

β -Mannanase 群의 精製 및 그들의 性質에 關한 研究

李 瑞 來

서울대학교 農科大學 農化學科

(1965年 12月 20日 受理)

Purification and Properties of β -Mannanases from Germinated Guar Bean

Su Rae Lee

College of Agriculture

Seoul National University

SUMMARY

1) Three β -1,4-mannanases were isolated from germinated guar bean through extraction, ammonium sulfate fractionation, column chromatography on cellulose derivatives and gel filtration on Sephadex G-100. They were designated as β -1,4-mannanase A, B and C, respectively, in the order of isolation.

2) These enzymes were different in several aspects such as pH optimum, effect of metal ions, adsorbability on cellulose derivatives, molecular weight, Michaelis constant toward reduced ivory nut mannan A, mode of action and extent of hydrolysis of the mannan.

3) β -1,4-Mannanases A and C were proposed to be two different endo-enzymes of random-splitting type producing a series of oligosaccharides from β -1,4-mannans. β -1,4-Mannanase B was suggested to be possibly an exo-type enzyme catalyzing a stepwise splitting from the non-reducing end of β -1,4-mannans to produce mannose.

4) Guaran was subjected to hydrolysis by the purified enzymes and the consequence was discussed in connection with structural requirements of the enzymes toward substituted β -1,4-mannans and their role in germinating guar seeds.

I. 緒 論

1899年 Bourquelot 及 Herissey⁽¹⁾에 의하여 mannan의 酵素的 加水分解가 최초로 發見된 以來 β -

mannanase의 活性이 여러가지 生物體中에 存在한다는 것이 많은 研究者⁽²⁾에 의하여 알려졌다. 그럼에도 불구하고 이들 酵素는 다른 多糖類 특히 glucan類의 加水分解 酵素에 比하여 훨씬 덜 研究되었다. 最近(1965年) Reese 及 Shibata의 報告⁽³⁾에 의하면 여러 微生物에서 얻은 β -1,4-mannanase는 endo型 酵素로서 β -1,4-mannan에 random으로 作用하여 寡糖類를 生成하고 이들은 다시 β -mannosidase에 의하여 mannose까지 完全히 加水分解된다. 그런데 이들 研究者 및 Courtois & Dizet⁽⁴⁾가 얻은 酵素製品은 hetero- β -D-mannoside보다 重合度가 낮은 것을 더 잘 加水分解한다는 것이다. 그러나 現在까지 β -mannanase는 純粹히 精製된 것이 하나도 없다. 그러므로 이 酵素의 性質에 관한 實驗과 多糖類의 構造 決定에의 利用은 例外없이 모두 粗酵素製品으로 이루어졌다.

荳科植物의 一種인 guar (*Cyamopsis tetragonolobus*)의 發芽種子中에 β -mannanase의 活性이 存在함은 1950年 Whistler等⁽⁵⁾에 의하여 최초로 示唆되었다. 그리하여 本研究은 guar의 發芽種子에서 β -1,4-mannoside 結合을 加水分解하는 酵素群을 分離精製하고 이들의 性質과 作用方法을 糾明하려고 試圖되었다. 이 植物種子의 저장양분인 guaran에서 galactose 基를 完全히 除去하는 α -galactosidase도 같은 給源에서 精製하여 他報⁽⁶⁾에 報告한다. 이러한 研究은 炭水化合物 加水分解 酵素의 性質을 理解하고 복잡한 多糖類의 酵素的 加水分解 機作을 糾明하며 特異性을 아는 酵素를 多糖類의 構造 決定에서 한 道具로서 使用可能케 한다는 點에서 매우 有用한 것이다.

II. 實驗材料 및 方法

(1) 酵素의 基質

還元型 ivory nut mannan A는 Aspinall等⁽⁷⁾의 方法에 準하여 精製하였으나 抽出途中에 일어날 수 있는 알카리分解를 감소시키고 酵素活性度の 測定에 장애를 일으킬 還元力을 없애기 위하여 還元過程을 거쳤다. 即 delignified ivory nut 碎片(100g)을 NaBH_4 (30g)를 녹인 7% NaOH 용액(1 liter)에 少量씩 교반하면서 加한 다음 2日間 실온에 放置한다. 可溶性物質은 遠心分離, 濾過로 分離하고 殘渣를 7% NaOH 용액(500 ml 式)으로 두번 더 抽出한다. 3회의 抽出物은 氷醋酸으로 酸性化시키고 同容量의 methanol을 가하여 mannan을 침전시킨다.

이와 같이 하여 얻은 mannan 粗製品(45g)은 銅錯鹽形成法에 의하여 두번 더 精製하였다. 이 精製된 還元型 ivory nut mannan A는 Somogyi-Nelson法^(8,9)에 의하면 還元力을 보이지 않았고 $[\alpha]_D^{22} -43^\circ(\text{c}, 0.7 \text{ in } 1 \text{ N NaOH})$. ivory nut mannan A에 대한 文獻値는 $[\alpha]_D^{15} -46^\circ(\text{c}, 0.7 \text{ in } 1 \text{ N NaOH})$ ⁽⁷⁾ 및 $[\alpha]_D^{22} -44.94^\circ(\text{c}, 0.6 \text{ in } 1 \text{ N NaOH})$ ⁽¹⁰⁾

Guaran은 市販用 guar 粉末에서 冷水에 不溶性인 成分을 除去한 후 Smith及Srivastava⁽¹¹⁾의 銅錯鹽形成法에 準하여 精製하였다. 精製品은 加水分解한 후 paper chromatography로 調査한 結果 galactose와 mannose만이 檢出되었고 末端基分析法⁽¹²⁾에 의하여 平均重合度 55를 나타냈다.

β -Nitrophenyl α -D-mannopyranoside는 Helferich反應에 의한 Jermyn變法⁽¹³⁾에 의하여 合成하였다. mp $178-180^\circ$ (白色針狀), $[\alpha]_D^{22} +185^\circ(\text{c}, 0.2 \text{ in } \text{H}_2\text{O})$. 文獻値 mp 174° (白色片狀)⁽¹³⁾ 및 181° (白色針狀)⁽¹⁴⁾, $[\alpha]_D^{22} +144.5^\circ(\text{c}, 0.2 \text{ in } \text{H}_2\text{O})$ ⁽¹³⁾. o -Nitrophenyl β -D-galactopyranoside, phenyl α -D- 및 β -D-glucopyranosides는 Sigma Chemical Co.에서 구입하였다.

(2) 試藥

β -1,4結合을 한 mannobiose, mannotriose 및 mannotetraose는 ivory nut mannan A를 酵素劑로 部分的 加水分解한 후 charcoal column 및 paper chromatography에 의하여 分離精製하였다.⁽¹⁵⁾ DEAE-cellulose는 英國의 W. & R. Balston社에서, CM-cellulose는 美國 C. Schleicher & Schuell社에서, Sephadex G-100 및 blue dextran 2,000는 瑞典 pharmacia社에서 각각 구입하였다. 其他는 市販用 上級試藥이다.

(3) 分析方法

本報에서 사용한 比色法에는 Coleman Jr. 分光光度計를 사용하였다. 還元糖은 Somogyi-Nelson法^(8,9)에 의하여, 全炭水化物은 phenol-sulfuric acid法⁽¹⁶⁾에 의하여, 그리고 o - 혹은 p -nitrophenol은 試料液 1.0 ml에 1 M Na_2CO_3 용액 1.0 ml와 증류수 5.0 ml를 가한 후 420 m μ 에서의 吸光度에 의하여 각각 定量하였다. 蛋白質은 結晶形 bovine serum albumin을 標準으로 Lowry 등의 方法⁽¹⁷⁾에 의거한 Miller變法⁽¹⁸⁾으로 定量하였다.

(4) 酵素活性度の 測定法

本報에서 取扱한 모든 酵素에 대하여 統一된 定量法과 酵素單位를 사용하려고 試圖하였다. 酵素反應은 보통 適當한 pH의 0.05 M acetate buffer에 만든 基質 0.5 ml에, 0.1%의 gelatin을 함유하는 같은 buffer에 適當히 희석한 酵素液 0.5 ml를 가하여 37°C에서 10分間 進行시켰다. 그러나 精製됨에 따라 活性도가 激減하는 不必要한 酵素의 경우에는 60分間까지 反應時間을 연장하였다. 모든 定量에서 反應生成物의 量은 酵素濃도에 正比例하였다. 1 酵素單位는 規定된 條件下에서 每分當 1 μ -mole의 基質(多糖類의 경우에는 1 micro當量의 關與된 殘基)을 加水分解하는데 必要한 酵素量으로 한다. 純度は 蛋白質 1 mg當 酵素單位로 한다.

β -1,4-Mannanase: 還元型 ivory nut mannan A의 新鮮한 suspension으로 0.3%의 基質濃度; pH 4.8에서 常法에 準하여 測定하였다. 反應液은 均一하게 하기 위하여 數回 흔들었고 Somogyi의 알카리性銅試藥 1.0 ml를 가하여 反應을 停止시킨 다음 還元力을 測定하였다. β -1,4-Mannanase 1單位는 上記 條件下에서 每分當 1 μ mole의 mannose當量을 生成하는 酵素量으로 한다.

α -Galactosidase:— 0.5%의 guaran濃度 및 pH 4.4에서 위와 같이 定量하였다. 萬一 酵素液에 β -1,4-mannanase가 混存하는 경우에는 다음과 같이 교정하였다. 즉 上述한 바와 같이 定量한 β -1,4-mannanase의 活性도에 0.1(還元型 ivory nut mannan A와 galactose가 제거된 guaran⁽⁶⁾에 대한 mannanase粗製品의 相對的 活性度에서 求한 값)을 곱한 값을, 測定한 α -galactosidase의 活性度에서 뺀다.

β -Galactosidase:— o -nitrophenyl β -D-galactopyranoside 10 mM濃度 및 pH 3.5에서 作用시킨 후 1 M Na_2CO_3 용액 1.0 ml를 가하여 정지시키고 生成된 o -nitrophenol 量을 定量하였다.

α -Mannosidase:— p -nitrophenyl α -D-mannopyranoside 2 mM 농도 및 pH 4.4에서 위와 같이 定量

하였다.

α -Glucosidase 및 β -glucosidase:— 해당하는 phenyl D-glucopyranoside 로서 각각 10 mM 농도 및 pH 4.4 에서 反應시키고 Somogyi 의 알칼리성銅試藥 1.0ml 를 가하여 反應을 停止시킨 後 還元力을 測定하였다.

(5) Paper chromatography

糖類의 定性에는 Whatman No. 1 濾紙를 사용한 下降法에 의하여 1-propanol : ethyl acetate : water (7 : 1 : 2) 또는 pyridine : ethyl acetate : water (4 : 10 : 3)의 溶媒系로 展開한 후 암모니아성 硝酸銀試藥⁽¹⁹⁾으로 發色시켰다. paper chromatogram 上의 糖類의 定量에는 糖類의 位置 決定, 浸出 및 phenol-sulfuric acid 法에 의한 全炭水化合物의 定量 過程을 거치는 一般法⁽²⁰⁾을 使用하였다.

(6) Gel 濾過法에 의한 分子量 測定

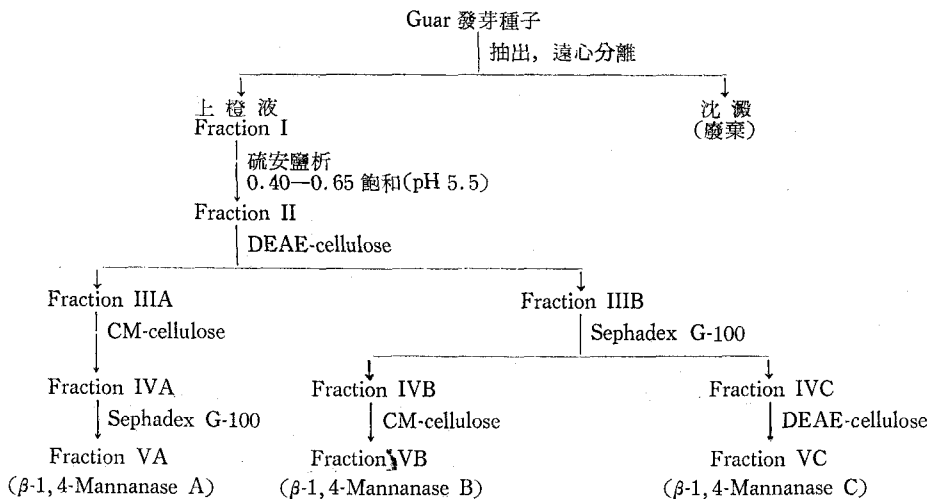
精製된 酵素蛋白質의 分子量을 Whitaker 의 方法⁽²¹⁾에 의하여 測定하였다. 即 Sephadex G-100 (粒子直徑 40—120 μ)을 0.4 M NaCl 을 함유하는 0.1 M acetate buffer (pH 6.0)에 稀釋시켜 실온에서 3 일간 膨潤시킨다음 1.1×114 cm 의 column 에 채우고 같은 buffer 용액으로 5°C 에서 3 일간 洗滌하여 平衡에 이르게 한다. 다음 5 mg 의 蛋白質을 함유하는 酵素溶液 1.0 ml 를 column 위에다 가하고 上

記 buffer 용액으로 5°C 에서 계속 溶離시킨다. 1 ml 식의 fraction 을 Technicon 自動劃分收集器로서 0.33 ml/cm²/min.의 流出速度로 收集하고 각 fraction 의 蛋白質濃度와 酵素活性度를 定量한다. 空白容量 V₀(void volume)는 0.15% blue dexdram 2,000용액을 같은 방법으로 실시하고 全炭水化合物量을 測定한 후 試料注入時부터 溶出物質을 나타내는 peak 의 頂點까지의 溶離容量으로 하였다. 未知試料의 溶離容量 V 를 求한 후 다음 公式에 의하여 分子量을 計算하였다.

$$\log(\text{分子量}) = -0.973 \pm 0.012 (V/V_0 - 1) + 5.190 \pm 0.010.$$

(7) 精製過程

모든 操作은 特記하지 않는 限 5°C 에서 실시하였다. 遠心分離는 보통 Servall 冷凍遠心分離器(RC-2 型)를 사용하여 13,000×G, 3°C 에서 20 분간 행하였다. 透析은 Visking 의 seamless cellulose 膜에 150 ml 以內의 酵素溶液을 넣고 2l 의 증류수 혹은 buffer 가 든 試管內에서 試管全體를 rocking 하면서 행하였다. buffer 는 pH 5.0 의 acetate buffer 를 사용하였고 酵素活性度란 特記하지 않는 限 β -1,4-mannanase 를 意味한다. 全精製過程을 다음에 要約한다.



Fraction I: Guar 種子의 發芽 및 抽出

Guar 種子 1 kg 를 75% H₂SO₄에 실온에서 30 분간 浸漬한 후 물로 充分히 씻은 다음 絞은 Whatman 3 MM 濾紙上에서 3 일간 실온에서 發芽시킨다. 發芽種子는 凍結 및 解凍을 3回 反覆하고 증류수 4l 와 같이 Waring blender 에서 1分間 磨碎, 실온에

서 4時間 徐徐히 교반한 후 遠心分離하여 約 5l 의 透明한 酵素抽出液을 얻는다. 이 중 小部分을 증류수에 대하여 충분히 透析하여 蛋白質濃度 및 酵素活性度の 測定에 使用하고 나머지는 곧 硫酸鹽析에 使用한다.

Fraction II: 硫酸鹽析

上記 酵素原液에 硫酸을 0.80 飽和度까지 용해하여 生成하는 沈澱을 遠心分離器로 收集하고 다시 증류수에 녹여 蛋白質濃度를 10 mg/ml로 調整한다. 이에 硫酸을 가하여 0.40 飽和度로 만들고 pH를 5.5로 調整하여 生기는 沈澱을 遠心分離하여 除去하고 上澄液에 다시 硫酸을 0.65 飽和度까지 가한다. 이때 生기는 沈澱을 遠心分離器로 收集하여 0.1 M buffer 100 ml에 녹인 다음 같은 buffer에 대하여 數回 交替하면서 24시간 透析한다. 이때 生기는 沈澱은 遠心分離하여 除去한다.

Fraction III: DEAE-cellulose column chromatography

Whatman DEAE-cellulose DE-50 粉末을 증류수

에 填塔, 微細分을 傾瀉에 의하여 除去하고 column에 充填, 1 N NaOH, 1 N HCl, H₂O, 1 N NaOH, H₂O, 0.1 M buffer의 順序로 充分히 洗滌한다. 이리하여 얻은 column(3.6×30 cm)에 fraction II(192 ml)를 가하고 180滴 (18~20 ml)식의 劃分을 自記式紫外線吸收計가 附置된 Technicon 自動劃分收集器에 의하여 每時間當 120 ml의 流出速度로 收集한다. column은 0.01 M buffer (1.5 l) 및 0.05 M buffer (1.5 l)의 順序로 洗滌하고 吸着된 蛋白質은 0.05 M buffer 500 ml가 든 混合容器와 0.15 M NaCl을 함유하는 0.1 M buffer 2 l가 든 reservoir를 使用한 勾配에 의하여 溶離시킨다(Figure 1).

0.01 M buffer로 溶出된 劃分中 每 ml當 0.2 酵

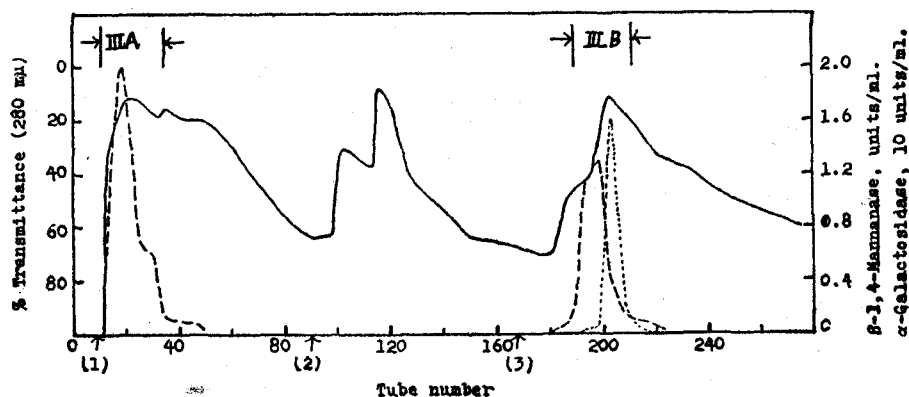


Figure 1. Chromatography of Fraction II on DEAE-cellulose. Elution: (1) with 0.01 M buffer; (2) with 0.05 M buffer; (3) by a gradient. — Protein; --- β -1,4-mannanase activity; α -galactosidase.

素單位 以上을 함유하는 것을 합하고 硫酸 0.80 飽和度에서 生기는 沈澱은 遠心分離로 收集, 少量의 0.01 M buffer에 다시 용해시킨다. 이를 같은 buffer에 대하여 4回交替, 6시간 透析하고 이때 生기는 沈澱을 遠心分離로 除去하여 透明한 fraction IIIA를 얻는다. 다음 勾配溶離에 의하여 收集한 劃分中 每 ml當 0.1 酵素單位 以上の 것을 합하고 硫酸 0.8 飽和度에서 生成되는 沈澱을 遠心分離에 의하여 收集, 少量의 0.05 M buffer에 녹이고 不溶性物質은 다시 遠心分離에 의하여 除去하였다(fraction IIIB).

Fraction IVA: CM-cellulose Column Chromatography

CM-cellulose를 管에 充填하고 0.5 N NaOH-0.5 M NaCl, 0.1 N HCl, H₂O, 0.5 N NaOH-0.5 M NaCl, H₂O, 0.01 M buffer의 順序로 洗滌하고 이에 fraction IIIA(43 ml)를 가하여 10 ml 式의 劃分

을 每時間當 60 ml의 流出速度로 收集한다. 非吸着性 蛋白質은 0.01 M buffer(500 ml)로 洗滌해 버리고 吸着된 蛋白質은 同容量(200 ml)의 混合容器 두개를 사용하여 얻은 直線勾配(下位容器는 0.01 M buffer로, 上位容器는 0.1 M buffer로 채우고 reservoir에는 0.1 M NaCl을 함유하는 0.1 M buffer로 채운다)에 의하여 溶離한다(Figure 2).

溶離液 每 ml當 0.2 酵素單位 以上을 나타내는 劃分을 모두 합하고 硫酸 0.8 飽和度에서의 沈澱을 遠心分離로 收集, 少量의 0.05 M buffer에 녹인 다음 不溶性物質은 遠心分離에 의하여 除去한다(fraction IVA).

Fraction VA: Sephadex G-100에 의한 Gel 濾過 Sephadex G-100을 0.05 M buffer에 2日間 膨潤시킨 다음 3.6×112 cm의 column에 充填하여 같은 buffer로 充分히 洗滌하고 이에 fraction IVA(10 ml)를 가한다. 다음 0.05 M buffer로 6 ml/cm²/hour의

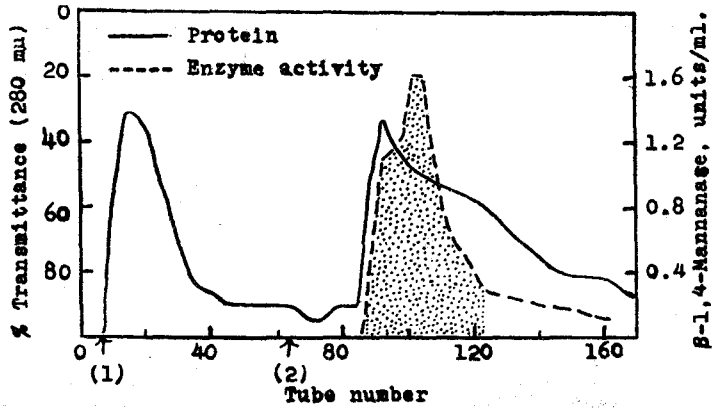


Figure 2. Chromatography of Fraction IIIA on CM-cellulose. Elution: (1) with 0.01 M buffer; (2) by a linear gradient.

流速으로 溶離하고 約 10 ml 式 收集한다(Figure 3).
每 ml 當 1.0 酵素單位 以上을 함유하는 劃分을
함하여 硫酸 0.8 飽和度에서의 沈澱을 遠心分離器

로 收集하고 다시 少量의 0.01 M buffer 에 용해,
같은 buffer 에 대하여 3 回交替로 4 시간 透析한 다음
생기는 沈澱을 遠心分離에 의하여 除去한다.

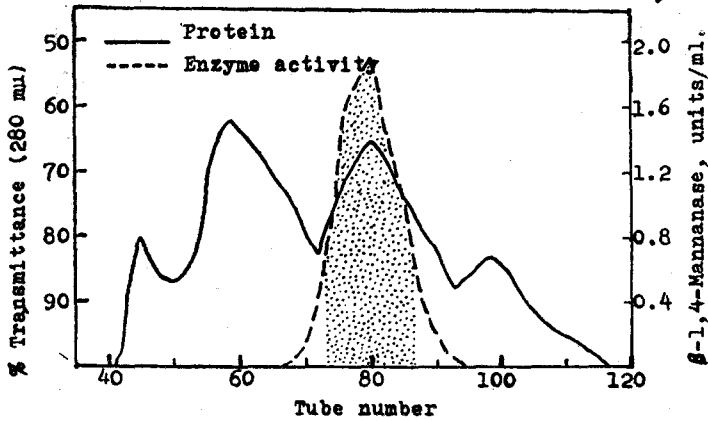


Figure 3. Gel filtration of Fraction IVA on Sephadex G-100.

(fraction VA)

Fraction IVB 및 IVC: Sephadex G-100 에 의한
Gel 濾過

Fraction IIIB(12.5 ml)를 3.6×112 cm의 Sephadex
G-100 column 에 의하여 上述한 操作에 의하여 分別
하였다(Figure 4). 初期에 溶離된 劃分中 每 ml
當 0.1 酵素單位 以上을 함유하는 것을 함하여 硫酸
0.8 飽和度에서의 沈澱을 0.01 M buffer 에 녹인
다음 같은 buffer 에 대하여 3 回交替 4 시간 透析하
여 생기는 沈澱을 遠心分離에 의하여 제거하였다
(fraction IVB).

다음에 溶離된 劃分中 每 ml 當 0.1 酵素單位 以上
의 β-1,4-mannanase 活性을 보이나 6.0 酵素單位

이하의 α-galactosidase 活性 (guaran 에 대하여)을
나타내는 것을 함하여 위와 같이 操作, fraction IV
C를 얻는다. fraction IVC 다음에 溶離된 劃分中
每 ml 當 1.0 單位 以上의 α-galactosidase 活性을 나
타내는 것을 收集後 α-galactosidase 의 精製에 利用
할 수 있다.

Fraction VB: CM-cellulose Column

Chromatography

0.01 M buffer 로 洗滌한 CM-cellulose column(1.4
×7 cm)에 fraction IVB(7.9 ml)를 가하여 0.01 M
buffer(200 ml), 0.05 M buffer(200 ml)의 순서로 溶
離하면서 每時間當 30 ml 의 流速으로 約 5 ml 式
劃分 收集한다(Figure 5). 每 ml 當 2.0 酵素單位 以

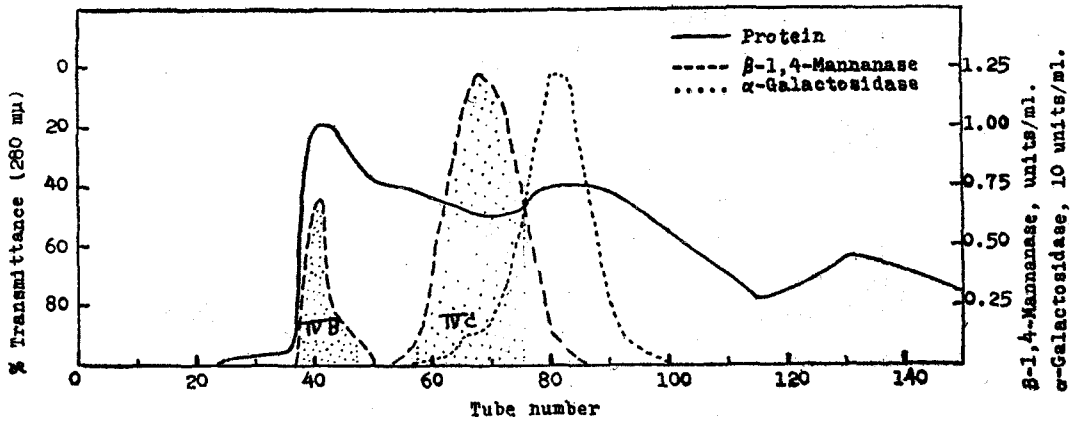


Figure 4. Gel filtration of Fraction III B on Sephadex G-100.

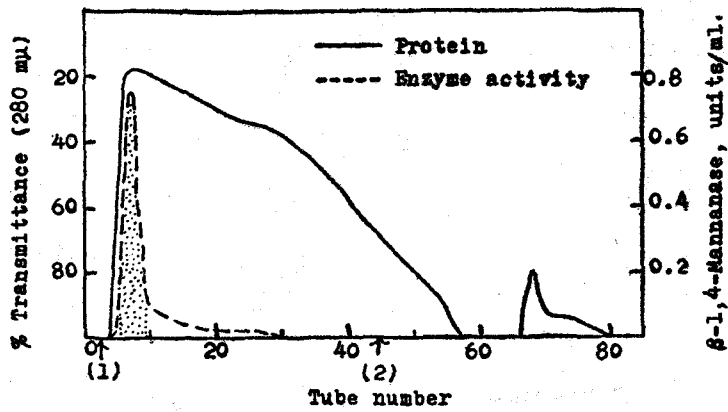


Figure 5. Chromatography of Fraction IV B on CM-cellulose. Elution: (1) with 0.01 M buffer; (2) 0.05 M buffer.

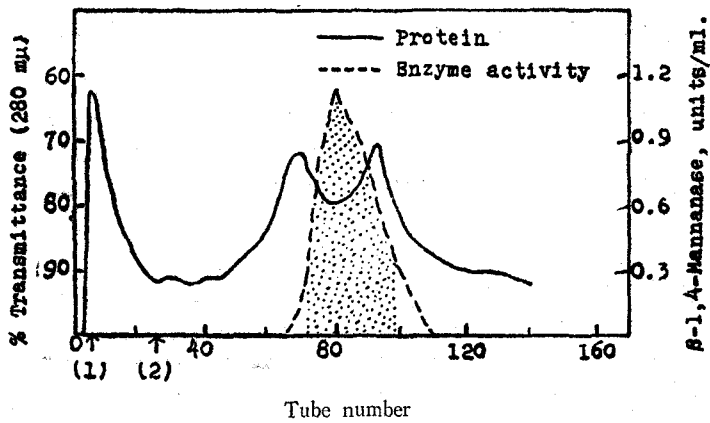


Figure 6. Chromatography of Fraction IV C on DEAE-cellulose. Elution: (1) with 0.01 M buffer; (2) by a linear gradient.

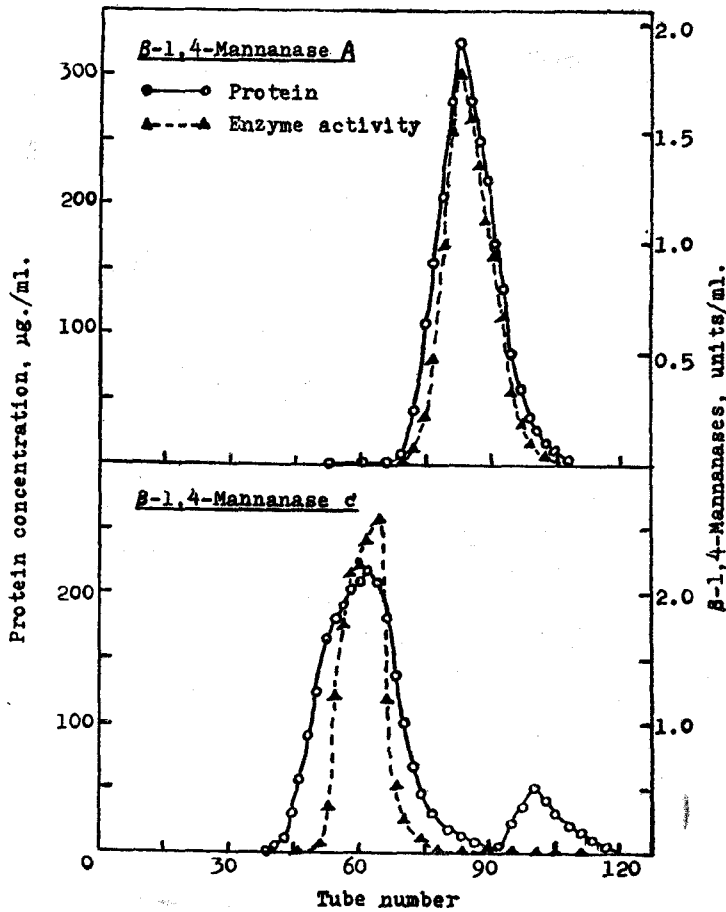


Figure 7. Behavior of purified β -1,4-mannanases A and C on Sephadex G-100.

상을 함유하는 劃分을 收集, 0.01 M buffer 에 대하여 3回 交替 4 시간 透析한다(fraction VB).

Fraction VC: DEAE-cellulose Column

Chromatography

0.01 M buffer 로 洗滌한 DEAE-cellulose column (1.4×7 cm)에 fraction IVC (7.8 ml)를 가하여 每時間當 60 ml의 流速으로 約 5 ml式 劃分收集한다. 非吸着性 蛋白質은 0.01 M buffer (100 ml)로 溶離除去하고 吸着된 蛋白質은 同容量(200 ml)의 混合容器 2個를 使用하는 直線勾配(下位容器는 0.01 M buffer 로, 上位容器는 0.05 M buffer 로 채우고 reservoir에는 0.1 M NaCl을 함유하는 0.05 M buffer 600 ml를 채운다)에 의하여 溶離한다(Figure 6). 溶離液 1 ml當 0.4 酵素單位 以上을 함유하는 劃分을 합하여 fraction VA 에서와 같이 操作하여 fraction VC 를 얻는다.

III. 實驗結果

(1) 精製經過

β -1,4-Mannanase 酵素의 精製經過는 第1表와 같으며 精製過程中 원하지 않는 酵素들의 除去經過는 第2表와 같다. 精製된 세 fraction VA, VB, VC는 分別順序에 따라 각각 β -1,4-mannanase A, B, C, 라고 命名하였다.

세가지 精製酵素를 II. 6) 項의 分子量測定法에 의하여 Sephadex G-100 column 을 통과시킨 결과는 Figure 7 과 같다. β -1,4-Mannanase A 精製品은 不必要한 酵素活性도가 가장 적었으며 Sephadex G-100에서의 溶離曲線에서 蛋白質濃度和 酵素活性도가 一致하는 同時에 曲線이 對稱인 것으로 보아 高度로 精製된 것이라 생각된다. 그리고 溶離容量 / 空白容量의 比(V/V_0) 1.80에서 이 酵素의 分子量

第1表 Guar發芽種子에서 β -1,4-mannanase 群의 精製經過

Fraction	液量 (ml)	全活性度 (酵素單位)	純度 (蛋白質 mg當 酵素單位)	精製度 (倍)	收率 (%)
I	5000	2245	0.17	1.0	100
II	192	1020	0.29	1.7	45
IIIA	43	346	0.51	3.0	15
IVA	10	250	0.98	5.8	11
VA	8	177	5.12	30.1	8
IIIB	13	282	0.89	5.2	13
IVB	8	39	0.92	5.4	1.7
VB	13	6	1.55	9.1	0.3
IVC	8	193	3.55	20.9	9
VC	5	126	7.92	46.6	6

第2表 β -1,4-Mannanase 群의 精製過程中 不必要한 酵素들의 除去經過(全活性度)

Fraction	I	II	VA	VB	VC
β -1,4-Mannanase	2245	1020	177	6.1	126
α -Galactosidase	3150	2170	0.06	0.32	73
β -Galactosidase	2980	3590	0.48	0.36	2.10
α -Mannosidase	1130	920	0.00	0.35	0.19
α -Glucosidase	22	4	0.00	0.00	0.00
β -Glucosidase	32	21	0.00	0.59	0.00

으로 26,000 을 얻었다.

β -1,4-Mannanase B 製品은 다른 glycosidases 로 混在되어 있었으며 Sephadex G-100 粒子를 透過하지 못한 것으로 보아 100,000 이상의 分子量을 가진 것 같다. β -1,4-Mannanase C 製品은 特히 α -galactosidase 가 相當量 混在되었고 (全蛋白質의 約 19% 로 推算) Sephadex G-100 에 의한 gel 濾過에서 酵素活性度曲線과 蛋白質濃度曲線이 一致하지는 않았으나 V/V_0 의 比 1.33 에서 約 74,000 의 分子量을 가진 것으로 概算되었다.

(2) 作用最適 pH 및 安定度

精製酵素들의 作用에 미치는 pH 의 영향은 각각 다른 pH 의 0.05 M acetate-phosphate buffer 를 사용, 標準條件下에서 β -1,4-mannanase 의 活性度を 測定함으로써 이루어졌다. pH 에 대한 安定度는 上記 buffer 에서, 37°C, 0.1% 蛋白質濃度에서 酵素溶液을 2時間 保存한 후 殘存하는 活性度を 測定하였다. 이들 結果는 Figure 8 과 같다.

β -1,4-Mannanase A,B,C 에 대하여 作用最適 pH

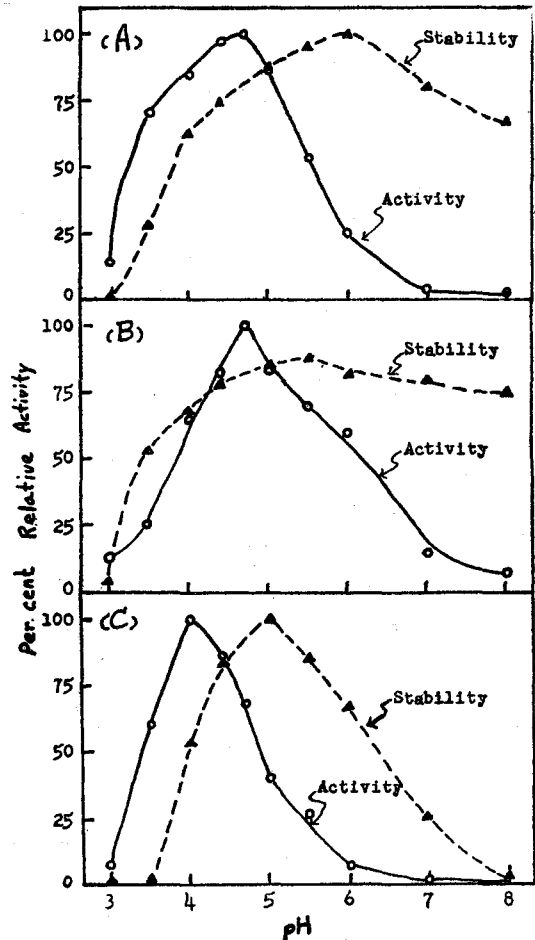


Figure 8. pH optimum and stability of purified enzymes. (A), β -1,4-mannanase A; (B), β -1,4-mannanase B; (C), β -1,4-mannanase C.

는 각각 4.8, 4.8, 4.0 이었고 安定 pH 範圍는 각각 4.4—7.5, 4.0—8.0, 4.4—6.0 이었다. 이들 酵素는 0.05 M acetate buffer (pH 4.8), 0.1% 蛋白質濃度, 5°C 에서 1個月貯藏에 安定하였다.

(3) 金屬이온의 影響

基質溶液에 미리 金屬鹽類나 EDTA 를 넣고 常法에 의하여 酵素活性度を 測定한 結果는 第3表와 같다. 供試한 化合物은 별로 活性化效果를 보이지 않았고 若干의 化合物에 의한 阻害效果는 酵素에 따라 달랐다. 特히 Al^{+++} , Cu^+ , Pb^{++} 에 의한 阻害는 β -1,4-mannanase C 에 대하여 현저하였다. EDTA 는 시험한 농도에서 세 酵素에 대하여 현저한 效果를 나타내지 않는 것으로 미루어 이들 酵素는 二價 cation 을 要求하지 않는 것 같다.

第3表 精製酵素의 活性에 미치는 金屬이온의 影響

鹽 類	最終濃度 (mM)	相對的 活性度		
		酵素A	酵素B	酵素C
None	—	100	100	100
AgNO ₃	1.0	108	103	75
AlCl ₃	1.0	106	105	48
CaCl ₂	1.0	122	99	90
CdCl ₂	1.0	81	45	46
CoCl ₂	1.0	112	121	98
CuCl	0.1	123	112	64
CuSO ₄	1.0	71	30	5
FeCl ₂	1.0	101	118	85
FeCl ₃	1.0	133	78	75
HgCl ₂	1.0	33	0	9
MgCl ₂	1.0	100	118	107
MnCl ₂	1.0	92	78	82
NiSO ₄	1.0	122	98	75
Pb(CH ₃ COO) ₂	1.0	63	0	6
ZnCl ₂	1.0	97	88	65
EDTA	1.0	101	100	106
//	10.0	88	70	107

(4) 基質濃度의 影響

精製된 酵素의 作用에 미치는 基質濃度의 影響을 보기 위하여 還元型 ivory nut mannan A의 濃度 0.07—0.4% 範圍內의 다섯 濃度에서의 初期 反應速度를 求하고 Lineweaver 및 Burk의 方法⁽²²⁾에 의하여 Michaelis-恒數를 計算하였다. β-1,4-Mannanase A, C는 pH 4.8, β-1,4-Mannanase B는 pH 4.0에서 測定하였고 그 結果는 第4表와 같다.

第4表 還元型 ivory nut mannan A에 대한 精製酵素의 Michaelis 恒數

酵 素	使用한 酵素製品의 純度(蛋白質 mg 當 酵素單位)	Michaelis 恒數 (%) (mM)*	
β-1,4-Mannanase A	5.1	0.083	4.4
β-1,4-Mannanase B	1.7	0.29	15.4
β-1,4-Mannanase C	8.1	0.27	14.3

* 還元型 ivory nut mannan A의 分子量을 報告된 重合度⁽⁷⁾ 10—13의 中間值에서 얻은 1884로 看做하고 計算한 것임.

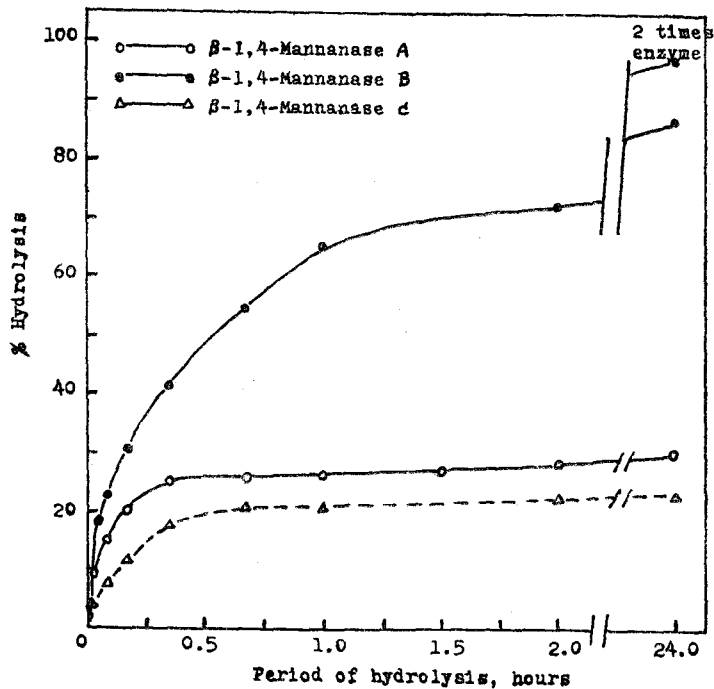


Figure 9. Hydrolysis of reduced ivory nut mannan A by purified β-1,4-mannanases.

(5) 還元型 ivory nut mannan A의加水分解

精製酵素 1單位씩을 0.05 M acetate buffer (pH 4.8)에 만든 0.3% 基質懸濁液 1 ml에 37°C에서 作用시키며 적당한 시간 간격으로 5分間 加熱에 의하여 反應을 停止시키고 Somogyi-Nelson 법에 의하여 還元力을 測定하였다. Figure 9에 보이는 바와 같이 酵素가 다름에 따라 加水分解의 限度가 달랐다. 즉 β -1,4-mannanase B는 完全加水分解의 97%까지, β -1,4-mannanase A,C는 30% 이내로 加水分解하였다. 이 結果로 보아 前者는 mannose까지 完全分解하고 後二者는 寡糖類를 生成하므로 不完全

한 加水分解를 일으키는 것이라 推理된다.

基質인 mannan의 酵素分解液은 不溶性物質과 鹽類를 除去한 후 paper chromatography에 의하여 pyridine: ethyl acetate: H₂O(4:10:3)의 溶媒系로 存在하는 糖類를 定性, 定量하였다. 糖類의 同定은 既知化合物과의 比較, 同系列의 寡糖類에 대한 重合度—log Rman 值間의 直線關係에 의하여 행하였다.

第5表에서 보는 바와 같이 β -1,4-mannanase B에 의한 加水分解에서 mannose는 初期段階의 唯一한 產物이며 全期間을 통하여 低分子量物質의 主要成

第5表 精製酵素에 의한 還元型 ivory nut mannan A의 加水分解產物

產 物	Rman 值	指示된 反應時間(% 加水分解率)에서의 分解產物의 相對的 濃度		
		5 min.(15%)	15 min.(23%)	24 hr.(33%)
β -1,4-Mannanase A		5 min.(15%)	15 min.(23%)	24 hr.(33%)
D-Mannose	1.00	+	0.5	4
D-Galactose	0.76	—	—	0.9
Mannobiose	0.50	10	18	44
Mannobitol	0.40	—	—	0.7
Mannotriose	0.20	44	50	46
Mannotriitol	0.15	—	—	+
Mannotetraose	0.07	30	25	2
Soluble, higher oligosaccharides<0.01		16	7	2
β -1,4-Mannanase B		10 min.(22%)	60 min.(66%)	24 hr.(87%)
D-Mannose	1.00	100	100	95
D-Mannitol	0.85	—	—	2
D-Galactose	0.76	—	—	+
Mannobitol	0.40	—	—	2
Mannotriose	0.20	—	—	+
Mannotriitol	0.15	—	—	0.5
Mannotetraose	0.07	—	—	+
Soluble, higher oligosaccharides<0.01		+	+	+
β -1,4-Mannanase C		10 min.(10%)	40 min.(20%)	24 hr.(22%)
D-Mannose	1.00	0.5	2	4
D-Galactose	0.76	0.8	0.9	0.9
Mannobiose	0.50	6	11	15
Mannotriose	0.20	31	42	49
Mannotetraose	0.07	31	26	26
Soluble, higher oligosaccharides<0.01		31	18	6

+ : paper chromatogram에서 檢出되나 定量하기에는 너무 微量임.

분이었다. 基質의 還元末端基에 해당하는 mannitol은 分解의 末期에 이르러 비로소 生成되었다.

β -1,4-Mannanase A 및 C에 의한 加水分解에서 主要產物은 主로 二糖類, 三糖類, 四糖類로 된

oligomannoside類로서 反應이 進行됨에 따라 低級 寡糖類의 含量이 增加하였다. 分解됨에 따라 mannobiose와 mannotriose가 集積된은 上記 두 酵素가 이들 低級寡糖類에 作用하지 못함을 말해 준다.

그리고 Mannose의 생성은 僅少하였는데 이것이 β -1,4-Mannanase 본래의 作用에 의한 것인지 혹은 混存할지도 모르는 β -mannosidase나 $\text{exo-}\beta$ -1,4-mannanase에 의한 것인지 아직 確實하지 않다. 精製된 ivory nut mannan A가 非還元末端基로서 1.8%의 galactose를 含有한다는 報告¹⁵⁾가 있으므로 酵素分解中에 生成되는 galactose는 製品中에 混存하는 α - 또는 β -galactosidase의 作用에 의한 것이다. 그런데 세가지 酵素群으로 分別하기 전의 粗製品(fraction II)은 甙基質을 約 90%까지 加水分解하였고 分解物의 大部分은 mannose이며 小部分은 galactose와 寡糖類이었다.

(6) Guarán의 加水分解

0.3% guaran 용액 1 ml에 精製酵素 1單位를 가하여 作用시키고 前節에서와 같이 分解過程을 分析하였다. Figure 10에서 보는 바와 같이 guaran의 分解速度와 分解限度는 酵素製品에 따라 相異하였다. 모든 酵素製品은 guaran에서 galactose를 除去할 수 있는 α -galactosidase로 多少間 混存되어 있고 또한 加水分解度는 還元力의 增加에 의해서만 測定하였으므로 本實驗에서의 guaran의 加水分解는 β -1,4-mannanase와 아울러 α -galactosidase의 作用에

의할 것이다. Fraction VB와 VC에 의한 加水分解에서 初期速度가 빠른 것은 α -galactosidase에 의한 것이나 fraction VC에 의하여 35%以上 加水分解됨은 β -1,4-mannoside結合의 開裂에 의한 것이 틀림없다. Fraction VA는 α -galactosidase의 活性이 매우 낮았으므로 實測한 分解速度는 β -1,4-mannanase A의 作用에 의한 것이 分明하다. 그러나 β -1,4-mannanase들이 guaran分子에 直接 作用하는지 또는 galactose基가 除去된 然後에나 作用하는지는 未分明하다. paper chromatography에 의한 豫備實驗에서 fraction VA에 의한 分解產物로부터 galactose와 一連의 寡糖類가 檢出되었다. 그리고 酵素粗製品(fraction II)에 의하여 guaran은 80%까지 加水分解되었고 生成物로서 多量의 galactose와 mannose, 少量의 寡糖類가 檢出되었다.

IV. 考 察

β -1,4-Mannanase의 活性을 나타내는 세가지 酵素劃分을 guar의 發芽種子에서 分別精製하였다. 이들은 아직 순수하지 않지만 作用最適 pH, 安定度, 金屬이온의 영향, 分子量, 還元型 ivory nut mannan A에 대한 Michaelis 恒數 및 作用方法等 여러가지

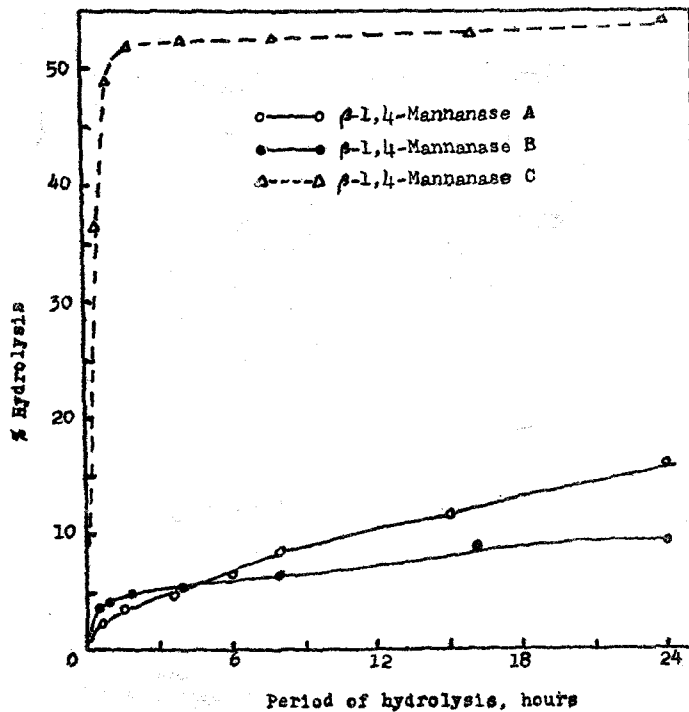


Figure 10. Hydrolysis of guaran by purified β -1,4-mannanases.

點에서 서로 다르다.

β -1,4-mannanase A 와 C 는還元型 ivory nut mannan A 를 30% 以上加水分解하지 못하는 동시에寡糖類가 主要生産物이라는實驗結果는 이들이 β -1,4-mannan 에 random 으로作用하여低級寡糖類를生成하는endo型酵素임을強力히示唆해준다. 다른한편 β -1,4-mannanase B 는 같은基質을 거의 완전히加水分解하여低分子量化合物로서mannose 를 주로生成한다는事實은 이것이 β -1,4-mannan 의非還元末端基로부터mannose 를順次的으로切斷해내는酵素임을暗示해준다. 그러나이酵素가mannobiose 나合成한heteromannoside 에 더 잘作用하는 β -mannosidase 인지는 아직 모르며解決되어야 할 문제이다. 또한 이들 세酵素가 β -1,4 以外の結合을 가진 mannan 에作用할 수 있는지 아직試驗해보지 않았으나 최근⁽²³⁾ *Rhodotorula glutinis* 에서 β -1,3-1,4 結合을 가지는 새로운 mannan 이發見되었으므로 한번試驗해 볼 필요가 있다.

또한endo-xylanase 의作用에는基質인arabinoxylan 分子中에 적어도 두개의隣接한非置換殘基의存在가必要하다는說⁽²⁴⁾이 β -1,4-mannanase 와 같은 다른多糖類加水分解酵素에도適用되는지 알아보는 것은 흥미있는 일이다 Reese 및 Shibata⁽⁶⁾는다음의結果로부터이說을 β -mannanase 에適用하였다. 即 어떤微生物에서 얻은 한酵素粗製品은 α -galactosidase 와 β -mannosidase 의活性이缺如된 것 같고, guaran 보다는 branching 이 적은 galactomannan 인 carob gum 을 더 잘分解하며 또한 guaran 에서는五糖類보다 작은産物을生成하지 않는反面 carob gum 에서는一連의寡糖類를生成하였다. 그러나 α -galactosidase 가 완전히缺如된酵素製品을 얻지 않는限 galactomannan 과 같은置換된 β -1,4-mannan 에對한endo- β -1,4-mannanase 의構造的特異性を알기는 매우 어려울 것이다. 이에 대한實驗結果는 아직 충분하지 않으므로 더 많은研究가要求된다.

guar 의發芽種子에서 얻은酵素粗製品은 guaran 을 거의 완전히分解하지만 α -galactosidase 를 거의除去한 β -1,4-mannanase A 精製品은 guaran 에 잘作用하지 못한다. 그러나 β -1,4-mannanase A 가 guaran 의加水分解에關與하지 않는다는 것을意味하지는 않는다. 오히려 세 β -1,4-mannanase 는 α -galactosidase 와共同으로 guaran 에作用하여完全加水分解를이르키는것 같으며 guaran 에서部分的인이나나 galactose 殘基가除去된 후에야 mannanase 가作用할 수 있는 것으로考慮된다. β -1,4-mann-

anase A 와 C 가 mannan 이나 galactomannan 의分解에서 나타내는差異는 아직 모르지만 guar 의發芽種子中에 isozyme 으로存在하는 것이라 생각된다. 이들酵素系는 많은 콩과식물의種子中에 저장양분으로存在하는 galactomannan 의分解에必要하므로發芽中 重要的 生理的 役割을 하는 것으로推理된다.

V. 要約

(1) 콩과 식물인 guar (*Cyamopsis tetragonolobus*)의發芽種子에서 세 가지의 다른多糖類加水分解酵素인 β -1,4-mannanase A,B,C 를抽出, 硫酸鹽析, 이온交換크로마토그래피 및 濾過法에 의하여分離, 精製하였다.

(2) 이들酵素는作用最適 pH, 금속이온의 영향, 分子量, ivory nut mannan A 에 대한 Michaelis 恒數,加水分解의限度 및生成物等 여러가지點에서 다르다.

(3) β -1,4-Mannanase A 와 C 는基質인 β -1,4-mannan 에 random 으로作用하여寡糖類를生成하는endo型酵素임이 밝혀졌다. 한편 β -1,4-mannanase B 는 같은基質의非還元末端基로부터순차로作用하여單糖類를生成하는exo型酵素로推理된다.

(4) Guar 種子中的 galactomannan 인 guaran 에 이들精製酵素를作用시킨結果로부터基質의構造 및 guar 種子의發芽中에 가지는役割과 관련시켜論議하였다.

— ◇ —

本報는 著者が美國 미네소타大學校에 提出한 博士學位論文中에서拔萃한 것이다. 本研究을 遂行하는데 積極的인 指導鞭達과 激勵을 하여주신 指導教授 S. Kirkwood 博士와 많은 助言을 하여주신 故 F. Smith 博士에게 深甚한 謝意를 表한다.

— ◇ —

引用文獻

- 1) E. Bourquelot and H. Herissey: Compt. Rend., 129, 614 (1899).
- 2) S.R. Lee: Ph. D. Thesis, University of Minnesota, Minneapolis (1965).
- 3) E.T. Reese and Y. Shibata: Can. J. Microbiol., 11, 167 (1965).
- 4) J.E. Courtois and P.L. Dizet: Bull. Soc. Chem. Biol., 46, 535 (1964).
- 5) R.L. Whistler, W. H. Eoff and D.M. Doty: J.

- Am. Chem. Soc., **72**, 4938 (1950).
- 6) S.R. Lee: Seoul University J. (Agr. Biol. Series) in press.
 - 7) G.O. Aspinall, E.L. Hirst, E.G.V. Percival and I.R. Williamson: J. Chem. Soc., 3184 (1953).
 - 8) M. Somogyi: J. Biol. Chem., **195**, 19 (1952).
 - 9) N. Nelson: J. Biol. Chem., **153**, 375 (1944).
 - 10) M. Luedtke: Ann., **456**, 201 (1927).
 - 11) F. Smith and H.C. Srivastava: J. Am. Chem. Soc., **81**, 1715 (1959).
 - 12) A.M. Unrau and F. Smith: Chem. & Ind., 330 (1957).
 - 13) M.A. Jermyn: Australian J. Chem., **7**, 202 (1954) & **8**, 403 (1955).
 - 14) O. Westphal and H. Feier: Chem. Ber., **89**, 582 (1956).
 - 15) S.R. Lee and S. Kirkwood: unpublished work.
 - 16) M. Dubois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers and F. Smith: Anal. Chem., **28**, 350 (1956).
 - 17) O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall: J. Biol. Chem., **193**, 265(1951).
 - 18) G.L. Miller: Anal. Chem., **31**, 964 (1959).
 - 19) W.E. Trevelyan, D.P. Procter and J.S. Harrison: Nature, **166**, 444 (1950).
 - 20) L. Hough and J.K.N. Jones: in Methods in Carbohydrate Chemistry, vol. I, edited by R.L. Whistler and M.L. Wolfrom, Academic Press, New York, p 21 (1962).
 - 21) J.R. Whitaker: Anal. Chem., **35**, 1950 (1963).
 - 22) H. Lineweaver and D. Burk: J. Am. Chem. Soc., **56**, 658 (1934).
 - 23) P.A.J. Gorin, K. Horitsu and J.F.T. Spencer: Can. J. Chem., **43**, 950 (1965).
 - 24) A.S. Perlin and E.T. Reese: Can. J. Biochem. Physiol., **41**, 1842 (1963).