

## 과요오드산 산화당에 의한 인공단백질의 조제 메카니즘

안 용 근  
충청대학 식품영양과

### Preparation Mechanism of Glycoprotein by Periodate-oxidized Soluble Starch and Maltooligosaccharides

Yong-Geun Ann

Department of Food and Nutrition, Chungcheong College

#### Abstract

Periodate-oxidized soluble starch and maltohexaose reacted with  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> group of free amino acids and  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> group of peptidyl lysine. The result shows that periodate-oxidized soluble starch and maltooligosaccharides reacted with protein and formed Schiff base between CHO group of oxidized sugar and  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> group of surface lysine of protein molecule. Carbon and hydrogen composition of sweet potato  $\beta$ -amylase modified with oxidized soluble starch increased and its nitrogen composition decreased. Carbohydrate contents of sweet potato  $\beta$ -amylase modified with oxidized soluble starch were 13.2% (pentamer), 13.4% (monomer), and with oxidized maltohexaose were 9.7% (pentamer), 9.3% (monomer) by phenol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> method. Alpha-amino group of N-terminal, and  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> group of lysine, of sweet potato  $\beta$ -amylase were reacted with oxidized soluble starch by dinitrophenylation were 70% (pentamer), 73% (monomer) and 33% (pentamer), 26% (monomer), respectively, in comparison with native enzyme.

Key words: glycoprotein preparation mechanism, periodate-oxidized soluble starch, periodate oxidized maltooligosaccharides

#### 서 론

본연구자는 NaIO<sub>4</sub> 산화 가용성전분 및 말토올리고당을 이용하여 고구마  $\beta$ -아밀라아제의 서브유니트 구조와 기능을 해석한 바 있다<sup>(1-5)</sup>. 고구마  $\beta$ -아밀라아제는 분자량 55,707의 서브유니트 넷으로 된 테트라머로, 서브유니트로 해리되면 활성을 잃기 때문에 모노머는 활성을 가지지 않는 것으로 알려져 왔다. 그러나 본연구자는 산화 가용성전분 및 말토올리고당으로 고구마  $\beta$ -아밀라아제를 변형시킨 결과, 활성을 갖는 안정한 고구마  $\beta$ -아밀라아제의 모노머를 얻어 서브유니트 구조는 효소의 촉매활성에는 관계가 없고 안정화 기능에만 관여한다는 사실을 밝혔다<sup>(1-5)</sup>.

이 방법은 고구마  $\beta$ -아밀라아제의 서브유니트 결합에 작용하는 부위에 당을 부가시켜 서브유니트 결합을 차단하여 모노머를 분리하는 방법이다. 모노머

는 불안정하여 바로 변성 불활성화되지만 부가된 당에 의해 안정화되어 모노머가 활성을 나타낸다. 이것은 Schiff 염기 형성법으로, 널리 알려진 방법이지만 현재까지 리간드를 다리로 사용하여 단백질에 다른 물질을 결합시키는 방법은 많았으나 당을 산화시켜서 효소단백질과 직접 공유결합시키는 방법은 거의 사용되지 않았다. 본연구자는 전보<sup>(6)</sup>에서 이 방법으로 여러 인공 당단백질을 조제하여 일반적인 당단백질 조제법으로 사용할 수 있는 가능성을 제시한 바 있으나, 과요오드산으로 산화시킨 당이 효소 분자 표면의 리신의  $\epsilon$ -아미노기하고만 Schiff 염기를 형성하는가, N-말단의  $\alpha$ -아미노기와 형성하는가, 얼마나 결합하는가 밝혀지지 않았다. 본논문은 그를 밝힌 결과이다.

#### 재료 및 방법

#### 시약

가용성 전분은 國產化學(일본) 제품을, 말토올리고

Corresponding author: Yong-Geun Ann, Department of Food and Nutrition, Chungcheong College, Wolgokri 330, Gangnae, Cheongwon, Chungbuk 363-890, Korea

당은 日本食品(일본)의 기증품을, glyceraldehyde는 和光(일본) 제품을, 펩티드는 펩티드연구소(일본) 제품을 사용하였다.

#### NaIO<sub>4</sub>에 의한 가용성 전분 및 말토올리고당의 산화

가용성 전분 및 maltohexaose, maltotetraose, maltose 등의 말토올리고당 2 g을 100 mL의 0.2 M NaIO<sub>4</sub> 용액에 현탁하여 4°C에서 40분간 교반하여 반응시킨 다음 ethyleneglycol 10 mL를 가해 미반응의 NaIO<sub>4</sub>를 소모 제거시켰다. 다음, 가용성전분은 증류수에 투석하여 동결건조하였다. 말토올리고당 반응 혼합물은 Sephadex G-25 컬럼(1.9×150 cm)에 가하여 증류수로 용출시켜 5 mL씩 분취하여 280 nm의 흡광도와 Somogyi-Nelson<sup>7)</sup>법에 의한 500 nm의 흡광도가 일치하는 피크 중, AgNO<sub>3</sub> 반응을 일으키지 않는 피크를 모아 동결건조하였다.

#### 고구마 β-아밀라아제에 대한 산화당의 부가

0.2 M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>-KCl-Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 완충액(pH 9.7) 10 mL에 고구마 β-아밀라제 60 mg과 산화 전분 250 mg을 녹여 37°C에서 10분간 반응시킨 다음 1 M NaBH<sub>4</sub>-HCl 용액(pH 4.5)을 가해 pH를 7.5로 맞추었다. 다음, 0.1 M NaBH<sub>4</sub>-HCl 완충액(pH 7.5)에 대해 4°C에서 24시간 투석 환원시켰다.

다음, Sephadex G-200 컬럼(3.5×104 cm)에 가하여 0.1 M NaCl을 함유한 0.1 M K-인산완충액(pH 6.8)을 사용하여 크로마토그래피하여 5 mL씩 분취하였다. 유출액의 단백질 농도는 280 nm에서의 흡광도로, 효소활성은 가용성 전분을 기질로 생성된 환원당을 Somogyi-Nelson법<sup>7)</sup>으로 비색정량하였고, 총당은 phenol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 법<sup>8)</sup>으로 정량하였다.

#### 산화 말토헥사오스와 아미노산의 반응

0.2 M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>-KCl-Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 완충액(pH 9.7) 중에 글리신, 아스파라긴, 세린, 시스테인, 리신, 아르기닌, β-알라닌을 각기 1.5 mg/mL 농도로 가하고 여기에 산화 말토헥사오스를 10 mg/mL 농도로 가하여 37°C에서 10분간 반응시킨 다음 NaBH<sub>4</sub>로 환원시켰다. 이것을 Hitachi 835S 아미노산 자동분석기(일본)로 분석하여 잔존 아미노산양을 분석하였다.

#### 펩티딜리신과 산화전분 및 말토헥사오스의 반응

0.2 M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>-KCl-NaCO<sub>3</sub> 완충액(pH 9.7) 중에 poly-L-Lys-HCl, Pro-Phe-Arg-MCA를 각각 0.5 mg/mL 농도로 가하고 여기에 산화전분을 1.5 mg/mL 농도로 가

하여 37°C에서 1시간 반응시킨 다음 NaBH<sub>4</sub>로 환원시켰다. 이것을 6 N HCl로 105°C에서 24시간 가수분해하여 Hitachi 835S 아미노산 자동분석기(일본)로 아미노산을 분석하였다.

#### 펩티딜리신과 산화 산화말토헥사오스의 반응

0.2 M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>-KCl-Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 완충액(pH 9.7) 중에 poly-L-Lys-HCl, Boc-Glu-Lys-Lys-MCA를 각각 5 mg/mL 농도로 가하고 여기에 산화 말토헥사오스를 10 mg/mL 농도로 가하여 37°C에서 1시간 반응시킨 다음 NaBH<sub>4</sub>로 환원시켰다. 이것을 6 N HCl로 105°C에서 24시간 가수분해하여 Hitachi 835S 아미노산 자동분석기(일본)로 분석하였다.

#### N-말단 α-아미노기 및 ε-아미노기의 정량

Sanger의 dinitrophenylation (DNP)<sup>9)</sup>법에 따랐다. 즉, 효소 0.2 μmol (11.14 mg/monomer)을 에탄올에 녹인 5% 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB) 용액과 25°C에서 4시간 반응시켜 디니트로페닐화 효소를 조제하였다. 이 효소에 6 N HCl을 가해 감압 밀봉하여 105°C에서 16시간 가수분해한 다음 HCl을 제거하고 에테르로 DNP 아미노산을 추출하였다. 잔사는 말려서 아세톤으로 수용성 DNP-아미노산을 추출하였다. 에탄올 가용성과 수용성 DNP-아미노산은 실리카겔 판(19.5×19.5, 0.1 cm)을 따로 사용하여 toluene-pyridine-ethylenchlorohydrin-0.8 N ammonia (10:3:6:6)와 n-propanol-34% ammonia (7:3) 용매계로 전개한 후 반점을 질취, 1% NaHCO<sub>3</sub>와 1 N HCl로 추출하여 363 nm와 355 nm의 흡광도를 측정하여 정량하였다.

#### 원소분석

Perkin Elmer CHN corder model 204 (미국)로 분석하였다.

#### 아미노산 조성 분석

변형 효소 및 비변형 효소에 6 N 염산을 가하여 감압 밀봉한 다음 105°C에서 24시간, 48시간, 72시간 가수분해한 다음 Hitachi 835S 아미노산 자동분석기(일본)로 분석하였다

## 결 과

#### 원소분석

원소분석 결과, Table 1과 같이 변형효소는 비변형 효소보다 C, H의 함량이 늘고, N의 함량이 줄어들었

**Table 1. Elemental analysis of sweet potato  $\beta$ -amylase**

Element	C	H	N
Native enzyme %	48.9	7.3	15.0
Modified enzyme %	52.8	10.0	12.8

Results from Perkin Elmer CHN corder model 204.

다. 이것은 산화당이 효소 분자에 결합하였기 때문이다(Table 1).

#### 산화당과 아미노산의 반응- $\alpha$ -아미노기와의 반응

글루칸을  $\text{NaIO}_4$ 로 산화시키면 고리가 개열되면서 알데히드가 생긴다. 알데히드는 아미노산의  $\text{NH}_2$ 기와 결합하여 Schiff 염기를 형성한다<sup>(4,6)</sup>.

산화당과 아미노산을 반응시킨 결과, Table 2와 같이 모두 반응하고 있다.

0.2 M  $\text{H}_3\text{BO}_3$ -KCl- $\text{Na}_2\text{CO}_3$  완충액(pH 9.7) 중에서 여러 유리 아미노산(1.5 mg/mL)과 산화 말토헥사오스(10 mg/mL)를 37°C에서 10분간 반응시킨 후  $\text{NaBH}_4$ 로 환원시켜 아미노산 자동분석기로 반응 전후의 양을 분석하여 유리아미노산의  $\text{NH}_2$ 기와 산화 말토헥사오스의 CHO기와의 반응성을 조사하였다. 그 결과, Table 2와 같이 실험에 사용된 아미노산은 모두 산화 말토헥사오스와 반응하였으나 그중 리신의 반응성이 가장 높고, 시스틴의 반응성이 가장 낮았다. 리신의 반응성이 가장 큰 것은  $\epsilon$ - $\text{NH}_2$ 기가 여분으로 하나 더 있기 때문이다(Table 2).

N-말단을 차단한 펩티드와 산화당을 반응시킨 결과, Table 3과 같이 산화당은 펩티드의 아미노산 사슬 중의 리신의  $\epsilon$ - $\text{NH}_2$ 기와 손쉽게 반응하였다. 아르기닌도 일부 반응하였다.

**Table 2. Reactivity of periodate oxidized maltohexaose with several amino acids**

Amino acids used	Recovery of amino acid after reaction, %
Gln	62.7
Asn	70.1
Ser	65.4
Cys	82.8
Lys	57.6
Arg	63.1
$\beta$ -Ala	55.6

The amino acids (1.5 mg/mL) were incubated with oxidized maltohexaose (10 mg/mL) in 0.2 M  $\text{H}_3\text{BO}_3$ -KCl- $\text{Na}_2\text{CO}_3$  buffer (pH 9.7) at 37°C for 10 min. followed by reducing with  $\text{NaBH}_4$  and then analyzed by amino acid analyzer (Hitachi 835S).

**Table 3. Reaction of oxidized soluble starch or maltohexaose with peptidyl lysine and arginine**

Peptide used	Amino acids	Recovery after
Oxidized soluble starch	poly-L-Lys-HCl <sup>a)</sup>	Lys 20.5
	Pro-Phe-Arg-MCA <sup>b)</sup>	Arg 56.0
		Phe 84.6
Oxidized maltohexaose	poly-L-Lys-HCl <sup>a)</sup>	Lys 36.9
	Boc-Glu-Lys-Lys-MCA <sup>a)</sup>	Lys 23.2
		Glu 84.5

<sup>a,b)</sup>The peptide (0.5 mg/mL) was incubated with oxidized soluble starch and maltohexaose (1.5 mg/mL) in 0.2 M  $\text{H}_3\text{BO}_3$ -KCl- $\text{Na}_2\text{CO}_3$  buffer (pH 9.7) at 37°C for 1 hr. The reaction mixture was reduced with  $\text{NaBH}_4$  and hydrolyzed by 6 N HCl at 105°C for 24 hr and analyzed on amino acid analyzer (Hitachi 835S).

<sup>a)</sup>The peptide (5 mg/mL) was incubated with oxidized maltohexaose (10 mg/mL) in 0.2 M  $\text{H}_3\text{BO}_3$ -KCl- $\text{Na}_2\text{CO}_3$  buffer (pH 9.7) at 37°C for 1 hr. The reaction mixture was reduced with  $\text{NaBH}_4$  and hydrolyzed by 6 N HCl at 105°C for 24 hr and analyzed on amino acid analyzer (Hitachi 835S).

#### 산화당과 펩티딜 리신의 반응- $\epsilon$ -아미노기와의 반응

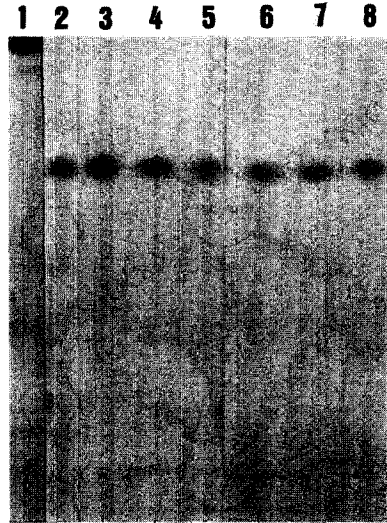
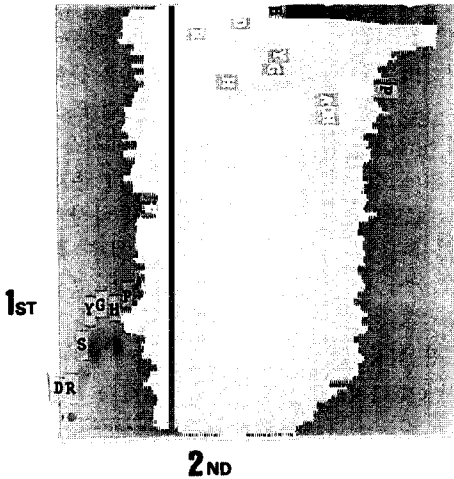
Boc-Glu-Lys-Lys-MCA 펩티드와 산화 말토헥사오스를 반응시킨 결과 펩티딜리신의  $\epsilon$ - $\text{NH}_2$ 기는 Table 3과 같이 37°C에서 1시간 반응으로 76.8% 반응하였다. poly-L-Lys-HCl과 산화 가용성 전분과는 79.5%, 산화 말토헥사오스와는 63.1% 반응하였으나 산화 말토헥사오스는 Boc-Glu-Lys-Lys와의 반응에 비해 반응율이 약간 낮았다. 또, Pro-Phe-Arg-MCA 펩티드와 산화 가용성 전분과 반응시킨 경우 아르기닌 잔기는 44% 반응하였다(Table 3).

이들 결과는  $\text{NaIO}_4$ 로 산화하여 생긴 산화 가용성 전분 및 말토올리고당의 CHO기는 아미노 말단의  $\alpha$ - $\text{NH}_2$ 기, 리신의  $\epsilon$ - $\text{NH}_2$ 기나 아르기닌의 구아니도기와 반응하는 것을 의미한다.

단백질은 고온에서 반응시키거나 반응시간이 길면 변성되어 물성을 잃는 경우가 많다. 그러므로 산화당이 이같이 상온에서 10분 정도로 신속하게 반응하는 것은 커다란 장점이다.

#### 효소분자의 N-말단 $\alpha$ -아미노기 및 리신의 $\epsilon$ -아미노기에 결합한 산화당의 물수

DNP화시킨 효소를 염산으로 가수분해하여 TLC로 전개시킨 결과 Fig. 1과 같이 N-말단 아미노산으로서 알라닌만 나타났다. 같은 방법으로 아미노산 결사슬을 DNP화한 효소를 조제하여 가수분해한 다음



**Fig. 1.** Amino terminal amino acid residue of sweet potato  $\beta$ -amylase modified with oxidized soluble starch. The enzyme 0.2  $\mu$ mol was incubated with 5% 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB) in ethanol at 37°C for 1 hour. The reaction mixture was hydrolyzed by 6 N HCl at 105°C for 16 hour and spotted on silica gel (19.5 $\times$ 19.5, 0.1 cm) and developed by solvent system of toluene-pyridine-ethylenechlorohydrin-0.8 N ammonia (10:3:6:6) and n-propanol-34% ammonia (7:3). The DNP-amino acids were extracted with 1% NaHCO<sub>3</sub> and 1 N HCl and determined by spectrophotometric absorbance at 363 nm and 355 nm.

**Fig. 2.** Epsilon-DNP lysine residue of sweet potato  $\beta$ -amylase modified with oxidized soluble starch. The enzymes 0.2  $\mu$ mol (11.14 mg/monomer) were incubated with 5% 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB) in ethanol at 37°C for 1 hour. The reaction mixture was hydrolyzed by 6 N HCl at 105°C for 16 hour and spotted on silica gel (19.5 $\times$ 19.5, 0.1 cm) and developed by solvent system of toluene-pyridine-ethylenechlorohydrin-0.8 N ammonia (10:3:6:6) and n-propanol-34% ammonia (7:3). The DNP-amino acids were extracted with 1% NaHCO<sub>3</sub> and 1 N HCl and determined by spectrophotometric absorbance at 363 nm and 355 nm. 1,  $\alpha$ -DNP lysine; 2,  $\alpha$ -DNP lysine; 3, native enzyme. Enzyme modified with 4, oxidized soluble starch; 5, oxidized maltohexaose; 6, oxidized maltotetraose; 7, oxidized maltose; 8, glyceraldehyde.

TLC로 전개한 결과 Fig. 2와 같이  $\epsilon$ -DNP화 리신만 검출되었다(Figs. 1, 2).

이들 DNP 아미노산을 분취, 추출하여 분광광도계로 정량한 결과, Table 4와 같이 비변형효소의 N말단은 모노머 1몰당 0.574 몰인데 반해, 변형하여 크로마토그래피로 분리<sup>(4-5)</sup>한 F-A (펜타머)는 0.172몰, F-B (모노머)는 0.155몰을 나타냈다. 이것은 모노머 기준으로 변형효소인 펜타머는 70%, 모노머는 73%의 N-말단 NH<sub>2</sub>기가 산화당과 반응한 것을 나타낸다. 한편, 비변형효소의  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>기는 9.65몰인데 반해 변형효소는 펜타머가 6.45몰, 모노머가 7.02몰을 나타내 각각 33% 및 26%의  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>기가 산화당과 반응한 것으로 나타났

다. 한편, 고구마  $\beta$ -아밀라아제 모노머당의 총 리신 잔기는 29몰이다<sup>(6)</sup>.

비변형효소의 리신잔기가 DNP법으로 9.65몰(33.3%)만 검출된 것은 고구마  $\beta$ -아밀라아제의 리신 잔기의 33.3%는 표면에, 66.7%는 분자 내부에 존재하는 것을 의미한다. 나아가, 표면에 존재하는 9.65몰의 리신 잔기중 모노머의 약 2.63몰만 변형된 것은 표면의 리신 잔기 9.65몰 중 약 3몰만 산화말토헤사오스가 접근하

**Table 4.** Reaction ratio of amino groups of sweet potato  $\beta$ -amylase with oxidized soluble starch

Enzymes	$\alpha$ -NH <sub>2</sub>		$\epsilon$ -NH <sub>2</sub>	
	Mole/mole enzyme	Reaction ratio %	Mole/mole enzyme	Reaction ratio %
Modified enzyme			6.45	
Pentamer (F-A)	0.172	70	7.02	33
Monomer (F-B)	0.155	73	9.65	26
Native enzyme	0.574			

Alpha-amino and  $\epsilon$ -amino group of sweet potato  $\beta$ -amylase were determined by dinitrophenylation method.

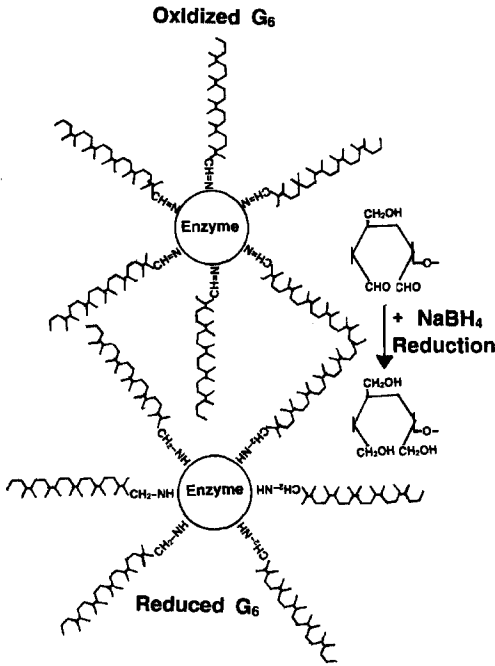


Fig. 3. Modification mechanism of protein with oxidized maltohexaose.

기 좋은 곳에 존재한다는 것을 의미한다. 즉, DNFB는 분자량이 작아서 울퉁불퉁한 입체구조 표면의 ε-NH<sub>2</sub>기 대부분과 반응하는 데 반해 산화말토헥사오스는 분자량이 커서 들어가 있는 우묵한 부분의 ε-NH<sub>2</sub>기와는 반응하지 못하였기 때문에 나타난 결과로 보인다 (Table 4).

효소단백질에 결합한 산화당의 양

한편, phenol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>법으로 분석한 결과, 효소단백질 기준으로 산화 가용성전분은 펜타머에 13.2%, 모노머에 13.4% 결합되고, 산화말토헥사오스는 펜타머에 9.7%, 모노머에 9.5%가 결합된 것으로 나타난다. 이 결과는 산화 말토헥사오스의 경우 모노머 1몰당 약 6분자의 산화 말토헥사오스가 결합한 것을 의미하지만 ε-NH<sub>2</sub>에는 산화말토헥사오스가 세 분자만 결합한 것으로 나타난다. 이것은 N-말단과 아르키닌 등에도 결합하기 때문으로 보인다.

고 찰

이상의 결과로부터 효소 단백질에 산화당이 결합되는 메카니즘은 Fig. 3과 같이 산화당의 알데히드가 효소의 ε-NH<sub>2</sub>기 및 N-말단의 α-NH<sub>2</sub>기와 공유결합하는

것으로 설명할 수 있다. 여기서는 산화말토헥사오스에 예로 들었다. 이중결합은 불안정하기 때문에 NaBH<sub>4</sub>로 환원시켜 단일 결합으로 만들며, 이때 산화당의 알데히드는 모두 환원되어 당알콜이 된다(Fig 3).

이 방법은 많은 다당류를 산화하여 사용할 수 있다. 전분외에 값싸고 자연계에 가장 많이 존재하는 셀룰로오스, 만난 키틴 등의 글리칸을 산화시켜서 기능성이 향상된 인공당단백질을 만드는 것은 물론, 미생물과 효소에 적용하여 고정화 미생물과 고정화 효소를 만들 수도 있다.

시판 식품용 산화전분은 산화도가 낮아서 이 목적에 사용하려면 조건을 재검토해야 한다.

요 약

과요오드산으로 산화시킨 당을 유리아미노산과 반응시켜서 α-NH<sub>2</sub>기와 펩티딜리신의 ε-NH<sub>2</sub>기와 반응하여 결합한 것을 확인하였다. 그래서, 제조한 과요오드산-산화당은 단백질 분자 표면의 리신의 ε-NH<sub>2</sub>기와 Schiff 염기 반응으로 공유결합하여 당단백질을 만드는 것으로 볼 수 있다. 과요오드산 산화당으로 변형한 고구마 β-아밀라아제는 C, H는 증가, N은 감소하였다. N말단의 α-NH<sub>2</sub>기는 70% (pentamer), 73% (monomer), ε-NH<sub>2</sub>기는 33% (pentamer), 26% (monomer)가 산화당과 반응하였다. 페놀-황산법에 의한 총당 정량과 DNP 법으로 분석한 결과, IO<sub>4</sub>산화말토헥사오스는 고구마 β-아밀라아제 1몰당 6몰이 결합된 것으로 나타났고, 고구마 β-아밀라아제에 결합된 산화가용성 전분은 효소단백질 대비 13.2% (monomer), 13.5% (pentamer), 산화말토헥사오스는 9.7% (pentamer), 9.3% (monomer)로 나타났다.

문 헌

1. Ann, Y.G.: Studies on sweet potato β-amylase. Ph. D. Thesis, Osaka City Univ., Japan (1989). (in Japanese)
2. Ann, Y.G., Iizuka, M., Yamamoto, T. and Minamiura, N.: Evidence for existence of an active monomer of sweet potato β-amylase, *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 3109-3110 (1989)
3. Ann, Y.G., Iizuka, M., Yamamoto, T. and Minamiura, N.: Preparation and some properties of active monomer of sweet potato β-amylase, *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 769-774 (1990)
4. Ann, Y.G., Iizuka, M., Yamamoto, T. and Minamiura, N.: Active monomer of sweet potato β-amylase: Stabilization and an improved preparation method using α-cyclodextrin, *J. Ferment. Bioeng.*, **70**, 75-79 (1990)
5. Minamiura, N., Ann, Y.G., Iizuka, M., Ito, K. and

- Yamamoto, T.: Preparation of an active monomer from sweet potato tetrameric  $\beta$ -amylase in the presence of  $\alpha$ -cyclodextrin, *Denpun Kakaku*, **38**, 153-157 (1991)
6. Ann, Y.G.: Glycosylation of proteins by periodate oxidized sugar, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **31**, 62-67 (1999)
7. Nelson N.: A photometric adaption of the Somogyi method for the determination of glucose, *J. Biol. Chem.*, **153**, 375-380 (1944)
8. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F.: Coloric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.*, **28**, 350-356 (1956)
9. Iwai, K.I. and Hujioka, E.K.: Analysis of N-terminal amino acid of protein and peptides by DNP method. In *Protein analysis method (1)*, *Biochemical Experiments*, 1st ed., Kyorits Publishing Co., Tokyo, **1**, 5-26 (1968) (in Japanese)
- 

(1998년 7월 27일 접수)