수분해 저해정도가 약간 높았다.

**대두분 추출액의 분해**

대두분에는 raffinose, stachyose등이 존재하여 이들이 대두원료의 식품이나 사료를 섭취하였을 때 고창증의 원인이 되는 것으로 알려져 있다. *B. licheniformis* YB-42의  $\alpha$ -galactosidase가 대두분에 존재하는  $\alpha$ -galactoside 당을 분해하는지 조사하기 위해 대두분 추출액을 기질로 하여 효소반응을 수행하였다. 대두분 현탁액(10%, w/v)의 상등액을 기질로 사용하여 과량의 효소를 첨가하여 동물의 체온에 가까운 37°C에서 반응을 수행한 결과 대두분에 존재하는 raffinose와 stachyose가 모두 분해된 것으로 확인되었다(Fig. 6A). 반응시간을 1 시간으로 고정하고 효소량을 달리하여 반응하였을 때 효소량이 증가할수록 대두분에 존재하는 raffinose와 stachyose의 양이 감소하였으며, 80 mU의 효소를 첨가하였을 때 이들이 대부분 가수분해 되었다(Fig. 6B). 따라서  $\alpha$ -galactosidase에 의한 대두의 raffinose와 stachyose 가수분해 활성은 대두에 존재하는 다른 성분에 의해 특별하게 저해되지 않는 것으로 추측된다. 한편 효소활성에 따른 대두분 분해산물의 환원당을 조사하기 위해 2%의 대두분 추출액을 기질로 하여 10 분간 가수분해 반응을 수행하였을 때 첨가된 효소량이 375 mU 이상에서 0.101  $\mu$ mol의 최대 환원당이 발생하는 것으로 확인되었다(Fig. 6C). 따라서 *B. licheniformis* YB-42의  $\alpha$ -galactosidase는 대두에 존재하는 난 소화성 당인 raffinose와 stachyose 등을 완전히 가수분해할 수 있으므로, 대두 가공용 효소로 식·사료 산업에 활용가치가 있다고 판단된다.



**Fig. 5.** Thin-layer chromatogram of the hydrolysis products of melibiose, raffinose and stachyose with the  $\alpha$ -galactosidase in the presence of reaction products such as glucose, galactose, and sucrose. In the presence of various concentrations of the end products such as galactose, glucose and sucrose, enzymatic hydrolysis of substrates (20 mM) including melibiose (A), raffinose (B), and stachyose (C) were done for 1h at 45°C, respectively. The end products were added to be final concentrations of 0 mM (lane 1), 10 mM (lanes 2 and 6), 20 mM (lanes 3 and 7), 100 mM (lanes 4, 5, 8 and 9), respectively. Lanes 5 and 9 are corresponding to the reaction mixture before enzymatic reaction. Added sugars were indicated at the bottom of TLC. Authentic sugar abbreviations are as follows: Gc, glucose; Sc, sucrose; Ga, galactose; M, melibiose; R, raffinose. S, stachyose.



**Fig. 6.** Hydrolysis of raffinose and stachyose in soybean meal with *B. licheniformis*  $\alpha$ -galactosidase. In panel A, reaction products of the soluble extract (10%, w/v) of soybean meal were analyzed from reaction mixtures before (lane 1) and after reaction (lane 2) for 1h at 37°C with 120 mU  $\alpha$ -galactosidase. Panel B indicates the hydrolysis patterns of soluble extract (10%, w/v) of soybean meal according to enzyme amounts. Amounts of enzymes were indicated at the bottom of TLC. In panel C, the soluble extract (2%, w/v) of soybean meal was used as substrate for hydrolysis reaction by  $\alpha$ -galactosidase. The reaction was performed for 10 min at 45°C with various amounts of the enzyme. The reducing sugars liberated from the soluble extract were quantificated by DNS method. Authentic sugar abbreviations are as follows: Sc, sucrose; Ga, galactose; R, raffinose; S, stachyose.

### 참고문헌

- Boucher, I., C. Vadeboncoeur, and S. Moineau. 2003. Characterization of genes involved in the metabolism of  $\alpha$ -galactosidases by *Lactococcus raffinolactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4049-4056.
- 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  $\alpha$ -galactosidase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53, 661-667.
- Coombs, J. and J.E. Brenchley. 2001. Characterization of two new glycosyl hydrolases from the lactic acid bacterium *Carnobacterium piscicola* strain BA. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5094-5099.
- 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  $\alpha$ -galactosidase genes and a single  $\beta$ -galactosidase gene from *Aspergillus niger*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2453-2460.
- Dey, P.M. and E.D. Campillo. 1984.  $\alpha$ -Galactosidase. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 56, 141-249.
- Dey, P.M., S. Patel, and M.D. Brownleader. 1993. Induction of  $\alpha$ -galactosidase in *Penicillium ochrochloron* by guar (*Cyamopsis tetragonoloba*) gum. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 17, 361-371.
- Ganter, C., A. Bock, P. Buckel, and R. Mattes. 1988. Production of thermostable recombinant  $\alpha$ -galactosidase suitable for raffinose elimination from sugar beet syrup. *J. Biotechnol.* 8, 301-310.
- Giuseppin, M.L., J.W. Almkerk, J.C. Heistek, and C.T. Verrips. 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.
- Halstead, J.R., M.P. Fransen, R.Y. Eberhart, A.J. Park, H.J. Gilbert, and G.P. Hazlewood. 2000.  $\alpha$ -Galactosidase a from *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa*: cloning, high level expression and its role in galactomannan hydrolysis. *FEMS Microbiol. Lett.* 192, 197-203.
- Irish, G.G., G.W. Barbour, H.L. Classen, R.T. Tyler, and M.R. Bedford. 1995. Removal of the  $\alpha$ -galactosides of sucrose from soybean meal using either ethanol extraction or exogenous alpha-galactosidase and broiler performance. *Poult. Sci.* 74, 1484-1494.
- 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  $\alpha$ -galactosidase expressed in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1601-1606.
- Jindou, S., K. Shuichi, F. Emi, F. Tsuchiyoshi, H. Hidenori, K. Tet-suya, S. Kazuo, and O. Kunio. 2002.  $\alpha$ -Galactosidase Aga27A, an enzymatic component of the *Clostridium josui* cellulosome. *J. Bacteriol.* 184, 600-604.
- Kim, H.-S., K.-S. Lee, J.-H. So, M.-S. Lee, J.-H. Choi, and K.-H. Yoon. 2004. Characterization of extracellular  $\alpha$ -galactosidase produced by *Bacillus licheniformis* YB-42. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 32, 128-134.
- Kim, S.-Y., K.H. Cho, C.-J. Kim, D.-J. Park, and K.-H. Yoon. 2003. Characterization of extracellular  $\alpha$ -galactosidase produced by *Streptomyces* sp. YB-4. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 30, 332-338.
- Leader, S., W. Hartmeier, and S.P. Mark. 1999.  $\alpha$ -Galactosidase of *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083. *Curr. Microbiol.* 38, 101-106.
- Lee, K.-S., C.-J. Kim, and K.-H. Yoon. 2003. Characterization of the  $\alpha$ -galactosidase produced by *Streptomyces* sp. YB-10. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 31, 151-156.
- Linden, J.C. 1982. Immobilized  $\alpha$ -galactosidase in the sugar beet industry. *Enzyme Microb. Technol.* 4, 130-136.
- Rackis, J.J. 1981. Flatulence caused by soya and its control through processing. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 58, 503-510.
- Silvestroni, A., C. Connes, F. Sesma, G.S. de Giori, and J.-C. Piard. 2002. Characterization of the *mela* locus for  $\alpha$ -galactosidase in *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5464-5471.
- 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.

21. Zeilinger, S., D. Kristufek, I. Arisan-Atac, 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 August 18, 2004/Accepted September 21, 2004)

---

**ABSTRACT : Hydrolysis Activity of  $\alpha$ -Galactosidase from *Bacillus licheniformis***

**Hyun Suk Kim<sup>1</sup>, Kyung-Seob Lee<sup>1</sup>, Jae Ho So<sup>1</sup>, and Ki-Hong Yoon<sup>1,2\*</sup>** (<sup>1</sup>School of Applied Food and Nutritional Science, <sup>2</sup>Bioresouce and Application Research Center, Woosong University, 17-2, Jayang-dong, Dong-gu, Daejeon 300-718, Korea)

The maximum productivity of  $\alpha$ -galactosidase, capable of hydrolyzing completely  $\alpha$ -D-1,6-galactopyranosyl linkages within oligomeric substrates such as melibiose, raffinose and stachyose to liberate galactose residue, was reached to 718 mU/ml in the culture filtrate of *Bacillus licheniformis* at death phase. The  $\alpha$ -galactosidase was identified to show different efficiencies for hydrolyzing the  $\alpha$ -galactooligosaccharides according to analysis of reaction products by both TLC and quantification of the liberated reducing sugars. The enzyme was active on  $\alpha$ -galactooligosaccharides in the order of melibiose, raffinose, and stachyose. Though the hydrolyzing activity of enzyme was faintly inhibited by reaction products such as galactose, glucose and sucrose with amounts of five folds more than the added substrates (20 mM), the largest inhibition of enzyme activity was caused by galactose among the end products. Unknown compound, which migrated slower than melibiose on TLC, was detected during hydrolysis reaction of melibiose, suggesting that the  $\alpha$ -galactosidase has a glycosyl transferase activity. In addition, the enzyme was able to hydrolyze efficiently raffinose and stachyose existed in the soluble extract of soybean meal.