

Asialofetuin 에 대한 *Aspergillus oryzae*, bovine liver, *Saccharomyces fragilis* 유래 β -galactosidase 의 반응 조건

윤재경 · 이영재 · 구본웅 · 윤상영 · 유창수 · 김하형[#]

중앙대학교 약학대학

(Received March 21, 2000)

The Reaction Conditions of β -Galactosidases from *Aspergillus oryzae*, Bovine Liver, and *Saccharomyces fragilis* to Asialofetuin

Jae-Kyoung Youn, Young-Jae Lee, Bon-Woong Koo, Sang-Young Youn,
Chang-Soo Ryu and HaHyung Kim[#]

College of Pharmacy, Chung-Ang University

Abstract — The enzymatic properties of β -galactosidases from *Aspergillus oryzae*, bovine liver and *Saccharomyces fragilis* have been studied using enzyme-linked lectin assay based on the RCA₁₂₀ and BS-II lectins which specifically bind to terminal galactose and GlcNAc residue, respectively. Asialofetuin, a monomeric glycoprotein with approximately 48 kDa in molecular weight, was used as a substrate. This glycoprotein contains three N-linked triantennary complex type carbohydrate chains with each of which terminating in Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc (74%). Their optimal pHs were 3.5 and 6.5 (*A. oryzae*), and 3.5~5.5 (bovine liver and *S. fragilis*) at 37°C during 24 hrs, and the effective concentrations were 0.9, 2.9, and 1.7 mg/ml, respectively. The enzyme from *A. oryzae* requires 100 mM Na⁺ or K⁺, while the enzyme from bovine liver requires Ba²⁺ for activity. However all of the three β -galactosidases were inactivated by SDS and Cu²⁺. These results indicate that the hydrolysis of glycoprotein such as asialofetuin depends on the reaction conditions of β -galactosidases and some metal ions.

Keywords □ β -galactosidase, activity, asialofetuin, lectin.

당말단 가수분해효소(exoglycosidase)는 복합당질(glycoconjugate)의 다당의 비환원 말단(nonreducing end)으로부터 단당 단위로 가수분해하는 효소의 총칭으로 순차적 분해(sequential degradation)에 의해 다당의 일차구조 해석과 각 결합 단당의 아노머결합을 결정하는데 널리 이용되고 있다.¹⁾ β -galactosidase(β -D-galactoside galactohydrolase, EC 3.2.1.23)는 glucose- β -D-galactoside로 된 올리고당 배열로부터 galactose를 유리시키는 당말단 가수분해효소의 일종으로, 골지체에서 올리고당 부분의 합성시 발현하며 세균

에서 고등 동식물에 이르기까지 다양하게 분포하고, 주 용도로는 다당의 구조연구, 유전공학에서 클론 선택의 마커, 융합유전자 형성에 이용될 뿐만 아니라 유아의 유당불내에 의한 소화불량의 개선 및 경구유동식등의 섭취시 유당불내에 의한 설사에 유용하여 소화제로 사용되기도 한다.²⁾

최근 *Aspergillus niger*, *Streptococcal* 6646K, *Diplococcus pneumoniae*, Jack-bean 유래의 β -galactosidase등이 분리되어 이용되고 있으며, 이들은 각각 기질특이성, 반응 최적 pH, 유효농도, 반응온도 및 이온 등에 의한 저해 혹은 활성작용등에 차이가 나는 것으로 보고되고 있다.³⁻⁵⁾

기질 특이성에 있어서는 주로 Gal β \rightarrow 4GlcNAc의

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-820-5612 (팩스) 02-820-5606

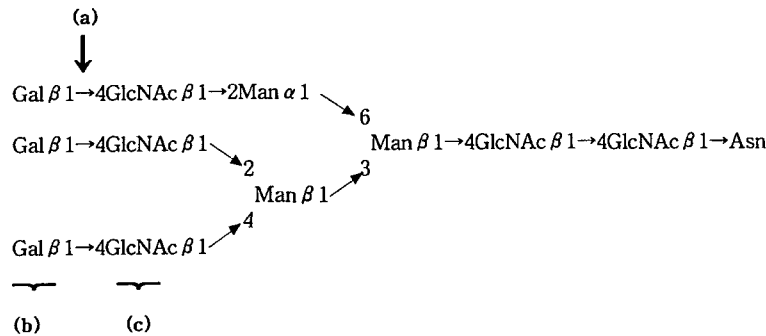


Fig. 1 - Structure of the major N-linked triantennary complex-type oligosaccharide of asialofetuin. (a) indicates the site of hydrolysis of β -galactosidase. (b) and (c) indicate the site of binding specificity of RCA₁₂₀ and BS-II lectin, respectively.

결합을 가수분해하는 것으로 알려져 있으나, *Streptococcal* 6646K, Jack bean 유래의 경우에는 Gal β \rightarrow 3GlcNAc의 결합도 가수분해하는 것으로 알려져 있으며, 반응 최적 pH는 *A. niger* 유래 pH 4.0~4.5, *Streptococcal* 6646K 유래 pH 5.5, *D. pneumoniae* 유래 pH 6.0~6.5, Jack bean 유래 pH 3.5~4.5 인 것으로 보고되고 있고, 반응온도는 37°C, 반응시간은 18시간이 최적 반응조건으로 알려져 있다.⁶⁾ 또한, *Streptococcal* 6646K 유래는 EDTA에 의해서는 반응이 저해되나, Mn²⁺이온등에 의해서는 활성화되는 결과가 보고되고 있다.⁷⁾ 그러나, *Aspergillus oryzae*, bovine liver, *Saccharomyces fragilis* 유래의 경우 대량으로 정제하는 방법이 보고되고 있으나,⁸⁾ 반응조건은 기질을 *p*-nitrophenyl β -D-galactoside와 같은 저분자 glycon을 이용하여 이루어지고 있으며, 당단백질이나 당지질과 같은 복합당질을 대상으로 한 보고는 미미한 실정이다.

당말단 가수분해효소의 반응조건을 확인하기 위한 방법으로는 colorimetric assay법,⁹⁾ synthetic chromogenic substrate로부터 유리되어 나오는 chromogen의 측정,¹⁰⁾ synthetic fluorescent substrate로부터 유리되어 나오는 형광도의 측정,¹¹⁾ tritium-labeled oligosaccharide substrate를 이용한 radioisotopic assay법,¹²⁾ lectin을 이용한 방법^{13,14)} 등이 이용되고 있다. 이 중, lectin을 이용한 경우, 형광검출기의 이용, radioisotope을 사용하여야 하는 불편함 등을 극복하고, 특정당과 결합하는 특이적인 성질로 당 구조 분석이나 세포 표면의 당단백질 혹은 당지질의 구조, 기능 연구에 많이 이용되고 있다.¹⁵⁻¹⁷⁾ 특히, 당말단 가수분해효

소 중 가장 연구가 활발한 neuraminidase의 반응성에 관한 연구에 lectin의 당결합 특이성을 이용한 결과가 보고되고 있다.¹⁸⁾

본 연구에서는 기질로 당단백질의 일종인 asialofetuin을 이용하여 *A. oryzae*, bovine liver, *S. fragilis* 유래의 β -galactosidase에 대한 반응최적 pH, 유효농도, 반응적정온도, 반응시간, 변성제 및 금속이온등의 영향을 lectin의 당 결합 특이성을 이용하여 실시하였다. Asialofetuin은 fetuin의 비환원 말단으로부터 sialic acid를 가수분해하여 Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc이 말단인 N-linked triantennary complex-type의 당쇄가 약 74%, Man α 1 \rightarrow 3 가지중 Gal β 1 \rightarrow 3GlcNAc을 포함하는 이성체가 약 9%, Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc 잔기를 가지는 biantennary chain 및 Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc의 O-linked disaccharide를 일부 포함하는 분자량 48 kDa의 당단백질로 대표적인 당의 구조는 Fig. 1에 나타내었다.^{19,20)} 또한, 본 연구에서 이용한 lectin은 *Ricinus communis* 유래로 당말단의 galactose를 특이적으로 결합하는 RCA₁₂₀과 *Bandeiraea simplicifolia* 유래로 당말단의 GlcNAc과 결합하는 BS-II 이며, 이들 lectin의 당 결합 특이성을 이용하여 Microplate Reader를 이용한 enzyme-linked lectin assay법을 적용하였다.²¹⁾ 즉, β -galactosidase를 기질에 반응시키면 galactose가 가수분해되어 새로운 당말단인 GlcNAc과 결합하는 peroxidase-labeled BS-II lectin이 반응을 하게 되므로 발색제로 발색한 후 415 nm에서 흡광도를 측정할 수 있게 되며, β -galactosidase에 의해 가수분해 반응이 진행되지 않은 경우에는 galactose에 특이적으로 결합하는 RCA₁₂₀이 반응하게 된다(Fig. 1).

실험방법

시약 및 기기 - 본 실험에서 사용한 asialofetuin (fetal calf serum), bovine serum albumin(BSA), polyethylene sorbitan monolaurate(Tween 20), peroxidase-labeled RCA₁₂₀ lectin(*Ricinus communis agglutinin*), peroxidase-labeled BS-II lectin(*Bandeiraea simplicifolia*), β -galactosidase(*Aspergillus oryzae*, bovine liver, *Saccharomyces fragilis*), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS), sodium dodecyl sulfate(SDS)는 SIGMA사로 부터 구입하였다. 그 외의 시약은 모두 특급 혹은 일급을 사용하였다. β -galactosidase 반응성 확인에는 Microplate Reader (Model 550, Bio-Rad)를 사용하였으며, 단백질의 정량에는 Cary 3 UV/VIS Spectrophotometer(Varian)를 사용하였다.

Asialofetuin에 대한 lectin의 결합 농도 확인 - Asialofetuin을 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 μ g/ml의 농도로 10 mM phosphate buffer, 0.15M NaCl, pH 7.4(PBS)에 용해하고 각각을 50 μ l씩 microplate well에 코팅한 후 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 코팅된 용액은 aspiration에 의해 제거하고 각 well은 PBS-0.1% Tween 20(PBST) 100 μ l로 3회 세척하였다. 그 후 1% BSA를 포함한 PBST 100 μ l를 well에 넣고 37°C에서 1시간 반응시킨 후 aspiration에 의해 제거하고 각 well을 100 μ l PBST로 3회 세척하였다. 그리고 10, 25, 50 μ g/ml의 농도로 PBS에 용해한 peroxidase-labeled lectin RCA₁₂₀과 peroxidase-labeled lectin BS-II를 50 μ l씩 각 well에 넣고 37°C에서 1시간 동안 반응시키고, 100 μ l의 PBST로 5회 세척후 ABTS 0.55 mg/ml 용액 100 ml에 H₂O₂ 1 μ l를 넣고 각 well에 100 μ l씩 넣은 후 즉시 Microplate Reader를 사용하여 415 nm에서 각 well의 흡광도 값을 측정하고 10분후 재측정하여 각각의 상대값을 구하여 시약을 넣는 순서에 의한 흡광도의 오차를 줄였다.

β -galactosidase의 반응성 확인 - Asialofetuin의 농도는 5 μ g/ml, peroxidase-labeled lectin BS-II의 농도는 10 μ g/ml로 하여 asialofetuin에 대한 lectin의 결합 방법에 준하여 실시하였으나, lectin을 가하기 전에 다음에 나타내는 각 조건에 따라 β -Galactosidase(*A. oryzae*, bovine liver, *S. fragilis*)를 반응시

켰다.

완충액의 조제 - 본 실험에서 사용한 완충액은 100 mM citric acid에 200 mM Na₂HPO₄를 29.4%, 44.9%, 56.3%, 70.9%, 92.0%씩 각각 가하여 pH를 3.5, 4.5, 5.5, 6.5, 7.5로 조절하였다.

β -galactosidase의 최적 pH조건 - pH 3.5, 4.5, 5.5, 6.5, 7.5의 완충액에 용해한 β -galactosidase를 0.8 unit/100 μ l 농도로 하고 37°C에서 24시간동안 기질과 반응시킨 후 반응성을 확인하였다.

β -galactosidase의 유효농도 및 반응 적정온도 - β -galactosidase를 pH 3.5의 완충액에 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 unit를 100 μ l에 용해한 후 37°C에서 24시간동안 반응시킨 후 반응성을 확인하였다. 반응은 20°C와 37°C로 한 incubator에서 실시하였다.

β -galactosidase의 반응시간 - *A. oryzae*, *S. fragilis* 유래 β -galactosidase 인 경우에는 0.8 unit/100 μ l, bovine liver유래 β -galactosidase 인 경우에는 0.05 unit/100 μ l로 한 후 2, 8, 16, 24시간 반응시킨 후 37°C에서 활성을 측정하였다.

변성제 및 금속이온이 β -galactosidase의 활성에 미치는 영향 - 단백질 변성제로는 SDS, 금속이온으로는 KCl, NaCl, CuCl₂, MnCl₂, MgCl₂, CaCl₂, BaCl₂, ZnCl₂, CoCl₂, FeCl₂, FeCl₃를 각각 최종농도가 0.1, 1, 10, 100 mM이 되도록 가하고 *A. oryzae*, *S. fragilis* 유래인 경우에는 0.8 unit/100 μ l, bovine liver유래인 경우에는 0.05 unit/100 μ l로 한 후 pH 3.5의 완충액에서 37°C, 24시간 반응을 시킨후 반응성을 확인하였다. β -galactosidase의 상대적인 활성도는 시약을 가하지 않은 경우의 흡광도를 100%로 하고 얻어지는 흡광도의 상대적인 %를 구하였다.

실험결과 및 고찰

Asialofetuin에 대한 lectin의 결합 농도 - Asialofetuin의 농도를 0.625~20 μ g/ml로 희석하고 lectin의 농도를 10, 25, 50 μ g/ml로 하여 415 nm에서 Microplate Reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 그 결과, asialofetuin의 비환원 말단에 존재하는 galactose와의 특이적으로 결합하는 RCA₁₂₀과의 반응에서는 asialofetuin의 농도가 증가함에 따라 흡광도도 증가하였다. 이는 asialofetuin의 경우 Gal β 1-4GlcNAc이 비환원말단에 결합되어 galactose가 표면에 노출되

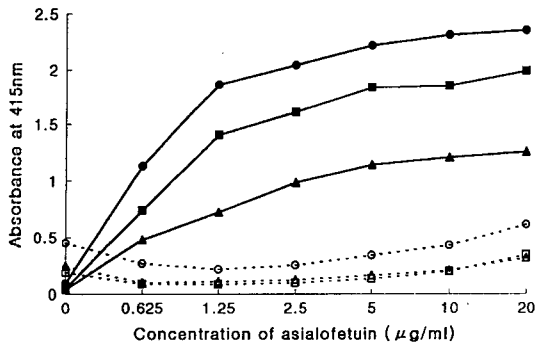


Fig. 2 - Binding of RCA₁₂₀ (filled) and BS-II (open) lectin to asialofetuin as a concentration of 50 (●), 25(■), and 10(▲) µg/ml.

어 있으므로 RCA₁₂₀과 galactose가 강한 결합력을 나타낸 것을 나타내며, GlcNAc과 결합하는 BS-II는 asialofetuin과 거의 결합을 하지 않은 것을 알 수 있었다(Fig. 2). 이 결과에 의해 비교적 낮은 농도의 asialofetuin의 경우에도 RCA₁₂₀은 asialofetuin의 galactose와 결합력을 나타낸다는 것을 알 수 있었고, 이하 asialofetuin의 농도는 5 µg/ml, lectin의 농도는 10 µg/ml로 하여 실험을 실시하였다.

β-galactosidase의 반응 최적 pH - pH 3.5, 4.5, 5.5, 6.5, 7.5의 각 완충액에 용해하여 β-galactosidase의 반응성을 확인한 결과, *A. oryzae* 유래는 pH 3.5와 pH 6.5에서 비교적 높은 반응성을 나타내었으며, bovine liver, *S. fragilis* 유래는 pH 3.5, 4.5, 5.5에서는 비슷한 반응성을 나타낸 반면 pH 6.5이상에서는 현저하게 반응성이 저하하였다(Fig. 3). 이 결과로 앞에서 서술한 다른 유래의 β-galactosidase가 반응을 나타내는 데에 최적 pH가 그 기원에 따라 차이가 나는 것과 같이 본 효소들도 적정 pH가 각각 다른 것을 확인하였다.

β-galactosidase의 유효농도 및 적정온도 - β-galactosidase를 각각 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 unit로 하여 37°C에서 반응시킨 결과, *A. oryzae*, *S. fragilis* 유래는 농도가 높아질수록 반응성이 높아지는 결과가 나타났으나, bovine liver 유래의 경우에는 0.05 unit에서 반응성이 가장 높았으며 그 이상으로 농도가 커져도 큰 차이가 없었다(Fig. 4). 여기에서 나타내는 unit는 1.0 µmol의 *o*-nitrophenyl β-D-galactoside를 *o*-nitrophenol과 *D*-galactose로 가수분해하는 양을 1 unit로 하였으며, unit를 효소의 농도로 환

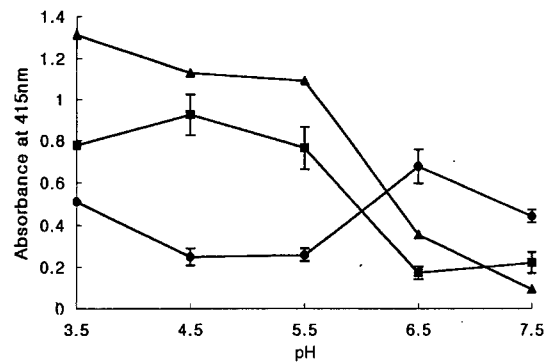


Fig. 3 - Effect of pH on the activity of β-galactosidases from *A. oryzae* (●), bovine liver (■) and *S. fragilis* (▲) at 37°C for 24 hrs. Each value represents mean ± S.D. (n=3).

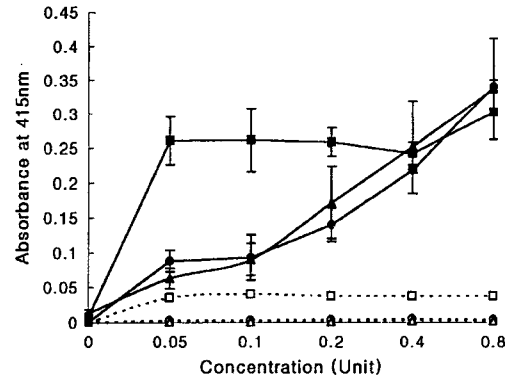


Fig. 4 - Effect of concentration and temperature on the activity of β-galactosidases from *A. oryzae* (●), bovine liver (■) and *S. fragilis* (▲) at 37°C (filled) and 20°C (open). The protein concentration represented 9.0, 0.17 and 4.6 unit/mg protein. Each value represents mean ± S.D. (n=3).

산하면 *A. oryzae*, bovine liver, *S. fragilis* 유래 9.0, 0.17, 4.6 unit가 각각 효소 1 mg에 해당하고, 반응성이 높은 0.8, 0.05, 0.8 unit를 유효농도로 다시 환산하면 각각 0.09, 0.29, 0.17 mg/100 µl에 해당한다. 1 unit 이상의 경우에는 β-galactosidase가 완충액에 완전히 용해되지 않아 실험을 실시하지 않았다. 또한, 같은 실험을 20°C에서 실시한 결과, 37°C에 비해 반응이 거의 이루어지지 않았음을 알 수 있었다.

β-galactosidase의 반응 시간 - β-galactosidase를 2, 8, 16, 24시간 반응시킨 결과, 반응시간이 길어질수록 반응성이 높게 나왔다(Fig. 5). 이는 β-galactosidase가 반응을 나타내는데에는 24시간 혹은 그 이

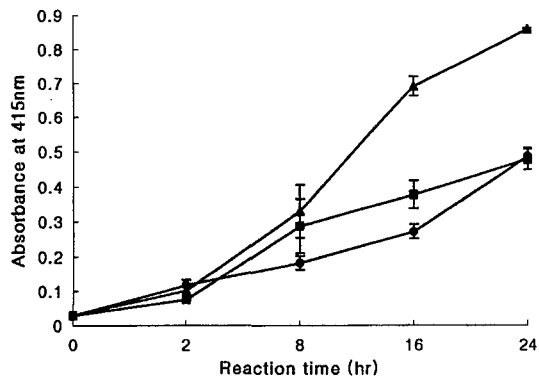


Fig. 5 - Effect of reaction time on the activity of β-galactosidases from *A. oryzae* (●), bovine liver (■) and *S. fragilis* (▲). Each value represents mean ± S.D. (n=3).

Table I - Effects of metal ions on the activity of β-galactosidases from *A. oryzae*, bovine liver and *S. fragilis*

Compound	Final conc. (mM)	Relative activity (%)		
		<i>A. oryzae</i>	Bovine liver	<i>S. fragilis</i>
None		100	100	100
	0.1	68	70	42
SDS	1	41	19	13
	10	25	13	9
	100	33	10	9
	0.1	76	92	105
KCl	1	85	92	104
	10	94	92	101
	100	141	103	51
	0.1	75	87	106
NaCl	1	81	87	104
	10	91	88	75
	100	158	74	75
	0.1	90	97	104
CuCl ₂	1	79	87	102
	10	44	81	49
	100	81	71	66
	0.1	77	104	92
MnCl ₂	1	80	104	102
	10	73	92	109
	100	64	85	52
	0.1	64	98	108
MgCl ₂	1	74	96	105
	10	75	100	109
	100	112	115	86
	0.1	79	99	106
CaCl ₂	1	91	99	101
	10	81	100	103
	100	107	110	92

Table I - Continued

Compound	Final conc. (mM)	Relative activity (%)		
		<i>A. oryzae</i>	Bovine liver	<i>S. fragilis</i>
BaCl ₂	0.1	84	104	110
	1	82	111	110
	10	70	114	103
	100	84	127	88
ZnCl ₂	0.1	76	95	107
	1	65	97	111
	10	45	70	93
	100	62	110	125
CoCl ₂	0.1	111	107	122
	1	100	102	119
	10	84	101	122
	100	101	99	80
FeCl ₂	0.1	79	87	94
	1	135	21	13
	10	86	7	4
	100	N.D.	N.D.	N.D.
FeCl ₃	0.1	74	85	96
	1	144	29	16
	10	113	6	0
	100	44	52	78

N.D. is not determined

상의 충분한 반응 시간이 필요함을 나타내는 것이다.

변성제 및 금속이온이 β-galactosidase의 활성에 미치는 영향 - Table I에 그 결과를 나타내었으며, 금속이온을 첨가하지 않은 경우를 100% 반응성이 있는 것으로 한 경우, 변성제인 SDS를 가하였을 때 3종류 β-galactosidase의 반응성이 현저하게 저하하였다.

A. oryzae 유래는 100 mM K⁺, Na⁺이온의 경우 각각 141%, 158%로 반응성이 증가하였으나, Cu²⁺, Mn²⁺, Ba²⁺, Zn²⁺이온의 경우 반응성이 현저하게 감소하였다. 특히 10 mM Cu²⁺는 44%, 10 mM Zn²⁺은 45%로 감소하였다. 그러나, Mg²⁺, Ca²⁺, Co²⁺는 큰 영향을 미치지 않았다. 한편, Fe²⁺, Fe³⁺은 1 mM을 가한 경우에는 반응성이 증가하였으나 10 mM 혹은 100 mM에서는 오히려 반응성이 저하하였다.

Bovine liver 유래는 Mg²⁺, Ca²⁺, Ba²⁺이온의 경우, 농도가 높아질수록 반응성이 약간 증가하였으며, Na⁺, Cu²⁺는 농도가 높아질수록 반응성이 저하하였다. Fe 이온의 경우는 2가, 3가 모두 1 mM, 10 mM에서 반응성이 현저하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

한편, *S. fragilis* 유래는, 금속이온의 종류에 관계없

이 0.1 mM과 1 mM에서 반응성이 약간 증가하였으나, 10 mM 혹은 100 mM에서는 반응성이 감소하였다. 특히 100 mM K⁺과 100 mM Mn²⁺이온에서 각각 51%, 52%로 현저하게 감소하였으며 10 mM Cu²⁺은 49%까지 감소하였다. Co²⁺이온은 10 mM에서 활성이 약간 증가하였으나, 100 mM에서는 반응성이 저하하였다. Fe이온의 경우 2가, 3가 모두 bovine liver 유래와 같이 1 mM, 10 mM에서 거의 반응성을 나타내지 못하였다.

결 론

당말단 가수분해효소 중 당단백질에 대한 반응조건이 현재까지 보고되고 있지 않은 *A. oryzae*, bovine liver, *S. fragilis* 유래의 β -galactosidase를 대상으로 반응조건을 연구하였으며, 특히 반응성을 확인하는데 특정 당을 인식하는 lectin을 이용하여 소량의 시료로 확인할 수 있는 유용한 방법임을 확인하게 되었다. 그 결과 반응 최적 pH는 3.5, 3.6(*A. oryzae*), 3.5~5.5 (bovine liver, *S. fragilis*) 반응 적정온도는 37°C, 반응시간은 24시간이며, 유효농도는 *A. oryzae* 유래 0.09 mg/100 μ l, bovine liver 유래 0.29 mg/100 μ l, *S. fragilis* 유래 0.17 mg/100 μ l임을 알 수 있었다. 또한, 변성제와 Cu²⁺ 이온에 의해서는 반응성이 현저하게 저하되며 기타 금속이온에 의해서는 반응성의 향상 혹은 저하가 각각 금속이온 및 그 농도에 따라 다른 결과를 나타내었다.

본 연구에서 실시한 lectin의 당 결합 특이성을 이용한 β -galactosidase의 반응성 확인은 당의 구조를 연구하는데 매우 유용하며 당단백질에 있어서 당이 단백질의 구조, 기능에 미치는 영향등을 연구하는데 있어 대단히 중요한 자료를 제공할 것이며, 특히, *S. fragilis* 유래의 β -galactosidase에 대한 연구는 그 유용성이 거의 보고된 바가 없는 것으로 부터 이 효소에 대한 사용 가능성이 보다 확대 될 것으로 기대된다. 현재는 asialofetuin중에서 N-linked triantennary complex-type 만의 구조를 갖는 당펩타이드를 분리하고 형광분석법을 적용하여 lectin에 의한 결과와 비교 연구하고 있다.

감사의 말씀

이 연구는 1999학년도 중앙대학교 연구기자재 구입

지원프로그램의 도움을 받아 수행한 결과이며 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) Kobata, A. : Use of endo- and exoglycosidases for structural studies of glycoconjugates. *Anal. Biochem.*, **100**, 1 (1979).
- 2) Rademacher T. W., Parekh R. B., and Dwek R. A. : Glycobiology. *Annu. Rev. Biochem.*, **57**, 785 (1988).
- 3) Hiraiwa M., and Uda Y. : GM1 ganglioside beta-galactosidases from Bovine liver, *Jpn. J. Exp. Med.*, **58**, 129 (1988).
- 4) Stahl, P, Rodman, J., Miller, J. and Schlesinger, P. : Evidence for receptor-mediated binding of glycoproteins, glycoconjugates, and lysosomal glycosidase by alveolar macrophages. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **75**, 1399 (1978).
- 5) Martinez-Bilbao, M. and Huber, R. E. : The activation of β -galactosidase (*E. coli*) by Mg(2+) at lower pH values. *Biochem Cell Biol.*, **74**, 295 (1996).
- 6) Zeleny R, Altmann F, and Praznik : A capillary electrophoretic study on the specificity of β -galactosidases from *Aspergillus oryzae*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Canavalia ensiformis* (Jack bean). *Anal. Biochem.* **246**, 96 (1997).
- 7) Kiyohara T, Terao T, Shioiri-Nakano K, Osawa T : Purification and properties of a neuraminidase from *Streptococcus K 6646*. *Arch. Biochem. Biophys.* **164**, 575 (1977).
- 8) Tanaka, Y., Kagamiishi, A., Kiuchi, A. and Horiuchi, T. : Purification and Properties of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *J. Biochem.*, **77**, 241 (1975).
- 9) Harris, P. J., Henry, R. J., Blakeney, A. B., and Stone, B. A. : An improved procedure for the methylation analysis of oligosaccharides and polysaccharides, *Carbohydr. Res.*, **127**, 59 (1984).
- 10) Taylor, S. A., Richardson, A. C., Smith, B. V. and Price, R. G. : Comparison of several new chromogenic galactosides as substrates for various β -D-galactosidases. *Biochem Biophys Acta*, **1163**, 54-60 (1993).
- 11) M. Potier, L. Mamel, M. Bilis, L. Dallaire and S. B. Melancon : Fluorometric assay of neuraminidase with a sodium (4-methylumbelliferyl- α -D-N-acetylne-

- uraminate) substrate. *Anal. Biochem.*, **94**, 287 (1979).
- 12) Bhavanandan, V. P., Yen, A. K. and Carubelli, R. : Neuraminidase assay utilizing sialyl-oligosaccharide substrates with tritium-labeled aglycone. *Anal. Biochem.*, **69**, 385 (1975).
- 13) K. Ogura, M. Ogura, R. L. Anderson and C. C. Sweely : Peroxidase-amplified assay of sialidase activity toward ganglioside. *Anal. Biochem.*, **200**, 52 (1992).
- 14) T. Nagai and H. Yamada : Assay for sialidase using erythrocytes and peroxidase-labeled peanut lectin. *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 2243 (1989).
- 15) Mandal, D. K. and Brewer, C. F. : Cross-linking activity of 14-kilodalton β -galactoside-specific vertebrate lectin with asialofetuin : Comparison with several galactose-specific plant lectins. *Biochemistry*, **31**, 8465 (1992).
- 16) Parkkinen, J. and Oksanen, J. : A lectin-Immunofluorometric assay using an immobilized *Bandeiraea simplicifolia* II lectin for the determination of galactosylation variants of glycoproteins. *Anal. Biochem.*, **177**, 383 (1989).
- 17) Nagai, T. and Yamada, H. : Assay of sialidase using erythrocytes and peroxidase-labeled peanut lectin. *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 2243 (1989).
- 18) Onodera, S. : A microplate assay for sialidase activity using plant lectin binding to *N*-acetylgalactosamine. *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 29 (1994).
- 19) J. V. Baenziger and D. Fiete : Structure of the complex oligosaccharides of fetuin. *J. Biol. Chem.*, **254**, 289 (1979).
- 20) S. Takasaki and A. Kobata : Asparagine-linked sugar chains of fetuin : Occurrence of tetrasialyl triantennary sugar chains containing the Gal β 1 \rightarrow 3GlcNAc sequence. *Biochemistry*, **25**, 5709 (1986).
- 21) Hampel D. J, Kottgen B, Dudenhausen J. W, Kottgen E : Fetal fibronectin as a marker for an imminent (preterm) delivery. A new technique using the glycoprotein lectin immunosorbent assay. *J. Immunol. Methods*, **224**, 31 (1999).