

*Rhizopus oryzae*로부터 정제한 두가지형의 Glucoamylase의 酵素的 特性

許元寧·鄭萬在*

蓮庵畜産園芸 專門大學 · *忠北大學校 農科大學 食品加工學科

Enzymatic Characteristics of Two Forms of the Purified Glucoamylase from *Rhizopus oryzae*

Won Nyong Hou and Man Jae Chung*

Yonam Junior College of Livestock and Horticulture, Sunghwan

*Department of Food Science and Technology, Chungbuk National University, Chunggu

Abstract

These experiments were conducted to investigate general enzymatic characteristics of two forms (glucoamylase I and glucoamylase II) of the purified glucoamylase produced by *Rhizopus oryzae*. Molecular weights of glucoamylase I and glucoamylase II estimated by Sephadex G-100 gel filtration, were approximately 101,000 and 115,000, respectively, and those estimated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis being 120,000 and 127,000, respectively. Isoelectric points of the above enzyme were pH 7.25 and pH 7.75. The optimum temperature was 50°C and the enzyme was stable below 45°C. Optimum pH of both glucoamylase I and glucoamylase II was about pH 5.0. The stable pH range of them were pH 3.5-8.0 and 4.5-8.0, respectively. Michaelis constants of glucoamylase I and glucoamylase II toward soluble starch were 4.545 mg/ml and 5.560 mg/ml, respectively. Hg⁺⁺, Pb⁺⁺, p-CMB and IAA were inhibitors of glucoamylase I and Hg⁺⁺, Mn⁺⁺, p-CMB and IAA were inhibitors of glucoamylase II.

序 論

前報⁽¹⁾에서 報告한 바와 같이 *Rhizopus oryzae* 가 強力하게 生産하는 glucoamylase를 硫酸分劃, DEAE-cellulose와 CM-cellulose column chromatography에 의하여 glucoamylase I (G I) 과 glucoamylase II (G II) 로 分離精製하고 精製酵素 各各의 polyacrylamide disc gel electrophoresis, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis에 의하여 單一한 蛋白質임을 確認하고 電氣泳動한 gel의 沃度染色으로 glucoamylase의 活性을, periodic acid Schiff's staining에 의하여 glucoamylase의 구성단백질이 glycoprotein임을 檢討하였다.

本報에서는 두가지의 精製 glucoamylase의 酵素的 特性을 各各적으로 검토하고 그결과를 報告하는 바이다.

材料 및 方法

蛋白質 標準蛋白質

Bovine serum albumin, aldolase, chymotrypsinogen A, hen egg albumin (Boehringer Mannheim Combiteh社製品)

酵素單位

酵素單位는 1분간에 1 μmole의 glucose에 相當하는 還元糖을 遊離하는 酵素量을 1 unit로 하였다.

SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis

Shapiro등⁽²⁾, Weber등⁽³⁾의 方法에 따라 0.1% SDS (sodium dodecyl sulfate)를 함유한 10% gel을 사

용하여泳動하였으며, 이 때 酵素蛋白質은 10mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)로 透析하고 1% SDS와 8M의 urea를 함유하는 10mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)에 넣어 37°C에서 3시간 處理하여 變性시켰다⁽⁴⁾. 酵素蛋白質은 gel當 10μg로 조절하였으며, gel當 8mA의 電流로 4시간 電氣泳動을 實施하고 1% amido black 10B로 1시간 染色한 後 7% acetic acid로 脱色하였다.

Gel Electrofocusing⁽⁵⁻⁷⁾

pH 3.5~10.0의 ampholine을 使用하여 實施하였다. 電極液은 (+)極에 0.02M H₃PO₄, (-)極에는 1M NaOH를 使用하였으며, 徐徐히 電壓을 올려 350V에서 4시간 通電하였다. Gel electrofocusing은 2개를 並行하였으며, 그중 1개는 5mm 간격으로 切斷하고, 2ml의 증류수에 넣어 24시간 浸出한 後 pH와 glucoamylase activity를 測定하였다. 나머지 1개는 5%TCA로 充分히 ampholine을 除去한 後 1% amido black 10B로 染色하고 脱色하였다.

Void Volume 과 Bed Volume의 測定

Sephadex G-100 (medium) 25g를 沸騰水浴中에서 5시간 攪拌시켜 冷却시킨 다음 column (25×78cm)에 充填하여 50mM acetate buffer (pH 5.0)로 平衡化시킨 다음 blue dextran (M. W. 2,000,000)과 dinitrophenyl-

alanine (M. W. 256)을 1mg씩 0.5ml의 증류수에 녹여 column에 注入하고 同一緩衝液으로 分割하였다. 이 때 溶出速度는 時間當 10ml였으며, 4ml씩 分割하였다.

結果 및 考察

分子量의 測定

Andrew의 方法⁽⁸⁾에 따라 分子量을 推定하기 위하여 標準蛋白質 및 GI과 GII를 Sephadex G-100으로 gel濾過하여 求한 Kav (partition coefficient)와 標準蛋白質의 log molecular weight를 좌표상에 plot한 結果는 Fig. 1과 같았으며 GI과 GII의 分子量은 各各 101,000과 115,000이었다.

Segrest등⁽⁹⁾에 依하면 glycoprotein인 경우 質量에 比하여 相對的으로 蛋白質에 結合하는 SDS의 量이 적으므로 charge의 減少를 招來하고 이런 理由로 標準蛋白質에 比하여 移動度가 낮음으로 SDS-polyacrylamide gel을 利用한 分子量 測定時에는 實質 分子量보다 큰 값을 나타내며, 이것은 acrylamide gel의 濃度を 높임으로써 어느정도 보상될 수 있었다고 하였으므로, 本酵素가 glycoprotein임을 考濾하여 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis에 依한 分子量의 測定에 있어서는 10% acrylamide gel로 泳動하였으며 그 結果는 Fig. 2에서와 같이 GI, GII의 分子量은 各各 120,000과 127,000으로 推定되었다.

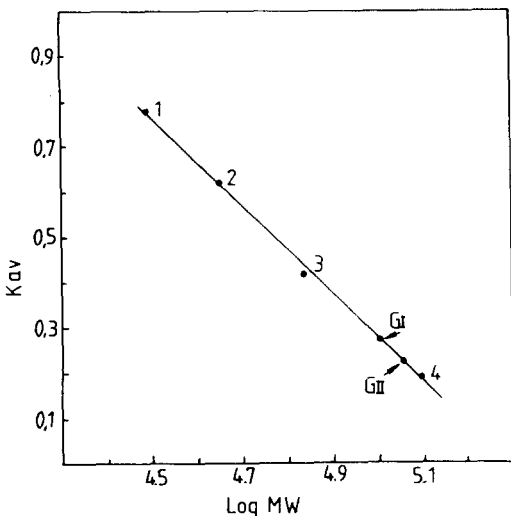


Fig. 1. Estimation of molecular weight of the two purified glucoamylases by Sephadex G-100 gel filtration
 1; chymotrypsinogen A (M. W. 25,000)
 2; hen egg albumin (M. W. 45,000)
 3; bovine serum albumin (M. W. 68,000)
 4; aldolase (M. W. 158,000)

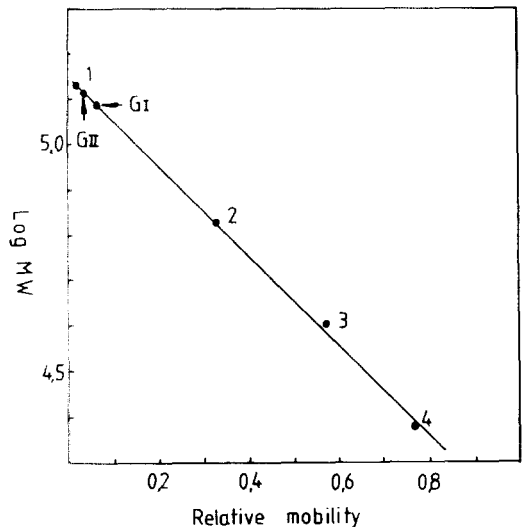


Fig. 2. Estimation of molecular weight of the two purified glucoamylase by SDS polyacrylamide gel electrophoresis
 1; Bovine serum albumin, dimer (M. W. 136,000)
 2; Bovine serum albumin, monomer (M. W. 68,000)
 3; Aldolase (M. W. 40,000)
 4; Chymotrypsinogen A (M. W. 25,000)

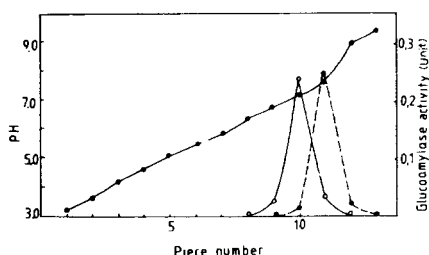


Fig. 3. Gel electrofocusing of the two purified glucoamylases

○—○; GI, ●—●; GII, ●—● pH, Ampholine; pH 3.5—10.0

Takahashi⁽⁴⁾는 *Rhiz. sp*로 부터 세가지 glucoamylase를分離精製하였고 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis에 依하여 測定한 glucoamylase I, II, III의 分子量은 各各 95,000, 72,000, 81,000이라고 報告하였고, Yamasaki 등^(10,11)은 *Asp. awamori*의 glucoamylase는 83,700~88,000이고 *Muc. rouxianus*의 glucoamylase I과 II는 各各 59,000, 49,000이라는 報告와 比較할 때 GI과 GII의 分子量은 이들에 比하여 큰값을 나타내고 있다.

等電點의 測定

GI과 GII의 gel electrofocusing을 各各의 酵素에

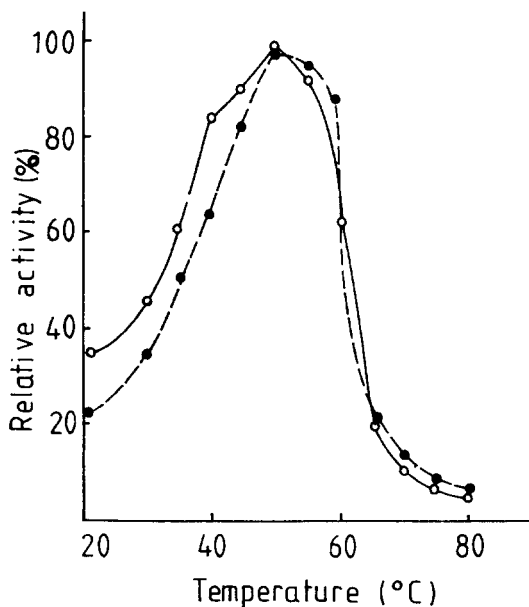


Fig. 4. Effect of reaction temperature on the two purified glucoamylases

The composition of mixture consisted of 100μl of soluble starch, 10μl of glucoamylase I and II (0.36U, respectively) and 90μl of acetate buffer (pH 5.0). The reaction was carried out for 10min at various temperature as indicated. ○—○; GI, ●—●; GII

차하여 2 개씩 竝行 實施한 結果는 Fig. 3 과 같이 GI와 GII의 等電點은 各各 pH 7.25, pH 7.75 附近이었다.

Muc. rouxianus⁽¹²⁾, *Pen. oxalicum*⁽¹³⁾, *Rhiz. delemar*^(4,14) 등의 glucoamylase는 等電點이 pH 7.0~8.8 범위에 드는데 本菌株가 生産하는 GI, GII도 이들과 類似的한 等電點을 나타내고 있다.

酵素作用에 미치는 溫度의 影響

1% soluble starch를 基質로 하여 所定溫度에서 glucoamylase의 活性을 測定한 結果는 Fig. 4와 같이 GI과 GII의 反應 最適溫度는 50°C이며 65°C 以上에서는 活性이 급격하게 減少되었다.

다른 glucoamylase의 경우와 比較하여 보면 *Rhiz. delemar*의 glucoamylase⁽¹⁵⁾는 40°C, *Rhiz. niveus* glucoamylase⁽¹⁶⁾는 60°C, *Pen. oxalicum*의 glucoamylase⁽¹⁴⁾는 55~60°C, *Muc. rouxianus*의 glucoamylase⁽¹²⁾는 55°C라고 報告된 바 있는데 本菌株의 glucoamylase의 最適溫度는 *Rhiz. delemar* 보다 높고 타균주의 것과는 비슷하였다.

酵素的 安全性에 미치는 溫度의 影響

GI과 GII를 所定溫度에서 30分 前處理한 後 殘存

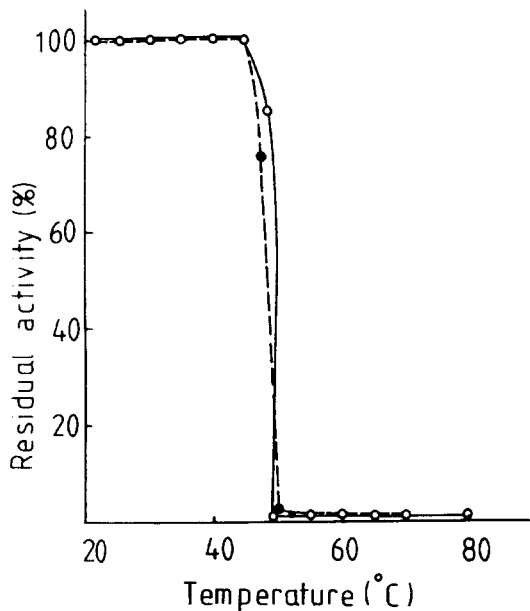


Fig. 5. Thermal stability of the two purified glucoamylases

Each solution of glucoamylase I and II (10μl, 0.36U, respectively) was preincubated for 30min. at various temperature with 90μl of 0.5mM acetate buffer (pH 5.0). After preincubation, the residual glucoamylase activity was measured. ○—○; GI, ●—●; GII

활성을測定한 결과는 Fig. 5와 같이 GI과 GII는 다 같이 45°C에서失活되기始作하여 48°C에서 75~80%의殘存活性을 나타내고 50°C에서는 완전히失活되었다.

Muc. rouxianus glucoamylase⁽¹²⁾는 50°C에서 15分處理로, *Rhiz. javanicus*의 saccharogenic amylase⁽¹⁷⁾는 50°C에서 24時間處理로安定하고, *Rhiz. delemar*와 *Rhiz. niveus*의 glucoamylase⁽¹⁶⁾는 50°C에서 10分處理하였을 때失活되기 시작하고, *Asp. awamori*의耐酸性 saccharogenic amylase⁽¹⁸⁾는 40°C에서 24時間處理하였을 때失活되기始作하였고同菌株의非耐酸性 saccharogenic amylase⁽¹⁹⁾는 40°C에서는安定하나 50°C에서는不安定하다고報告된 바 있는데,本菌株가生産하는 glucoamylase는一般的으로耐熱성이弱한편에屬하였다.

酵素의作用에 미치는 pH의影響

Citrate buffer (pH 1.0~2.5), McIlvaine buffer (pH 2.6~8.0) 및 Atkins-pantin buffer (pH 8.1~9.0)를 사용하여 soluble starch의 pH를 1.0~9.0으로 조절하고 활성을測定한 결과는 Fig. 6과 같이 GI과 GII는 pH 5.0附近에서最適pH를 나타내었다. *Rhiz. delemar*⁽¹⁵⁾, *Lentinus edodes*⁽²⁰⁾, *Asp. awamori*^(18, 21), *Pen. oxalicum*⁽¹³⁾, *Muc. rouxianus*⁽¹²⁾의 glucoamylase의最適pH는 pH 4.5~4.6이고 *Rhiz. javanicus*⁽¹⁷⁾의 glucoamylase는 pH 5.0~5.2, *Asp. niger*의 glucoam-

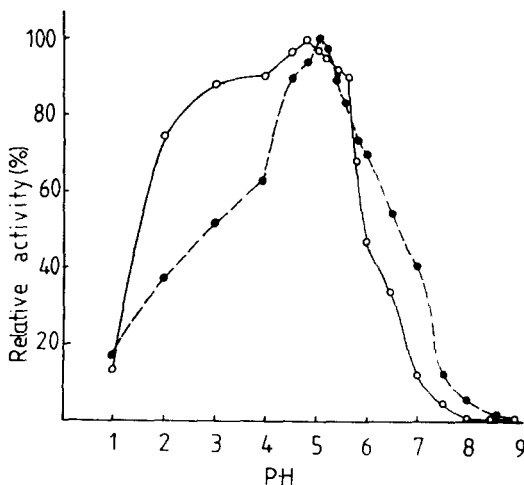


Fig. 6. pH dependence of the two purified glucoamylases
Buffer solutions used were citrate buffer for pH 1.0 to 2.5, McIlvaine buffer for pH 2.6 to 8.0 and Atkins-Pantin buffer for pH 8.1 to 9.0. ○-○; GI, ●-●; GII

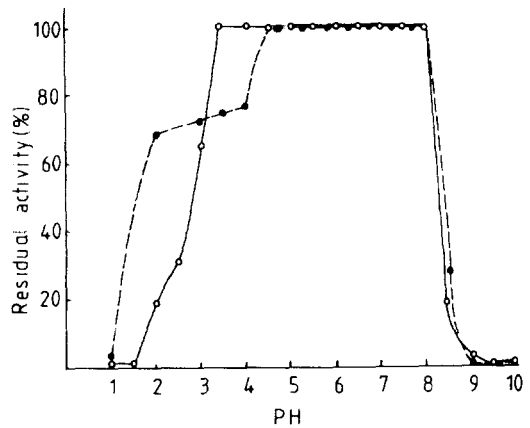


Fig. 7. pH stability of the two purified glucoamylases
The solution of glucoamylase I and II (10μl, 0.36 U, respectively) were preincubated for 48 hrs at 4°C with 50μl of various buffer solutions. Each preincubated mixture was mixed with 500μl of acetate buffer (pH 5.0). To 100μl of this mixture, 100μl of 1% soluble starch (pH 5.0) was added and the residual glucoamylase activity was measured.
○-○; GI, ●-●; GII

ylase는 pH 4.5~5.0이라는報告와比較할 때本菌株의 glucoamylase도 이들의結果와 비슷하였다.

酵素의安定성에 미치는 pH의影響

各種緩衝液 (pH 1.0~10.0)에 酵素液을同量넣어 4°C에서 48時間放置한後 1M acetate buffer로 pH를 5.0으로 조절하고 활성을測定한 결과는 Fig. 7과 같이 GI은 pH 3.5~8.0 범위에서安定하고 GII는 pH 4.5~8.0의 범위에서安定하였다.

*Rhiz. niveus*와 *Rhiz. delemar*의 glucoamylase⁽¹⁶⁾는 pH 4.0~8.5, *Rhiz. javanicus*⁽¹⁷⁾, *Muc. rouxianus*⁽¹²⁾의 glucoamylase는 각각 pH 3.5~8.0, pH 4.0~8.0에서安定하였다는報告와比較할 때本菌株가生産하는 glucoamylase의 pH安定범위는 대체로 이들과類似하였다.

Michaelis 상수

Soluble starch의濃度를 ml當 1~10mg으로 조절하고 37°C에서 10분간 반응시켜 初期分解速度를測定하고基質濃度와의關係를 Lineweaver-Burk의方法⁽²²⁾에 따라 plot한 결과는 Fig. 8과 같으며 그래프로부터求한 soluble starch에 대한 Michaelis 상수(K_m)는 GI이 4.545mg/ml, GII가 5.560mg/ml이고 또한 각각의 V_{max}는 55.56 μmole/min mg protein, 100 μmole/min mg protein이었다.

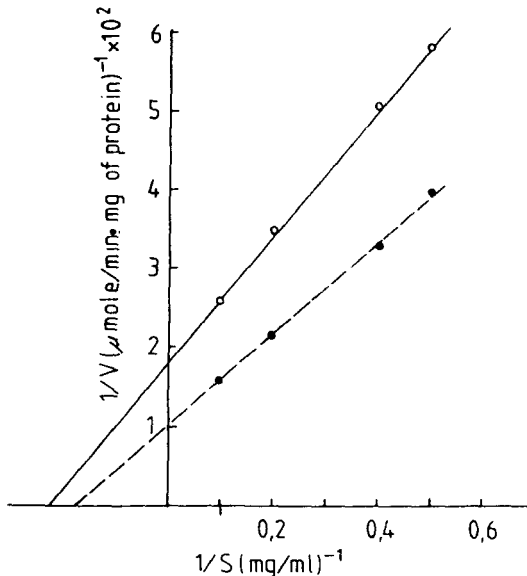


Fig. 8. Effect of soluble starch concentration on the two purified glucoamylases
 The reaction mixture containing 10 μl of glucoamylase solution (GI; 0.72 U, GII; 0.73 U), 990 μl of 50mM acetate buffer (pH 5.0) and indicated amounts of substrate were incubated at 37°C for 10min.
 ○—○; GI, ●—●; GII

金屬 ion 및 酵素 阻害劑의 影響

酵素液에 各種 金屬 ion 및 阻害劑를 넣어 所定濃度가 되도록 조절하고 37°C에서 30分間 前處理한 後 活性를 測定한 結果는 Table 1과 같다.

GI은 Hg⁺⁺, Pb⁺⁺, p-CMB, IAA에 의하여, GII는 Hg⁺⁺, Mn⁺⁺, p-CMB, IAA에 의하여 阻害되었다.

*Muc. rouxianus*의 glucoamylase⁽¹²⁾는 Hg⁺⁺와 Pb⁺⁺에 의하여 阻害되고, *Lentinus edodes*의 glucoamylase⁽²⁰⁾와 *Asp. awamori*의 glucoamylase⁽²¹⁾는 Al⁺⁺⁺, Hg⁺⁺, Pb⁺⁺에 의하여 阻害된다고 報告한 바 있는데 本菌株가 生産하는 glucoamylase도 Hg⁺⁺와 Pb⁺⁺에 의하여 阻害되는 것은 이들 酵素와 같았다.

要 約

*Rhiz. oryzae*가 生産한 精製酵素 glucoamylase I (GI)과 glucoamylase II (GII)의 一般的인 酵素的特性을 調査하였다. Glucoamylase I과 II의 gel filtration에 의하여 推定된 分子量은 各各 101,000, 115,000 이었고, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis에 의하여 推定된 分子量은 120,000, 127,000이었다. Glucoamylase I과 II의 等電點은 各各 pH 7.25, pH 7.75이

Table 1. Effect of metal ions and inhibitors on the two glucoamylases

Metal ions & inhibitors	Concentration (mM)	Relative glucoamylase activity (%)	
		GI	GII
None	0	100.0	100.0
CH ₃ COONa	5	100.0	117.5
Al ₂ (SO ₄) ₃	5	97.3	108.8
BaCl ₂	5	100.3	117.5
CaCl ₂	5	98.8	119.3
Cu(CH ₃ COO) ₂	5	91.9	91.2
HgCl ₂	5	12.6	52.6
KCl	5	86.6	108.8
MnCl ₂	5	77.4	56.1
NaCl	5	94.3	106.1
MgSO ₄	5	104.2	126.3
Pb(CH ₃ COO) ₂	5	59.8	87.7
Zn(CH ₃ COO) ₂	5	97.3	108.8
EDTA	5	99.6	98.2
CoCl ₂	5	99.6	110.5
IAA	0.05	45.8	34.0
PCMB	0.05	17.6	50.9

IAA; Iodoacetamide

PCMB; p-chloromercuribenzoate

Each mixture solution containing 10 μl of glucoamylase solution (GI and GII 0.36 U, respectively), 200 μl of 20mM metal ion solution (or 0.2mM inhibitors solution) in deionized water, and 590 μl of acetate buffer (pH 5.0) was preincubated at 37°C for 30min. After preincubation, 100 μl of 1% soluble starch was added and the resulting mixture was incubated at 37°C for 10min.

었고 反應 最適溫度는 다같이 50°C, 安定溫度範圍는 45°C 以下이었다. Glucoamylase I과 II의 最適pH는 다같이 pH5.0附近이었으며, 安定pH範圍는 各各 pH3.5~8.0, pH4.5~8.0이었다. 可溶性澱粉에 對한 Michaelis 상수는 glucoamylase I이 4.545mg/ml, glucoamylase II가 5.560mg/ml이었다. Glucoamylase I은 Hg⁺⁺, Pb⁺⁺, p-CMB, IAA에 의하여, glucoamylase II는 Hg⁺⁺, Mn⁺⁺, p-CMB, IAA에 의하여 阻害되었다.

文 獻

1. 許元寧 鄭萬在 : 한국식품과학회지, 16, 322 (1984)
2. Shapiro, A.L., Vinuela, E. and Maizel, J.V.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28, 815 (1967)
3. Weber, K. and Osborn, M.: *J. Biol. Chem.*, 244, 4406 (1969)

4. Takahashi, T., Tsuchida, Y. and Irie, M.: *J. Biochem.*, **84**, 1183 (1978)
5. Wrigley, C.W.: *J. Chromatog.*, **36**, 362 (1968)
6. Wrigley, C.W.: *Method in Enzymology*, **22**, 559 (1971)
7. Vesterberg, O.: *Method in Enzymology*, **22**, 389 (1971)
8. Andrew, P.: *Biochem. J.*, **91**, 222 (1964)
9. Segrest, J.P. and Jackson, R.L.: *Method in Enzymology*, **28**, 54 (1972)
10. Yamasaki, Y., Suzuki, Y. and Ozawa, J.: *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 2149 (1977)
11. Yamasaki, Y., Tsuboi, A. and Suzuki, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 543 (1974)
12. Yamasaki, Y., Tsuboi, A. and Suzuki, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 2139 (1977)
13. Yamasaki, Y., Suzuki, Y. and Ozawa, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 755 (1977)
14. 辻阪好夫, 福本壽一郎: 科学と工業, **30**, 398 (1956)
15. Phillips, L.L. and Caldwell, M.L.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **73**, 3559 (1951)
16. SEIKAGAKU KOGYO CO., LTD'S Pamplet: Theme "Glucoamylase (EC 3.2.1.3) from *Rhizopus niveus*, *Rhizopus delemar*", (1979)
17. Watanabe, K. and Fukimbara, T.: *J. Ferment. Technol.*, **46**, 992 (1968)
18. Watanabe, K. and Fukimbara, T.: *J. Ferment. Technol.*, **46**, 992 (1968)
19. Watanabe, K. and Fukimbara, T.: *J. Ferment. Technol.*, **44**, 392 (1966)
20. Yamasaki, Y. and Suzuki, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 971 (1978)
21. Yamasaki, Y., Suzuki, Y. and Ozawa, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 2149 (1977)
22. Lineback, D.R., Russell, I.J. and Rasmussen, C.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **134**, 539 (1969)
23. Lineweaver, H. and Burk, D.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **56**, 658 (1934)

(1984년 7월 18일 접수)