

α -Galactosidase를 생산하는 고온성 *Bacillus coagulans* KM-1 균주의 생화학적 특성

남기호* · 장미순 · 박희연 · 이레나 코네바¹

국립수산과학원 식품안전과, ¹태평양수산연구소 틴로센터

Biochemical Characterization of α -Galactosidase-Producing Thermophilic *Bacillus coagulans* KM-1

Ki Ho Nam*, Mi Soon Jang, Hee Yeon Park and Elena Koneva¹

Food and safety Research Division, National Fisheries Research and Development Institute, Busan 619-705, Korea

¹TINRO Centre, Pacific Scientific Research Fisheries Centre, Shevchenko Alley, Vladivostok 690091, Russia

A bacterium producing α -galactosidase (α -D-galactoside galactohydrolase, EC 3.2.1.22) was isolated. The isolate, KM-1 was identified as *Bacillus coagulans* based on its 16S rRNA sequence, morphology, and biochemical properties. α -Galactosidase activity was detected the culture supernatant of *B. coagulans* KM-1. The bacterium showed the maximum activity for hydrolyzing *para*-nitrophenyl- α -D-galactopyranoside (*pNP*- α Gal) at pH 6.0 and 50°C. It hydrolyzed oligomeric substrates such as melibiose, raffinose, and stachyose liberating a galactose residue, indicating that the *B. coagulans* KM-1 α -galactosidase hydrolyzed α -1,6 linkage. The results suggest that the decreased stachyose and raffinose contents in fermented soybean meal are due to the α -galactosidase activity.

Key words: *Bacillus coagulans* KM-1, α -galactosidase, Stachyose, Raffinose, Fermented soybean meal

서론

사료의 주성분인 어분(fish meal)의 생산량은 어족자원의 감소로 인하여 정체 또는 감소하는 추세에 있어 어분의 수급불안정에 따른 어류양식업의 채산성악화가 문제점으로 대두되고 있다. 따라서 일부 어류양식업체에서는 어류의 사료를 제조함에 있어서 단백질 함량이 높고 수급이 비교적 안정적인 탈지대두박을 어분 대체소재로 많이 사용되고 있다(Kim et al., 2013). 그러나 대두박의 탄수화물의 경우, 단당류가 거의 없으며 올리고당은 sucrose, maltose, raffinose, stachyose 등으로 구성되어 있고 다당류에는 arabinan 등으로 구성되어 있다. 특히 stachyose와 raffinose는 α -galactosyl 결합으로 이루어져 있어 소화기관내에 α -galactosidase (α -D-galactoside galactohydrolase, EC 3,2,1,22) 효소를 갖지 않은 인간과 단위동물에게 있어서 raffinose와 stachyose는 소화되지 않은 채 대장에 도달하고, 대장 내의 혐기성 세균에 의해 메탄, 이산화탄소 그리고 수소가스가 생성되어 고창증의 원인(Rackis, 1981)이나 복

부 팽만감의 원인(Reddy et al., 1980; Steggerda et al., 1968)이 될 수 있다. 또한 분뇨 내 질소 배출량 증가 및 악취가 발생할 수 있고 어류의 성장을 억제하거나 질병을 유발시키는 것으로 알려져 있다(Yoo et al., 2007). 이러한 항영양인자의 영향으로 소화가 잘 되지 않아 어류용 사료제조에 사용이 제한되고 있다(Li et al., 1991). 따라서 사료생산 과정에서 이들을 분해할 수 있는 효소인 α -galactosidase에 대한 연구가(Min et al., 2002; Kim and Yoon, 1998; Choi et al., 1998; Kim et al., 2004; Irish et al., 1995) 활발히 진행되고 있으며 미생물로부터 생산되는 α -galactosidase 특성에 관한 연구(park., 2011; Kim et al., 2002; Kum and Yoon., 1998; Choi et al., 1998)도 다양하게 이루어지고 있으나 아직까지 고온성 미생물을 활용한 발효 대두박 제조에 대한 연구는 부족한 실정이다. 또한 stachyose와 raffinose 같은 항영양인자를 분해할 수 있는 고온성 미생물을 탐색하고 이에 대한 활용방안 연구가 필요한 실정이다.

한편, α -galactosidase는 식품, 미생물, 동물에 널리 분포되어 있으며, galactose 잔기를 함유한 galactomannan 다당류나

<http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2014.0516>



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Kor J Fish Aquat Sci 47(5) 516-521, October 2014

Received 22 September 2014; Revised 20 October 2014; Accepted 29 October 2014

*Corresponding author: Tel: +82. 51. 720. 2652 Fax: +82. 51. 720. 2669

E-mail address: dennis011@korea.kr

melibiose, raffinose, stachyose 등의 저당류 또는 galactomanan에서 α -1,6 결합의 α -galactose 잔기를 가수분해하는 것으로 알려져 있다(Dey and Campillo, 1984). 이에 본 연구에서는 멸치(*Engraulis japonica*)로부터 α -galactosidase를 생산하는 고온성 신규 미생물을 확보하여 생화학적 특성을 규명하고 산업적으로 품질이 우수한 발효 대두박 제조에 활용하고자 한다.

재료 및 방법

배지 및 시약

미생물 분리를 위하여 Nutrient broth (NB, Difco, St. Louis, MO, USA)와 Nutrient Agar (NA, Difco)를 사용하였고 계대 배양에는 NA를 사용하였다. 균주의 보존을 위하여 균배양액에 glycerol이 15% (V/V)가 되도록 하여 -75°C 심온동결고(IIshin DF8514I, Seoul, Korea)에 보관하면서 사용하였다.

균주의 분리

기장균 연안에서 어획한 생멸치(raw anchovy, *Engraulis Japonica*) 10 g을 내장을 제거하지 않고 멸균수 40 mL와 함께 균질기로 파쇄하여 5분간 방치한 뒤 상층액 10 mL를 취하여 100 mL의 NB에 5 mL를 접종한 후 50°C, 100 rpm의 진탕배양기 (VISION SCI., VS-8480SR, Daejeon, Korea)에서 24시간 동안 배양하였다. 배양액 1 mL을 NA에 도말하여 50°C incubator에서 배양하면서 발생하는 독립적인 colony를 분리하여 실험에 사용하였다.

α -galactosidase의 활성 측정

위에서 분리한 미생물 배양액 각각 1 mL를 채취하여 12,000×g에서 15분 동안 원심분리하고 맑은 상층액을 취하여 α -galactosidase의 활성을 측정을 하였다. α -galactosidase 활성의 측정은 기질인 p-nitrophenyl- α -D-galactopyranoside (pNP α Gal)를 사용하여 실시하였다(Food Research International, 2009). 즉, 700 μ L의 100 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5)에 100 μ L의 배양액과 200 μ L의 9.9 mM pNP α Gal을 혼합하여 5분간 50°C에서 반응시킨 후, 2 mL의 0.2 M borate buffer (pH 9.8)를 첨가하여 반응을 중지시키고 405 nm에서 흡광도를 측정하여 α -galactosidase 활성 정도를 측정하여 활성이 높은 균주를 선발하였다.

미생물 균주의 최적 발육조건 분석

분리된 미생물 균주의 최적 발육온도를 측정하기 위하여 30-70°C의 온도범위에서 각각 12시간 동안 배양한 후 균체의 농도를 660 nm (Hitachi U-2900, Tokyo, Japan)에서 흡광도로 측정하였으며 최적 pH를 알아보기 위해 NB의 pH를 4.0-8.0으로 각각 조정하여 50°C에서 12시간 동안 배양한 후 균체의 농도를 역시 660 nm에서 흡광도로 측정하였다.

주사전자현미경을 이용한 균주의 관찰

미생물 균주의 외형 및 크기의 측정은 Scanning Electron Microscopy (SEM, S-2400, Hitachi, JAPAN)을 이용하였다. SEM 측정을 위하여 고체배지 위에 세포를 고정시키고 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.2-7.4)로 제조한 2.5% glutaraldehyde (TAAB Laboratories Equipment Ltd, Berks, UK) 용액으로 3시간 고정시킨 후 0.1 M sodium phosphate buffer로 2회 세척한 다음 1% osmium tetroxide (Sigma, St Louis, MO, USA) 용액으로 30분간 최종 고정하였다. 그 다음 50-100% 농도 구배 알코올로 각각 단계적으로 5분씩 탈수시킨 후 100% hexamethyldisilazane로 완전히 탈수하고 건조하였다. 전처리된 샘플은 SEM으로 20 kV의 가속전압에서 7500배율로 관찰하였다.

미생물 균주의 생화학적 특성 조사

분리한 미생물 균주의 생화학적 특성 검사를 위해서 API-ZYM (BioMérieux, France)를 사용하여 19종의 효소활성을 조사하였으며 α -galactosidase 활성이 높게 나타난 균주를 대상으로 API-50CH (BioMérieux, France)을 사용하여 탄소원의 이용패턴을 조사하였다.

16S rRNA 유전자 염기서열과 계통수(phylogenetic tree) 분석

미생물 균주의 동정은 16S rDNA 염기서열의 상동성을 분석하여 수행되었다. 즉, 16S rDNA 염기서열을 결정하기 위해 일반적인 방법에 따라 정제된 DNA를 주형으로 하여 PCR로 증폭하였다. 증폭된 DNA 단편을 Big Dye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, USA)로 정제한 다음, DNA sequencer (Applied Biosystems model 3730XL, USA)를 이용하여 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열을 Ez-Taxon server 2.1을 이용하여 상동성을 분석하였다. 계통수는 NCBI의 BLASTN 결과 상위 50개를 사용하여 EMBL-EBI에서 제공하는 ClustalW2의 Neighbor Joining (Saitou and Nei, 1987) 방법을 통해 phylogenetic tree를 작성하였다.

난소화성 탄수화물 분해능 측정

미생물 균주가 난소화성 탄수화물을 분해하는지 알아보기 위해서(Scalabrini et al., 1998) stachyose와 raffinose를 각각 10 g/L씩 첨가한 NB에 미생물 배양액을 5% (w/v)씩 각각 접종하여 50°C 항온수조에서 48시간동안 배양하였다. 배양액 1 mL을 12,000×g에서 15분간 원심분리하여 얻은 상층액 250 μ L에 아세트니트릴 750 μ L 첨가하여 같은 조건에서 다시 원심분리하여 침전물을 제거하고 맑은 상층액을 0.2 μ m 막 여과기 (membrane filter)로 여과한 것을 최종 분석시료로 사용하였다. Stachyose와 raffinose의 정량은 APS-2 hypersil column (thermo scientific; 250×4.6 mm, 5 μ m, 120A)이 장착된 고속

액체크로마토그래피를 이용하여(column 온도, 40°C; 이동상, 75% ACN; 유속, 1.5 mL/min) 분석하였다. 검출기는 RI 검출기(refractive index detector, Dionex)를 사용하였다.

미생물 균주가 생산하는 α -galactosidase의 최적 반응 온도 측정

미생물 균주가 생산하는 α -galactosidase의 최적 반응 온도를 알아보기 위하여 미생물 균주를 50°C에서의 48시간 진탕배양한 다음 8,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 균체와 배양액을 분리하였다. 배양액은 ammonium sulfate를 35-85%로 포화되게 첨가하고 4°C에서 12시간 동안 방치하였다. 침전된 단백질은 13,000×g에서 20분간 원심분리하여 50 mM Tris-HCl (pH 7.0)에 용해시킨 후 동일 완충액으로 4°C에서 12시간 동안 투석하여 조효소액을 획득하였다. α -galactosidase 활성측정은 기질로 p-nitrophenyl- α -D-galactopyranoside (pNP α Gal)를 사용하여 실시하였다(Sigma, St. Louis, MO, USA). 700 μ L의 100 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5)에 200 μ L의 9.9 mM pNP α Gal과 100 μ L의 조효소액을 혼합하여 5분간 30-70°C 범위에서 각각 반응시킨 후, 2 mL의 200 mM borate buffer (pH 9.8)를 첨가하여 반응을 중지시키고 405 nm에서 흡광도를 측정하여 α -galactosidase 활성을 측정하였다. 효소활성 1 unit는 1분에 1 μ mol의 p-nitrophenol이 효소에 의해 생성되는 양으로 나타내었으며, 활성도(specific activity)는 단백질 1 mg당 효소 1 unit로 나타내었다.

결과 및 고찰

미생물 균주의 분리 및 α -galactosidase 활성

NA 및 NB 배지를 이용하여 가장일대에서 서식하는 멸치로부터 고온에서 독립적인 colony를 나타내는 20개의 미생물 균주를 분리하였고 α -galactosidase 활성을 알아보기 위하여 효소액에 대한 기질의 분해도를 측정하였다. 그 결과(Table 1) KM-1이 0.482 Unit/mL로 19개의 다른 미생물 보다 활성이 가장 높게 나타났으며 이는 사료제조에 있어 항영양인자인 stachyose와 raffinose를 분해시켜 어류의 사료 섭취시 소화력을 더욱 높여 줄 것이라 판단된다.

배양시간에 따른 KM-1 균주의 발육조건

α -galactosidase 활성이 가장 높은 KM-1 균주의 최적 발육조건을 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. 온도는 45-55°C의 범위에서 잘 자랐으며 최적발육온도는 50°C인 것으로 나타났다. pH의 경우, pH 5.5-7.0의 범위에서 잘 자랐으며 최적 발육 pH는 6.0인 것으로 나타났다. 이는 시료에 따라 약간의 차이를 나타내고 있는데 pH변화에 따른 콩, 메주, 된장의 α -galactosidase의 활성(Kim and Yoon, 1998)연구에서는 pH 7.0-7.5에서 가장 활성이 높아 본 연구결과와 약간의 차이를 보였다.

주사전자현미경을 이용한 균주의 관찰

Table 1. α -galactosidase activity of microorganisms isolated from raw anchovy

Isolate	Activity (U/mL)	Isolate	Activity (U/mL)
KM-1	0.482	KM-11	0.154
KM-2	0.230	KM-12	0.161
KM-3	0.128	KM-13	0.143
KM-4	0.153	KM-14	0.112
KM-5	0.133	KM-15	0.113
KM-6	0.112	KM-16	0.135
KM-7	0.154	KM-17	0.164
KM-8	0.151	KM-18	0.160
KM-9	0.152	KM-19	0.135
KM-10	0.132	KM-20	0.157

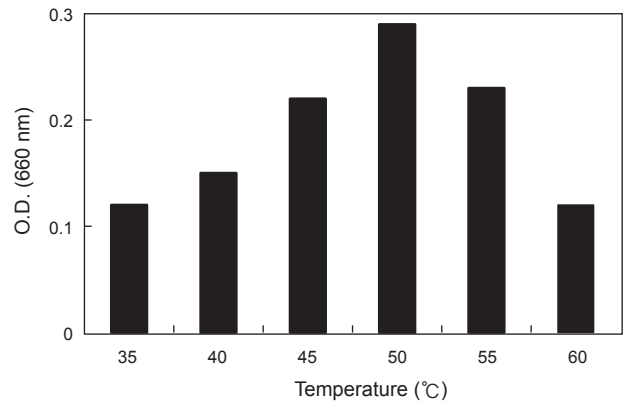


Fig. 1. Effect of temperature on growth of *Bacillus coagulans* KM-1 after 12 hours cultivation.

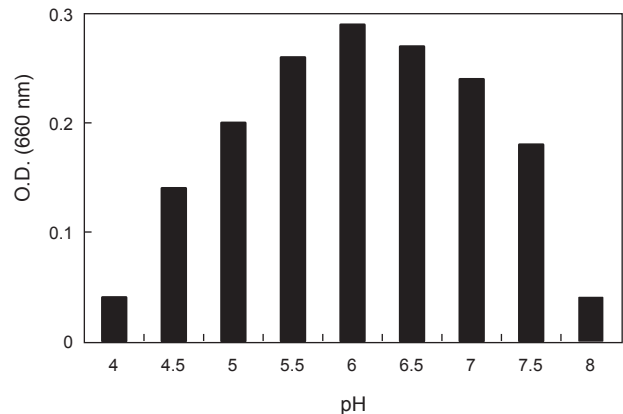


Fig. 2. Effect of pH on growth of *Bacillus coagulans* KM-1 after 12 hours cultivation.

멸치로부터 분리한 20종의 미생물 중 α -galactosidase 활성이 가장 높게 나타난 KM-1 균주에 대한 형태학적 특성을 분석하기 위해 KM-1 균주를 최적 조건에서 배양하여 그람염색(Gram staining)과 포자염색(Spore staining)을 실시한 결과, 포자를 형성하는 그람양성균으로 나타났으며 KM-1 균주를 전자현미경으로 관찰한 결과(Fig. 3) 세균의 지름과 길이는 각각 0.5-0.7 μ m, 3.3-4.4 μ m로 길이가 지름의 2배 이상 되는 장간균(long rod)인 것으로 관찰되었다. 또한 카탈라제(catalase) 실험결과 양성반응을 보여 바실러스속(*Bacillus* sp.)의 형태적 특징과 일치하였다.

API-ZYM과 API-50CHL Kit를 이용한 균주의 특성

KM-1 균주의 생화학적 특성 분석하기 위해 API-ZYM (BioMérieux, France)를 사용하여 19종의 효소활성을 조사한 결과(Table 2) KM-1 균주는 alkaline phosphatase, esterase (C4), esterase lipase (C8), leucine arylamidase, cystine arylamidase, phosphatase acid, naphthol-ASBI-phosphohydrolase, α -galactosidase, β -galactosidase 및 α -glucosidase에 대한 양성반응을 나타내었다. 또한 API-50CH (BioMérieux, France)을 사용하여 50종의 탄소원 이용패턴을 조사하였는데 (Table 3) glycerol, ribose, D-xylose, galactose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, N-acetyl glucosamine, maltose, melibiose, trehalose, starch, D-arabitol 및 5-keto-gluconate를 이용하는 것으로 나타났다.

16S rRNA 유전자 염기서열 분석과 계통수(phylogenetic tree)

α -galactosidase 활성이 높은 KM-1 균주의 16S rDNA의 염기서열을 분석한 결과 *B. coagulans* 99.797% (3/1478), *B. acidiproducens* 97.171% (40/1414), *B. shackletonii* 95.831%

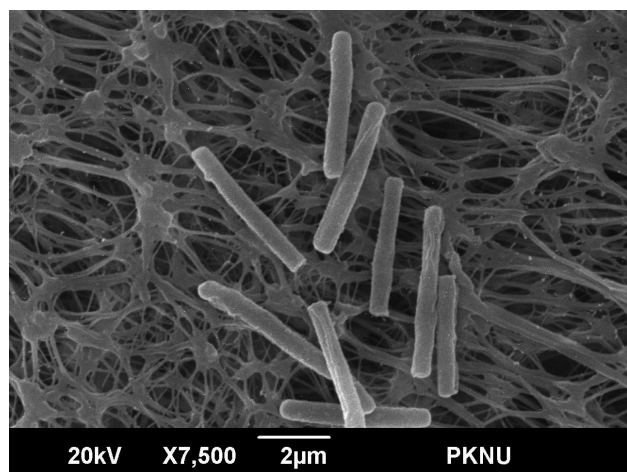


Fig. 3. Scanning electron microscopy image of *Bacillus coagulans* KM-1 ($\times 7,500$).

Table 2. Enzyme activities of *Bacillus coagulans* KM-1 by API-ZYM kit

Enzyme	Activity	Enzyme	Activity
Control	-	Phosphatase acid	+
Phosphatase alkaline	+	Naphthol-ASBI-phosphohydrolase	+
Esterase (C4)	+	α -galactosidase	+
Esterase lipase (C8)	+	β -galactosidase	+
Lipase (C14)	-	β -glucuronidase	-
Leucine arylamidase	+	α -glucosidase	+
Valine arylamidase	-	β -glucosidase	-
Cystine arylamidase	+	N-acetyl- β -glucosaminidase	-
Trypsin	-	α -mannosidase	-
α -chymotrypsin	-	α -fucosidase	-

+, positive; -, negative.

Table 3. Carbohydrate utilization pattern of *Bacillus coagulans* KM-1 by API-50CH kit

Carbohydrate	Activity	Carbohydrate	Activity
Control	-	Esculin	-
Glycerol	+	Salicin	-
Erythritol	-	Celobiose	-
D-arabinose	-	Maltose	+
L-arabinose	-	Lactose	-
Ribose	+	Melibiose	+
D-xylose	+	Sucrose	-
L-xylose	-	Trehalose	+
Adonitol	-	Inulin	-
β -methyl-D-xyloside	-	Melezitose	-
Galactose	+	D-raffinose	-
D-glucose	+	Starch	+
D-fructose	+	Glycogen	-
D-mannose	+	Xylitol	-
L-sorbose	-	β -gentiobiose	-
Rhamnose	-	D-turanose	-
Dulcitol	-	D-lyxose	-
Inositol	-	D-tagatose	-
Manitol	-	L-fucose	-
Sorbitol	-	D-arabitol	+
α -methyl-D-manoside	-	L-arabitol	-
α -methyl-D-glucoside	-	Gluconate	-
N-acetyl glucosamine	+	2-keto-gluconate	-
Amygdalin	-	5-keto-gluconate	+
Arbutin	-		

+, positive; -, negative.

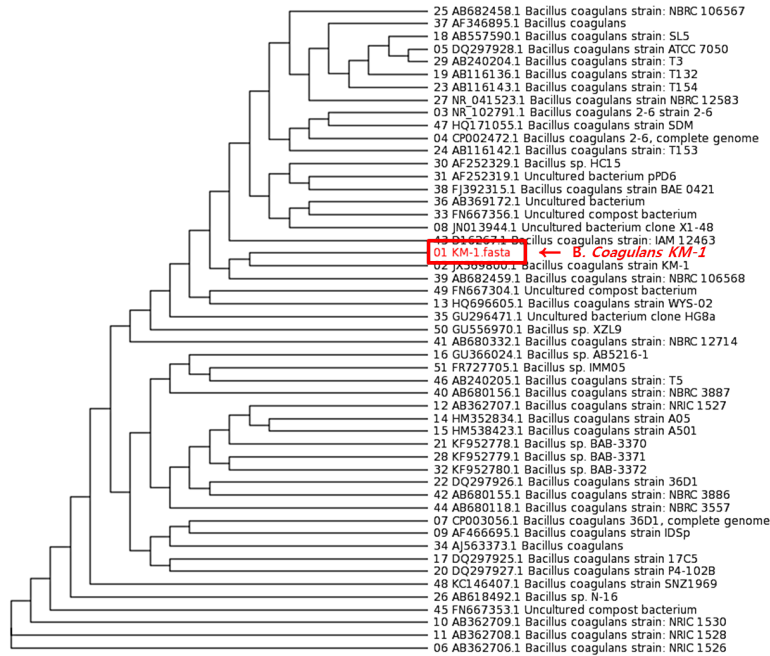


Fig. 4. Phylogenetic tree of *Bacillus coagulans* KM-1 based on 16S rDNA sequencing.

Table 4. Non-digestible carbohydrate resolution of *Bacillus coagulans* KM-1

Carbohydrate	Fermentation time (h)		
	0	24	48
Raffinose	0.75*	0.56	0.39
Stachyose	0.49	0.25	0.16
Saccharose	0	0.23	0.42
galactose	0	0.33	0.49

*mg/100 g

(62/1487)인 것으로 나타났다. 따라서 신규로 분리한 KM-1 균주를 *B. coagulans* KM-1로 명명하고(Fig. 4) 그 유전자를 미국 국립생물정보센터(NCBI)에 등록(JX569800, 2012. 9. 4)하였으며 균주를 한국미생물종보존센터(KCCM 112989P, 2012. 9. 6)에 기탁하였다.

난소화성 탄수화물 분해능

B. coagulans KM-1에 의한 난소화성 탄수화물 분해시험 결과(Table 4) 발효 stachyose와 raffinose의 함량이 각각 0.49 mg/100 g, 0.75 mg/100 g이었으나 24시간 발효 후 각각 0.25 mg/100 g, 0.56 mg/100 g, 48시간 후에는 각각 0.16 mg/100 g, 0.39 mg/100 g로 지속적으로 감소하는 결과를 나타내었다. Stachyose와 raffinose의 감소와는 상대적으로 saccharose와 galactose의 함량이 증가하는 것으로 볼 때 *B. coagulans* KM-1이 생산하는 α -galactosidase에 의해 난소화성 탄수화물인

stachyose와 raffinose가 잘 분해된다는 것을 알 수 있었다. Kim and Yoon (1998)은 대두의 발효에 따른 α -galactosidase 활성에 관한 연구에서 발효가 진행됨에 따라 stachyose와 raffinose 함량이 각각 감소하는 현상을 보였으며 이는 미생물이 분해하는 α -galactosidase에 의한 것이라고 보고한 바 있으며 본 연구결과도 이와 유사함을 알 수 있었다.

미생물 균주가 생산하는 α -galactosidase의 최적 반응 온도

B. coagulans KM-1이 생산하는 α -galactosidase의 반응 온도별 효소활성을 Fig. 5에 나타내었다. *B. coagulans* KM-1이

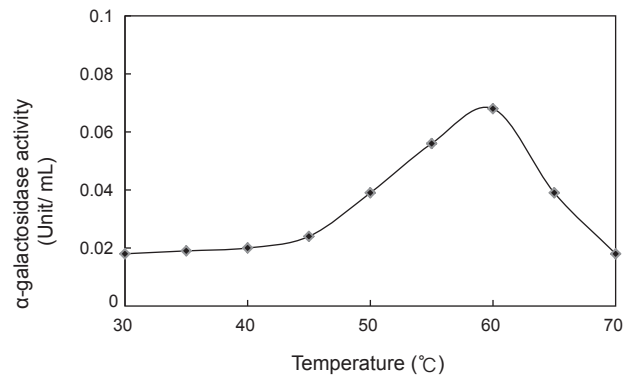


Fig. 5. Effect of temperature on α -galactosidase activity of *Bacillus coagulans* KM-1.

생산하는 α -galactosidase의 활성은 55°C-65°C의 범위에서 높은 활성을 보였으며 60°C에서 가장 높게 나타나 B. coagulans KM-1의 최적 발육온도인 50°C와는 차이를 보였다. 따라서 분리된 B. coagulans KM-1으로 난소화성 탄수화물 효율적으로 분해제거하기 위해서는 먼저 50°C에서 충분히 미생물을 발육시킨 다음 60°C에서 효소반응을 유도하여야 할 것으로 판단된다. 일반적으로 저온 및 중온발효는 잡곡의 번식을 방지하기 위해 살균과정을 따로 실시하고 있으나 고온발효는 고온에서 발효가 이루어지기 때문에 살균과정을 따로 하지 않아도 부패성 미생물의 발육이 억제된 상태에서 신속히 발효를 할 수 있다는 장점이 있다(Jang et al., 2013).

사 사

본 연구는 국립수산과학원(젓갈의 속성제조 및 저염화 기술 개발, RP-2014-FS-020)의 지원에 의해 운영되었습니다.

References

- Coombs J and Brenchley. 2001. Characterization of two new glycosyl hydrolases from the lactic acid bacterium Carnobacterium piscicola strain BA. Appl Environ Microbiol 67, 5094-5099.
- Choi C, Choi KS, Lee SH, Hong SP, Lee HD and Bae DK. 1998. Characteristics and action pattern of α -galactosidase from *Scopulariopsis brevicaulis* in Korean traditional Meju. ACB 41, 489-495.
- Dey PM and Campillo ED. 1984. Biochemistry of the multiple forms of glycosidases in plants. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol 56, 141-249.
- Halstead JR, Franssen MP, Eberhart RY, Park AJ, Gilbert HJ and Hazlewood GP. 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.
- Irish GG, Barbour GW, Classen HL, Tyler RT and Bedford MR. 1995. Removal of the α -galactosidase of sucrose from soybean meal using either ethanol extraction or exogenous alpha-galactosidase and broiler performance. Poult Sci 74, 1484-1494.
- Jang MS, Park HY, Nam KH, Han HS, Kim KW, Kim KD and Lee BJ. 2013. Effect of extruded pellets containing fermented soybean meal as a partial substitute for fish meal on growth performance and muscle quality of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). J Agric Life Sci 47, 203-215.
- Jindou S, Shuichi K, Emi F, Tsuchiyoshi F, Hidenori H, Tetsuya K, Kazuo S and Kunio O. 2002. α -galactosidase Agar27A, an enzymatic component of the *Clostridium josui* cellulosome. J Bacteriol 184, 600-604.
- Kim KW, Kim KD, Lee BJ, Lee JH, Han HS, Koo JW, Choi YH and Bai SC. 2013. Dietary fermented soybean meal as a replacement for fish meal in juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus*. Kor J Fish Aquat Sci 46, 769-776.
- Kim HS, Lee KS, Jae HS, Lee MS, Choi JH and Yoon KH. 2004. Characterization of extracellular α -galactosidase produced by *Bicillus licheniformis* YB-42. Kor J Microbiol Biotechnol 32, 128-134.
- Kim JS and Yoon S. 1998. The Changes of α -galactosidase activities and stachyose and raffinose contents during fermentation of soybeans. Korea J Soc Food Sci 14, 509-512.
- Li DF, Nelssen JL, Reddy PG, Blecha F, Klemm RD, Giesting DW, Hancock JD, Allee GL and Goodband RD. 1991. Transient hypersensitivity to soybean meal in the early-weaned pig. J Anim Sci 68, 1790-1799.
- Min BJ, Kim HI, Hong JW, Moon TH, Lee JH, Han YK, Kwon OS, Lee SH and Lee WB. 2002. Influence of dietary carbohydrase on egg quality and nutrient digestibility in laying hens. Korea J Poult Sci 29, 19-23.
- Rackis JJ. 1981. Flatulence caused by soya and its control through processing. J Am Oil Chem Soc 58, 503-510.
- Reddy NR, Salunkhe DK and Aharma RP. 1980. Flatulence in rats following ingestion of cooked and germinated black and a fermented product of black gram and rice blend. J Food Sci 45, 1161.
- Silvestroni A, Connes C, Sesma F, Giori GS and Piard JC. 2002. Characterization of the mel locus for α -galactosidase in *Lactobacillus plantarum*. Appl Environ Microbiol 68, 5464-5471.
- Scalabrini, Rossi P, Spettoli M, Matteuzzi P. 1998. Characterization of Bifidobacterium strains for use in soymilk fermentation. Int J food microbiol 39, 213-219.
- Saitou N and Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol 4, 406-425.
- Steggerda FR, Richards EA and Rackis JJ. 1968. Effects of various soybean products on flatulence in the adult man. Proc Soc Exp Biol Med 121, 1235.
- Sanada CTN, Karp SG, Spier MR, Portella AC, Gouvea PM, Yamaguishi CT, Vandenberghe LPS, Pandey A and Soccol CR. 2009. Utilization of soybean vinasse for α -galactosidase production. Food Res Int 42, 476-483. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2009.01.017>.
- Yoo JS, Cho JH, Chen YG, Kim HJ, Wang Q, Hyun Y, Ko TG, Park CS and Kim IH. 2007. The Effects of environment-friendly diets on the growth performance, nutrient digestibility, fecal excretion, nitrogen excretion and emission gases in manure for growing pigs. J Anim Sci Technol 49, 491-500.