

Aspergillus niger ATCC 16513과 대두(*Glycine max.* L) α -galactosidase의 kinetic 성질

김종화*·이종수**·신철승***
*대전보건전문대학 식품영양과
**배재대학교 이공대학 유전공학과
***충남대학교 대학원 식품공학과

Kinetic Properties of α -Galactosidase from *Aspergillus niger* ATCC 16513 and Soybean(*Glycine max.* L)

Jong-Hwa Keum*, Jong-Soo Lee** and Chul-Seung Shin***

*Dept. of Food and Nutrition, Taejon Medical Junior College
** Dept. of Genetic Engineering, Pai Chai University
*** Dept. of Food Engineering, Chungnam Natl. University,
Graduate School

This experiment was carried out to elucidate some kinetic properties of the α -galactosidase which produced and purified from *Aspergillus niger* ATCC 16513 and soybean(*Glycine max.* L).

The Km value of *Asp. niger* and soybean α -galactosidase were 37.0mM and 50.0mM for raffinose, and 55.5mM and 55.5mM for stachyose, respectively. The activity of *Asp. niger* and soybean α -galactosidase were inhibited by galactose. Among the amino acids in active sites of both *Asp. niger* and soybean α -galactosidase, histidine was identified by chemical modification of diethyl pyrocarbonate.

Number of amino acids residues per mole of *Asp. niger* and soybean α -galactosidase were 902 and 286, respectively.

Aspergillus niger ATCC 16513과 대두(*Glycine max.* L)의 정제 α -galactosidase를 사용 하여 몇가지 이들의 kinetic 성질을 조사 하였다. *Asp. niger* α -galactosidase의 raffinose와 stachyose에 대한 Km값은 각각 37.0mM과 55.5mM, 대두 α -galactosidase는 50.0mM과 55.5mM로서 PNPG보다 이들에 대한 친화성이 적었다. 또한 galactose는 *Asp. niger*와 대두 α -galactosidase 모두의 활성을 저해 하였으나 2-mercaptoethanol과 L-cysteine은 대두 α -galactosidase의 활성만을 약간 저해 하였다. *Asp. niger*와 대두 α -galactosidase의 활성에 관여하는 아미노산은 diethyl pyrocarbonate에 의한 화학수식에 의하여 histidine이 확인 되었고 *Asp. niger* α -galactosidase의 1mole당 아미노산 잔기수는 모두 902개, 대두 α -galactosidase는 286개 이었다.

Keywords : *Aspergillus niger* ATCC 16513, soybean (*Glycine max.* L) α -galactosidase kinetic properties

서 론

α -Galactosidase(EC 3.2.1.22)는 α -1, 6-galactoside 결합을 갖고있는 당을 가수분해하는 효소로서 사탕수수등을 원료로한 제당공업에서 이들중의 raffinose등을 제거하거나 B형 적혈구의 α -galactopyranose 말단을 분해하여 O형 적혈구로 바꾸는등의 혈액구조연구 및 raffinose와 stachyose등의 장내가스발생인자를 제거하기위한 대두가공식품의 품질개량등에 각종 동,식물 및 미생물 기원의 α -galactosidase가 널리 이용되고있다.⁽¹⁾ 그러나 이들 효소와 기질인 소당류와의 친화성과 반응속도등의 kinetics성질들은 이들의 공업적 이용과 효소학적 특성연구의 중요한 parameter라 할수 있다.

이에관한 연구중 *Asp. niger* α -galactosidase의 kinetics에 관한 연구로는 Bahl 등⁽²⁾이 *Asp. niger* α -galactosidase를 고순도로 정제하여 p-nitrophenyl- α -D-galactopyranoside (PNPG)에 대한 Km값을 측정한 결과 $3.5 \times 10^{-4}M$ 이었다고 보고하였고 Lee 등⁽³⁾은 4.56mM, 금 등⁽⁴⁾은 5.0mM 이었다고 보고하였으며 Adya 등⁽⁵⁾은 *Asp.niger*의 정제된 α -galactosidase가 천연기질중 raffinose에 대하여 친화성이 제일 좋았다고 보고 하였다.

한편, 각종 두류 α -galactosidase의 kinetic 성질에 관한 연구는 많이 이루어졌으나^(6~8) 대두 α -galactosidase에 관한 연구로는 금 등⁽⁹⁾이 정제된 대두 α -galactosidase의 PNPG에 대한 Km값이 5.3mM 이었다는 보고만이 있다.

본 실험에서는 전보⁽⁴⁹⁾에서 정제한 *Asp. niger* ATCC 16513과 대두(*Glycine max. L*) α -galactosidase를 이용하여 천연기질에 대한 Km값과 Vmax및 활성중심등 이들의 몇가지 kinetic 성질을 조사 하였다.

재료 및 실험방법

1. α -Galactosidase와 활성측정

전보⁽⁴⁹⁾에서 정제된 1229 U/mg의 비활성을 가진 *Asp. niger* ATCC 16513 α -galactosidase와 825 U/mg의 비활성을 가진 대두(*Glycine max. L*) α -galactosidase를 실험에 사용 하였고 정 등⁽¹⁰⁾의 방법에 준하여 α -galactosidase 활성을 측정 하였다.

2. Km 값과 Vmax

0.1M McIlvaine 완충액(pH 6.5)으로 raffinose(0.5~40mM), stachyose(0.5~20mM)의 각 농도별 기질용액을 만든후 각각의 기질용액 0.1ml에 정제 효소 0.1ml를 가하여 40°C에서 10분간 반응시킨 다음 생성된 환원당을 Somogi-Nelson법^(11,12)으로 정량하여 반응속도를 구한 다음 Lineweaver-Burk식⁽¹³⁾에 따라 plot하여 Km값과 Vmax를 구하였다.

3. 활성중심

Halbrook 등⁽¹⁴⁾의 방법에 따라 각 효소용액 1ml에 60mM diethyl pyrocarbonate(DEPC) 0.1ml 및 McIlvaine 완충액(pH 7.5) 1ml를 가하여 25°C에서 반응 시키면서 경시적으로 반응액을 취하여 기질용액과 반응시킨후 효소활성을 측정하여 활성중심의 아미노산을 확인하였다.

4. 아미노산 분석

정제효소 1ml와 12N HCl 1ml를 앰플에 넣어 감압밀전하여 105°C에서 24시간 가수분해시킨 다음 감압, 건조시켜 염산을 제거 하였다. 농축 건조된 시료를 0.2N sodium citrate 완충액(pH 2.2)에 녹여 표 1과 같은 조건으로 아미노산 자동분석기(LKB Biochrom alpha plus 4151)로 아미노산을 분석하였다.

Table 1. Operating condition of amino acid analyzer.

Instrument	LKB Biochrom alpha plus 4151 amino acid autoanalyzer
Detector wavelength	440 nm, 570 nm
Column	200 mm \times 4.6 mm
Resin	Ultropac 8 cation-exchange resin sodium form with particle size of 8 μ m \pm 0.5 μ m
Flow rate	buffer 35ml/hr ninhydrin 25 ml/hr
Reaction coil temp.	105°C
Chart speed	0.2 cm/min.

결과 및 고찰

1. 정제효소의 Km값과 Vmax

Asp. niger ATCC 16513 및 대두(*Glycine max.* L) α -galactosidase의 raffinose와 stachyose에 대한 Km값과 Vmax를 측정된 결과 그림1과 2와 같이 raffinose에 대한 *Asp. niger* α -galactosidase의 Km값은 37.0mM, Vmax는 $2.2 \times 10^2 \mu\text{g}/\text{min}$.이었고 대두 α -galactosidase는 각각 50.0mM과 $5.0 \times 10^2 \mu\text{g}/\text{min}$.이었다. 또한 stachyose에 대한 Km값과 Vmax는 *Asp. niger* α -galactosidase가 55.5mM과 $5.0 \times 10^2 \mu\text{g}/\text{min}$, 대두 α -galactosidase가 55.5mM과 $1.0 \times 10^3 \mu\text{g}/\text{min}$.이었다. 이들을 종합하여 볼때 두 효소 모두 stachyose보다는 raffinose에 대하여 친화성이 더 컸으나 화학기질인 PNPG보다 훨씬 작았고⁽⁴⁹⁾ stachyose에 대하여는 모두 그 친화성이 같았으나 raffinose에 대하여는 *Asp. niger* α -galactosidase가 대두 α -galactosidase보다 컸다. 이는 금⁽⁴⁹⁾등이 두 효소의 raffinose와 stachyose에 대한 기질특이성 실험에서 두 효소 모두 stachyose보다는 raffinose를 더 잘 분해 시켰고 stachyose에 대한 분해력은 같았으나 raffinose에 대하여는 *Asp. niger* α -galactosidase가 대두 α -galactosidase보다 더 잘 분해 시켰다는 보고와 잘 일치하여 효소의 기질 친화성이 그 기질의 분해에 절대적으로 영향을 미치고 있음을 알수 있었으며 화학기질보다 실제 이용면에서 중요한 천연기질 특히 stachyose에 대한 친화성을 증대시키기 위한 추가적인 연구가 요구 되었다.

2. 효소활성에 미치는 당 및 thiol시약의 영향

2mM PNPG를 함유한 0.1M McIlvaine 완충액 (pH 6.5) 0.2ml에 10mM의 arabinose, xylose, glucose, galactose, maltose, lactose, sucrose, melibiose, raffinose 및 stachyose 각 0.1ml와 정제효소 0.1ml를 가하여 40°C에서 15분간 반응시킨 다음 잔존활성을 측정하여 각종 당류의 효소활성에 미치는 영향을 조사한 결과 정제된 두효소의 활성이 galactose에 의하여 저해 되었다(표 2). 이는 미생물⁽³¹⁵⁻¹⁷⁾ 및 식물기원^(8,18,19)의 α -galactosidase 모두 galactose에 의하여 그 활성이 저해 되었다는 보고와 같이 galactose가 α -galactosidase와 PNPG와의 복합체 형성을 방해하기 때문인 것으로 생각된다.

한편 *Asp. niger*와 대두 α -galactosidase에 대하여 thiol시약을 작용시킨 결과 표 3과 같이 *Asp. niger* α -galactosidase는 이들 시약으로 인한 효소활성 저해현상이 일어나지 않았으나 대두 α -galactosidase는 약간 활성을 저해 받았다.

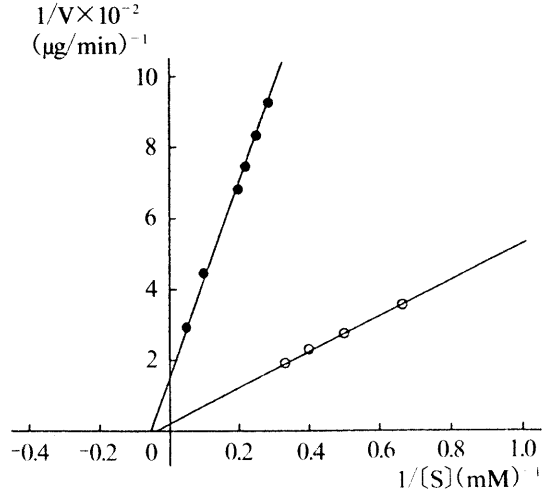


Fig. 1 Km value of α -galactosidase from soybean (—○—) and *Asp. niger* (—●—) for raffinose determined by Lineweaver-Burk plot.

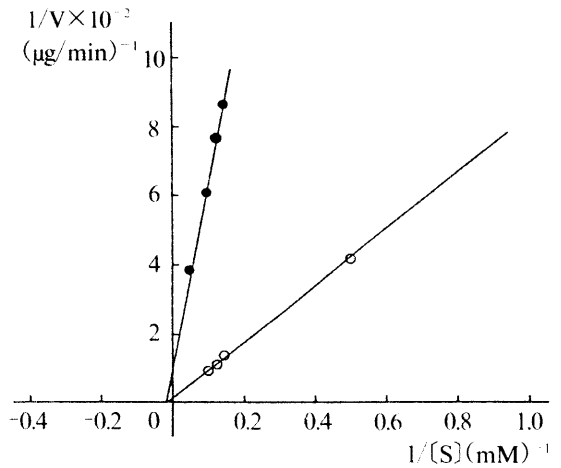


Fig. 2 Km value of α -galactosidase from soybean (—○—) and *Asp. niger* (—●—) for stachyose determined by Lineweaver-Burk plot.

3. 활성중심

Asp. niger 및 대두 α -galactosidase의 활성에 관여하는 아미노산을 확인하기 위하여 효소용액에 수식시약(DEPC)을 가한 후 효소활성을 측정할 결과 두 효소 모두 histidine잔기에 특이적으로 반

Table 2. Effect of various sugars on α -galactosidase activity of soybean and *Aspergillus niger*.

Sugars	Relative activity (%)	
	Soybean	<i>Aspergillus niger</i>
None	100	100
Arabinose	95	99
Xylose	83	93
Glucose	93	101
Galactose	65	73
Maltose	88	101
Lactose	100	105
Sucrose	94	100
Melibiose	93	108
Raffinose	91	105
Stachyose	94	112

Table 3. Effect of thiol reagents on the activity of α -galactosidase activity of soybean and *Aspergillus niger*.

Thiol reagents (10 ⁻³ M)	Relative activity	
	Soybean	<i>Aspergillus niger</i>
Control	100	100
2-Mercaptoethanol	69	96
L-Cysteine-HCl	86	102

응하는 DEPC시약과 작용하여 그림 3과 같이 반응시간이 경과함에 따라 효소활성이 저하 되었으며 *Asp. niger* α -galactosidase는 반응 40분후, 대두 α -galactosidase는 반응 70분 후 활성이 완전히 소실 되었다.

다음의 아미노산 분석 결과로 부터 *Asp. niger* α -galactosidase의 분자내부에는 효소 1mole당 histidine잔기가 10개, 대두 α -galactosidase에는 6개가 존재하며 이들 잔기의 수식으로 활성이 소실 되므로 활성부위에는 histidine잔기가 존재하며 이것이 효소 활성에 관여하는 것으로 판단 되었다.

4. 정제효소의 아미노산 조성

정제된 *Asp. niger*와 대두 α -galactosidase의 아미노산 조성은 표 4와 같이 *Asp. niger* α -galactosidase의 경우 분자량 112,000¹⁴⁾ 을 기준으로 하였을때 1 mole당 902개의 아미노산 잔기를 나타 내었고 대두

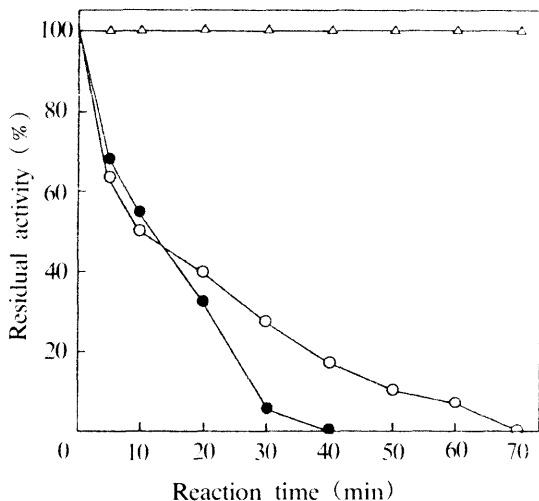


Fig. 3 Inhibition of α -galactosidase activity by diethyl pyrocarbonate.

—○—, soybean ; —●—, *Aspergillus niger* ; —△—, control.

* Each enzymes were treated with 60 mM of diethylpyrocarbonate.

Table 4. Amino acid composition of α -galactosidase.

Amino acid	Residues/mole of α -galactosidase	
	Soybean	<i>Aspergillus niger</i>
Asp.	37.9 (38)	88.4 (88)
Thr.	28.7 (29)	126.9 (127)
Ser.	21.7 (22)	74.7 (75)
Glu.	33.2 (33)	106.7 (107)
Pro.	—	52.0 (52)
Gly.	26.0 (26)	68.0 (68)
Ala.	27.4 (27)	99.6 (100)
Val.	20.9 (21)	62.8 (63)
Ileu.	8.7 (9)	29.2 (29)
Leu.	24.8 (25)	47.9 (48)
Thr.	6.3 (6)	31.4 (31)
Phe.	16.8 (17)	56.4 (56)
His.	6.3 (6)	10.1 (10)
Lys.	20.1 (20)	26.9 (27)
Arg.	7.4 (7)	20.8 (21)
Total	286.2 (286)	901.8 (902)

α -galactosidase의 경우 분자량 36,000⁽⁹⁾ 을 기준으로 하였을때 1mole당 286개의 아미노산 잔기로 구성되어 있었다. 또한 *Asp. niger* α -galactosidase의 proline잔기수는 1mole당 52개 이었으나 대두 α -galactosidase에는 전혀 존재하지 않았다.

참고 문헌

- King, M. M. Alpha-galactosidases activity and oligosaccharide hydrolysis in cowpea (*Vigna unguiculate* L. Walp) seeds and flour. University of Arkansas Ph. D. Thesis (1987)
- Bahl, O.P. and K.M.L. Agrawal. Glycosidases of *Aspergillus niger*: I. Purification and characterization of α - and β -galactosidases and β -N-acetyl glucosaminidase. J. of Biol. Chem. 244(11): 2970-2978 (1969)
- Lee, Y.C. and V. Wacek. Galactosidases from *Aspergillus niger*. Archives of Biochemistry and Biophysics. 138:264-271 (1970)
- 금 종화, 오 만진, 김 찬조. *Aspergillus niger* α -galactosidase의 정제 및 성질. 한국산업 미생물학회지. 19(5):477-486 (1991)
- Adya, S. and A.D. Elbein. Glycoprotein enzymes secreted by *Aspergillus niger*: purification and properties of α -galactosidase. J. of Bacteriology 129(2):850-856 (1977)
- Hankins, C.N. and L.M. Shannon. The physical and enzymatic properties of a phytohemagglutinin from mung bean. J. of Biol. Chem. 253(21): 7791-7797 (1978)
- Dey, P.M. and J. B. Pridham. Purification and properties of α -galactosidases from *Vicia faba* Seeds. Biochem. J. 113: 49-55 (1969)
- Baldini, V.L.S., I.S. Draetta and Y.K.Park. Purification and characterization of α -galactosidase from Feijao bean *Phaseolus vulgaris*. J. of Food Sci. 50:1766-1767 (1985)
- 금 종화, 오 만진, 김 성렬. 대두 α -galactosidase의 정제 및 성질. 한국농화학회지. 34(3): 249-257 (1991)
- 정 상수, 이 서래. 대두의 flatulence factor 제거를 위한 α -galactosidase 효소제의 특성. 한국식품과학회지. 18(6):450-457 (1986)
- Somogyi, M.. Notes on sugar determination. J. Biol. Chem. 195:19-23 (1952)
- Nelson, N.. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem. 153:375-380 (1944)
- Lineweaver, H. and D. Burk. Determination of enzyme dissociation constants. J. Amer. Chem. Soc. 56:658-666 (1934)
- Holbrook, J. J. and V. A. Ingram. Ionic properties of an essential histidine residue in pig heart lactate dehydrogenase. Biochem. J. 131:729-738 (1973)
- Suzuki, H., S.C. Li and Y.T. Li. α -Galactosidase from *Mortierella vinacea*. J. of Biol. Chem. 245 (4):781-786 (1970)
- 本座克也, 佐山晃司, 佐藤吉朗. *Absidia corymbifera* からの α -カラクトシターセ 精製 および 性質. 日本製糖糖研究會誌 第34號 pp. 67-73 (1983)
- Mitsutomi, M., Y. Uchida and A. Ohtakara. Immobilization of thermostable α -galactosidase from *Pycnoporus cinnabarinus* on chitin and some properties of the immobilized enzyme. J. Ferment. Technol. 63(4):325-329 (1985)
- Itoh, T., S. Shimura and S. Adachi. α -Galactosidase from Alfalfa seeds (*Medicago sativa* L.). Agric. Biol. Chem. 43(7):1499-1504 (1979)
- Ueno, Y., T. Ikami, R. Yamauchi and K.Kato. Purification and some properties of α -galactosidase from tubers of *Stachys affinis*. Agric. Biol. Chem. 44(11):2623-2629 (1980)