

대두 α -galactosidase의 정제 및 성질

김종화* · 오만진 · 김성렬

*대전보건전문대학 식품영양과, 충남대학교 식품공학과

초록 : 대두 발아 과정 중의 α -galactosidase를 추출하여 염석, 이온교환 크로마토그래피 및 겔 여과 등의 방법으로 정제한 후 정제효소의 효소학적 성질을 검토하였다. 대두 α -galactosidase의 활성은 25°C에서 120시간 발아시켰을 때 가장 높았으며, 대두 중의 raffinose는 96시간, stachyose는 120시간 발아시켰을 때 완전히 분해되었다. 대두 α -galactosidase는 황산암모늄 염석, DEAE-Cellulose 및 DEAE-Sephadex A-50 이온교환 크로마토그래피, Sephadex G-150 겔 여과 등에 의하여 비활성은 825U/mg protein으로써 6.6배까지 정제되었으며 수율은 2.5%이었고 HPLC와 PAGE에 의하여 순도를 확인하였다. 정제효소의 등전점은 pH 4.8이었고, 분자량은 30,000인 monomer이었으며 정제효소의 최적작용 pH는 6.0, 최적작용온도는 40°C이었고, 60°C에서 10분 처리시 25%의 잔존 활성을 나타내었다. 정제효소는 stachyose보다 raffinose를 쉽게 분해하였으며 PNPG에 대한 Km값은 5.3 mM, 활성화 에너지는 13.02 cal/mole이었다(1991년 8월 5일 접수, 1991년 9월 24일 수리).

α -Galactosidase (α -D-galactoside galactohydrolase, EC 3, 2, 1, 22)는 α -1, 6 galactoside 결합을 갖고 있는 소당류를 가수분해하는 효소로서 동물, 식물, 미생물 등에 널리 존재하고 있다.

Raffinose, stachyose 등의 소당류¹⁾는 인체 내에서 α -galactosidase²⁾가 분비되지 않기 때문에 장내 세균에 의한 혐기적 발효³⁾가 일어나 위복부의 팽만감을 주는 원인이 될 뿐만 아니라, 제당 정제과정 중 설탕의 결정화를 방해하여, 제품의 수율을 저하시키는 원인이 되고 있다.

식물기원의 α -galactosidase에 관한 연구는 winged bean,⁴⁾ soybean,^{5,6)} broad-bean,^{7,8)} mung bean,⁹⁾ coffee-bean,^{10,11)} coconut,¹²⁾ cowpea,^{13,14)} alfalfa seed,¹⁵⁾ sweet almond 등¹⁶⁾에 존재하는 효소에 대하여 수행되어 왔다.

본 연구에서는 대두발아 과정 중의 α -galactosidase의 활성변화, 소당류의 변화 등을 조사하고 발아 대두의 α -galactosidase의 특성을 규명하기 위하여 발아대두의 α -galactosidase를 추출한 다음 유안염석, 이온교환 크로마토그래피 및 겔 여과 등의 방법으로 정제하고 효소학적 성질을 검토하여 몇 가지 결과를 얻었으므로 보고하는 바이다.

재료 및 방법

재료

Key words : Soybean, α -galactosidase, purification
Corresponding author : M. J. Oh

대두(*Glycine max*(L.))는 1988년 대전근교에서 생산된 황금 품종을 선별한 후 실험에 사용하였다.

소당류 분석

대두 발아 과정 중의 raffinose 및 stachyose 함량은 홍 등¹⁷⁾의 방법에 준하여 정량하였다. 즉 시료 1g에 내부 표준물질로서 lactose를 함유한 80% 에탄올 20 ml를 가하여 환류 냉각관을 부착한 다음 수욕상에서 1시간 추출한 후 여과하였다. 잔사는 동일한 방법으로 2회 반복 추출한 후 50 ml로 정용하였다.

이 액 25 ml를 취하여 감압농축한 다음 질소기류하에서 완전 건조한 후 무수 pyridine 2 ml를 가하여 잔사를 녹인 다음 trimethylsilyl trifluoro acetamide(BSTFA) 0.5 ml를 가한 후 60°C에서 15분간 가온하여 trimethylsilylane화한 후 Table 1과 같은 조건에서 가스 크로마토그래피로 분석하였다.

활성 측정

효소의 활성은 정 등¹⁸⁾의 방법에 준하여 측정하였다. 2 mM PNPG를 함유한 0.1M McIlvaine 완충액(pH 6.5) 1 ml에 효소액 1 ml를 가하여 40°C에서 10분간 반응시킨 후 1 M Na₂CO₃용액 5 ml를 가하여 반응을 정지시킨 다음 분광광도계로 400 nm에서 흡광도를 측정하여 생성된 p-nitrophenol(PNP)의 양을 측정하였다. 효소활성¹⁹⁾은

PNPG로부터 1분에 1 μmole의 PNP를 유리하였을 때 1 단위로 하였다.

단백질 정량

단백질은 bovine serum albumin을 표준물질로 Lowry법²⁰⁾으로 정량하였으며 크로마토그래피의 용출분획의 단백질은 280 nm에서 흡광도를 측정하여 표시하였다.

당 정량

환원당은 Somogyi-Nelson법^{21,22)}으로 정량하였다.

효소의 정제

대두를 실온에서 6시간 물에 침지하여 25°C, 5일간 발아시킨 다음 3배량의 0.1 M McIlvaine 완충액(pH 6.5)을 가하고 10분간 마쇄하여 두 시간 방치한 후 cheese cloth로 여과한 액을 9,000 rpm, 20분 원심분리하여 상정액을 조효소액으로 하여 Fig. 1과 같은 방법으로 정제하였다.

단백질의 순도검정 및 분자량 측정

1) Polyacrylamide disc gel 전기영동

Davis의 방법²³⁾에 따라 pH 8.3의 tris 완충액계에서 7.5% acrylamide를 중합시켜 칼럼당 2 mA의 전류로 3시간 전기영동한 후 amino black 10B로 염색하였다.

2) Sodium dodecyl sulfate 전기영동

Laemmli 등의 방법²⁴⁾으로 SDS-polyacrylamide gel 전기영동한 후 표준 단백질과의 상대적 이동거리로부터 분자량을 산정하였다. 즉 정제 효소와 표준 단백질을 2% SDS와 5% 2-mercaptoethanol을 함유한 0.0625M tris 완충액(pH 6.8)으로 2분간 비등수욕에서 열처리한 다음 7.5% poly acrylamide gel을 사용, 0.025M tris 완충액(pH 8.3)계에서 칼럼당 3 mA로 3시간 영동한 후 Coomassie brilliant blue R-250으로 염색하였다. 이 때 단

Table 1. Operating conditions of gas liquid chromatography

Instrument	Analytical Instruments Model 92
Detector	Flame ionization detector
Column	5% SE-30 180 cm×3 mm I.D.
Carrier gas	N ₂ gas
Flow rate	30 ml/min
Detection temp.	270°C
Injection temp.	270°C
Column temp.	120°C(3 min)→260°C(20 min) ramp rate 5°C/min

백질 분자량 측정용 marker로는 sigma사제(β-galactosidase, bovine serum albumin, ovalbumin, carbonic anhydrase, soybean trypsin inhibitor, α-lactalbumin)를 사용하였다.

3) 등전점 전기영동

Righetti 등의 방법²⁵⁾에 따라 실시하였다. 즉 2% ampholyte(pH 3~10) 및 5% glycerol을 함유하는 6% acrylamide의 rod형 겔을 중합시킨 후, anolyte로 0.01M 인산용액, catholyte로 0.02M NaOH 용액을 사용하여 30분간 전기영동하여 ammonium persulfate를 제거하였다. 시료를 겔 튜브 내에 주입 후 400V에서 1 mA/column의 전류로 6시간 전기영동 후 겔은 Coomassie blue R-250으로 염색하였다. pH 측정용 겔은 0.5 cm 간격으로 잘라 증류수로 마쇄, 용출시킨 다음 1시간 방치 후 pH 미터로 pH를 측정하였다

4) HPLC

정제효소의 분자량은 Syncropak GPC 100 칼럼을 장착한 HPLC를 사용하여 Table 2와 같은 조건으로 표준

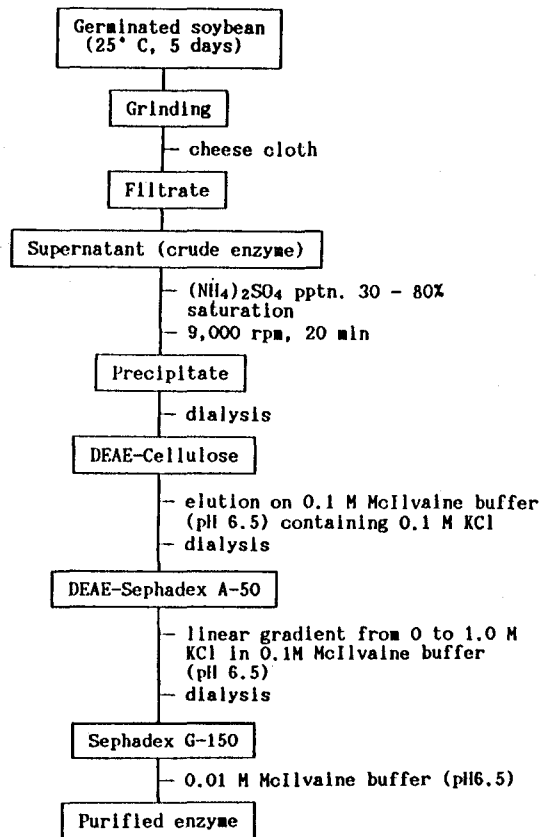


Fig. 1. Schematic diagram for purification of α-galactosidase from soybean.

단백질과의 상대적 유출속도를 비교하여 측정하였다

효소학적 성질

1) Km값 및 Vmax

0.1M McIlvaine 완충액(pH 6.5)에서 PNPG(0.125~10 mM) 기질용액 0.1 ml에 정제효소 0.1 ml을 가하여 40°C, 10분간 반응시켜 생성된 PNP를 측정하여 반응속도를 구한 다음 Lineweaver-Burk plot²⁶⁾하여 Km값과 Vmax를 구하였다.

2) 활성화 에너지

정제효소의 활성화에너지(Ea)를 구하기 위하여 일정량의 효소액을 30~70°C의 온도범위에서 2 mM PNPG 용액과 반응시켜 기질의 가수분해속도 대 온도를 반대

수표에도시하였다. 즉 Arrhenius 식²⁷⁾으로 $E_a = -2.3RT_2 \cdot T_1 / (T_2 - T_1) \cdot \log k_2 / k_1$ 으로 나타낸 다음 log Vmax에 대하여 $10^3 \cdot K^{-1}$ 를 도시한 기울기(slope = $-E_a / 2.3 R$)로부터 활성화 에너지를 계산하였다.

결과 및 고찰

대두 α -galactosidase의 활성

1) 각종 두류의 α -galactosidase 활성

황금콩, 방사콩, 청방콩, 검정콩을 실온에서 5일간 발아시켜 α -galactosidase 활성을 측정한 결과는 Fig. 2와 같이 황금콩의 활성은 620 U/ml, 방사콩은 534 U/ml, 검정콩은 285 U/ml로써 황금콩의 활성이 가장 높았으며 현재까지 α -galactosidase는 mung bean,⁹⁾ winged bean,⁴⁾ coffee bean,^{10,11)} broad-bean,^{7,8)} cowpea 등^{13,14)}의 두류에 존재하는 것으로 보고되어 왔으나 발아조건, 효소추출 방법, 효소활성 측정방법 등이 달라 재료에 따른 효소 활성을 비교하기가 곤란하였다.

2) 발아과정중 α -galactosidase의 활성 및 소당류의 변화

대두를 25°C에서 6일동안 발아시키면서 α -galactosidase 활성을 조사한 결과는 Fig. 3과 같이 무발아 대두의 경우는 542 U/ml의 활성을 보였으나 침지 12시간부터 활성이 높아지기 시작하여 발아 120시간에 660 U/ml로 가장 높은 활성을 나타내었고 그 후에는 감소하였다.

Table 2. Operating conditions of high performance liquid chromatography

Instrument	Waters Model 451
Column	Synchrom GPC 100(300×7.8 mm I.D.)
Detector	U.V. 280 nm
Mobile phase	0.1 M potassium phosphate containing 0.2 M NaCl (pH 6.8)
Flow rate	0.5 ml/min

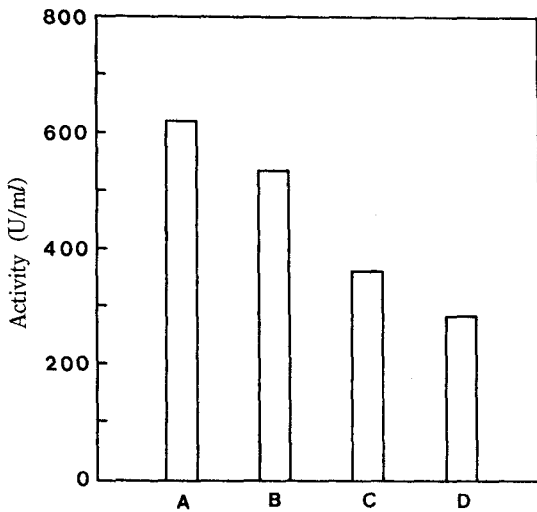


Fig. 2. α -Galactosidase levels in germinated soybeans.

A : soybean (Hwang Keum Kong), B : soybean (Bang Sa Kong), C : soybean (blue bean), D : soybean (black bean)

* Soybeans were germinated at 25°C for 5 days.

* Germinated soybeans were ground with 0.1 M McIlvaine buffer solution (pH 6.5).

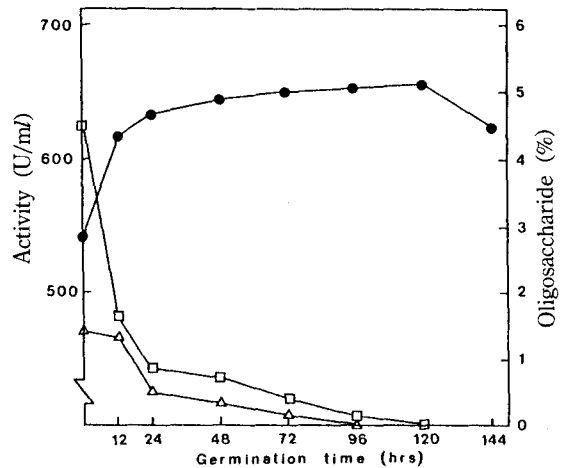


Fig. 3. Changes of oligosaccharide contents and α -galactosidase activities during the germination of soybean.

●—● : α -galactosidase activity, \triangle — \triangle : raffinose, \square — \square : stachyose

한편 raffinose와 stachyose는 발아가 진행됨에 따라 급격히 감소하여 raffinose는 발아 96시간에, stachyose는 발아 120시간에 완전히 분해되었다.

이상의 결과로부터 황금콩의 α -galactosidase는 25°C에서 120시간 발아시켰을 때 최대 활성을 나타내었으므로 이 조건에서 발아시켜 효소를 추출하여 실험을 수행하였다.

한편, Hsu 등⁶⁾은 대두중의 raffinose와 stachyose가 발아 216시간, East 등⁵⁾은 raffinose가 발아 96시간에 stachyose는 발아 144시간에 완전히 분해되었다고 보고하고 있어 본 결과는 그들 결과와 유사하며 이와같은 결과는 발아과정중 생성된 대두 α -galactosidase가 작용하여 소당류가 분해되기 때문으로 생각된다.

대두 α -galactosidase의 정제

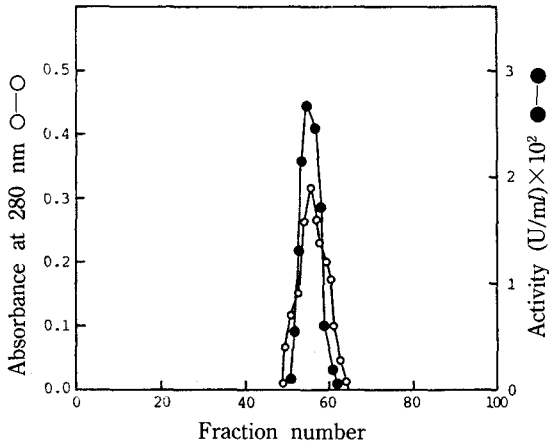


Fig. 4. Gel filtration of soybean α -galactosidase on Sephadex G-150.

5일간 발아시켜 추출한 조효소액으로부터 황산암모늄을 30~80%의 범위에서 분리회수된 분획을 모아 투석하여 DEAE-Cellulose column에 흡착시킨 다음 0.1 M KCl로 용출시킨 결과는 Table 3에 표시한 바와 같고, 유안염석에 의하여 비활성이 294 U/mg, DEAE-Cellulose에 의하여 354 U/mg이 되도록 정제되었다. 이 방법에 의해서 얻은 활성분획을 모아 투석한 후 DEAE-Sephadex A-50 column에 흡착시킨 다음 KCl의 직선농도 구배로 효소를 용출시킨 결과 비활성은 743 U/mg을 나타냈다.

상기 DEAE-Sephadex A-50 column 크로마토그래피에 의하여 얻은 활성분획을 투석, 농축하여 Sephadex G-150으로 겔 크로마토그래피하여 Fig. 4와 같은 결과를 얻었으며, 효소 추출액의 비활성은 125 U/mg이었으나, 정제 효소의 비활성은 825 U/mg으로써 6.6배의 정제도와 2.5%의 회수율을 나타내었으며, 정제 효소를 HPLC 및 PAGE로 분석한 결과 Fig. 5, 6에 나타낸 바와 같이 단일 peak와 단일 band를 나타내어 균일하였다. 또한 정제 효소를 SDS와 2-mercaptoethanol로 100°C에서 2분간 열처리하여 SDS-PAGE 결과와 HPLC 결과를 비교하여 판단할 때 대두 α -galactosidase는 subunit구조를 갖고

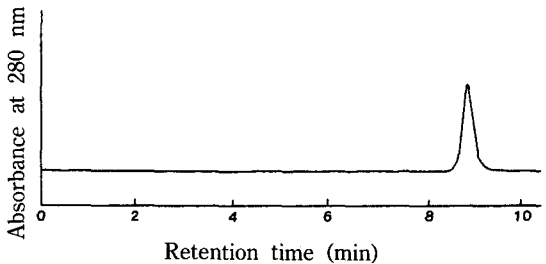


Fig. 5. HPLC pattern of the purified α -galactosidase.

Table 3. Summary of purification steps of soybeans α -galactosidase

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)	Purification factor (fold)
Crude enzyme	27,825	3,465,000	125	100	1.0
(NH ₄) ₂ SO ₄ fractionation (30~80% satn.)	6,000	1,765,000	294	50.9	2.4
DEAE-Cellulose chromatogr.	2,535	897,000	354	25.9	2.8
DEAE-Sephadex A-50 chromatogr.	250	185,800	743	5.4	6.0
Sephadex G-150 gel filtration	105	86,623	825	2.5	6.6

있지 않는 것으로 생각된다.

효소학적 성질

1) 최적 작용온도 및 열 안정성

Fig. 7과 같이 정제효소의 최적 작용온도는 40°C이었다.

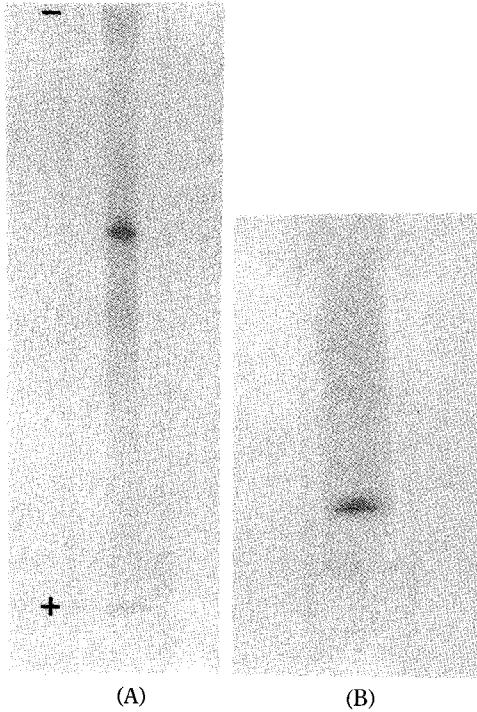


Fig. 6. PAGE (A) and SDS-PAGE (B) of α -galactosidase from soybean.

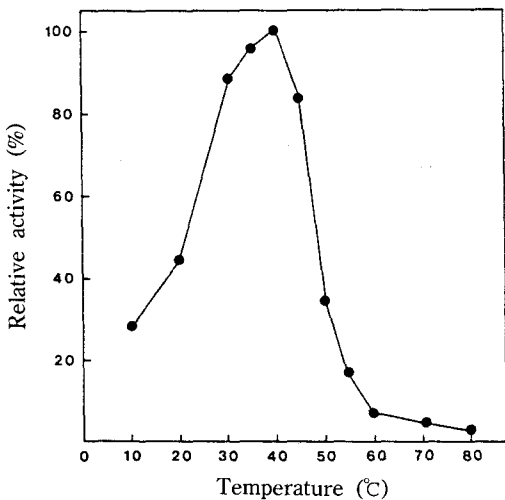


Fig. 7. Effect of temperature on α -galactosidase activity of soybean.

이 결과는 Alani 등¹⁴⁾이 cowpea의 α -galactosidase는 50°C라고 보고한 결과와 약간 다른 결과를 나타내고 있다.

Fig. 8과 같이 정제효소를 각 온도에서 15분간 방치 후 잔존 활성을 측정한 결과 40°C 이하에서 90%이상의 잔존활성을 보여 안정한 것으로 나타났으며, Fig. 9와 같이 정제효소는 60°C에서 10분 후 25%, 60분 후에 10%의 잔존활성을 보여 거의 실활되었다. Dey 등⁸⁾은 broad-bean의 α -galactosidase(I), (II)는 40°C에서 15분 처리시 80% 이상의 활성이 존재하나 60°C에서 처리할 경우 α -galactosidase(II)는 40%, α -galactosidase(I)은 80% 이상의 활성이 잔존하였다고 하였다. 본 결과는

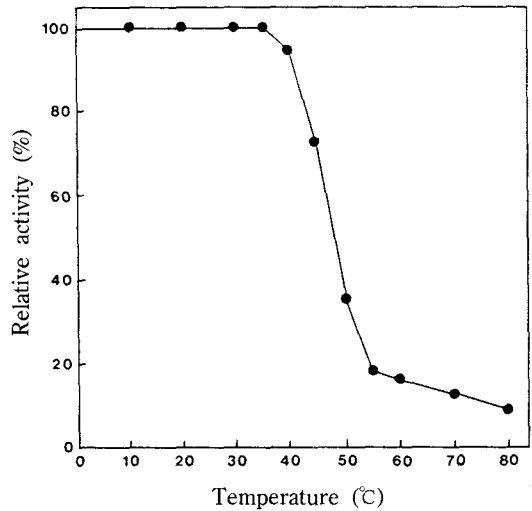


Fig. 8. Thermostability of α -galactosidase of soybean.

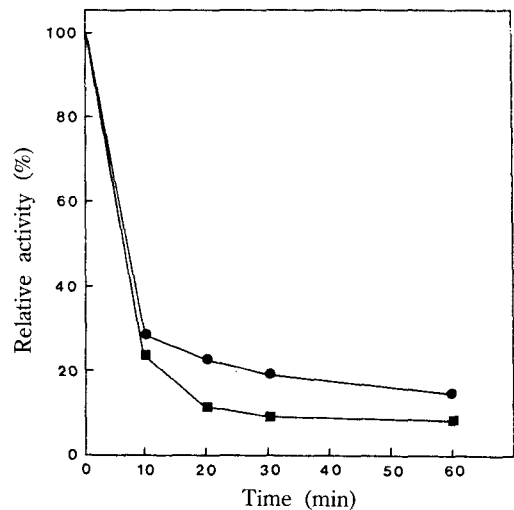


Fig. 9. Thermostability of α -galactosidase of soybean
●—● : 50°C, ■—■ : 60°C

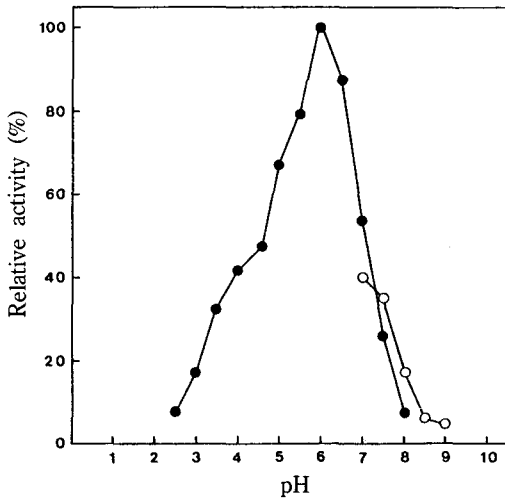


Fig. 10. Effect of pH on α -galactosidase activity of soybean.

●—● : 0.2 M Na_2HPO_4 -0.1 M citric acid buffer (pH 2.5~8.0), ○—○ : 0.1 M tris-0.1 M HCl buffer (pH 7.0~9.0)

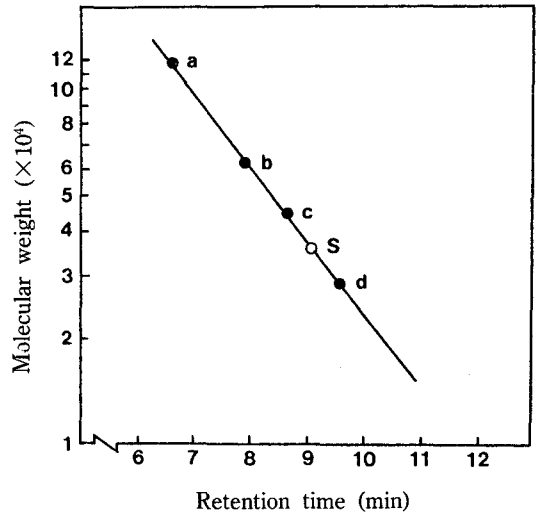


Fig. 12. Determination of molecular weights of α -galactosidase from soybean (S) by HPLC.

a : β -galactosidase (116,000), b : bovine serum albumin (66,000), c : ovalbumin (45,000), d : carbonic anhydrase (29,000)

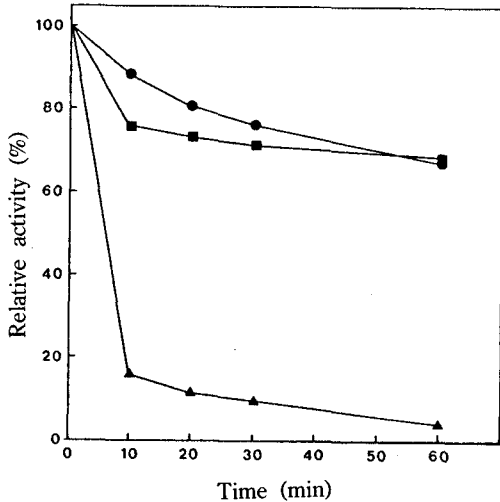


Fig. 11. pH stability of soybean α -galactosidase.

■—■ : pH 5.5, ●—● : pH 6.5, ▲—▲ : pH 7.5

Table 4. Substrate specificity of soybean α -galactosidase on oligosaccharides

Substrates (2 mM)	Reducing sugar ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
Raffinose	18.5
Stachyose	16.0

* The figures in the column indicate the amount of reducing sugar which produced from 2 mM of substrates under the conditions described in the text.

Table 5. Effect of metal ions on the activities of α -galactosidase of soybean

Reagents (10^{-3} M)	Relative activity (%)
Control	100
K^+	87
Ag^+	27
Mg^{2+}	84
Ca^{2+}	83
Ba^{2+}	85
Hg^{2+}	8
Co^{2+}	76
Fe^{2+}	94
Cu^{2+}	89
Zn^{2+}	89
Pb^{2+}	81
EDTA	84

Table 6. Effect of thiol reagents on the activities of α -galactosidase from soybean

Thiol reagent (10^{-3} M)	Relative activity (%)
Control	100
2-Mercaptoethanol	69
L-Cysteine-HCl	86

이들 결과에 비해 열안정성이 낮았다.

2) 최적 작용 pH 및 pH 안정성

Fig. 10에서와 같이 정제효소의 최적작용 pH는 6.0이였으며 이 결과는 cowpea α -galactosidase¹⁴⁾I, II², I¹은 각각 pH 5.0, pH 5.3, pH 5.9에 비하여 약간 중성쪽에 기울어져 있었다.

각 pH에서 처리시간에 따른 안정성은 Fig. 11과 같이

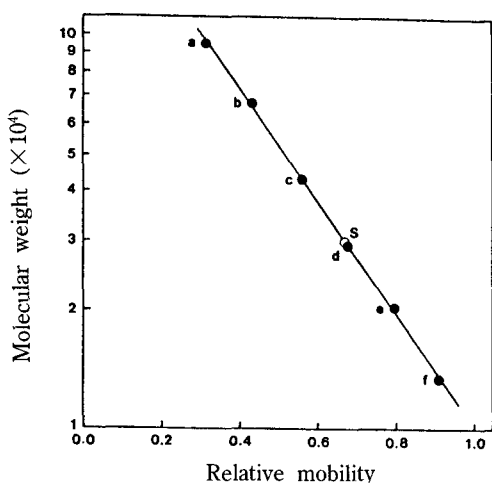


Fig. 13. Determination of molecular weights of α -galactosidase from soybean (S) by SDS-PAGE.

a : phosphorylase b (94,000), b : bovine serum albumin (67,000), c : ovalbumin (43,000), d : carbonic anhydrase (29,000), e : soybean trypsin inhibitor (20,100), f : α -lactalbumin (14,400)

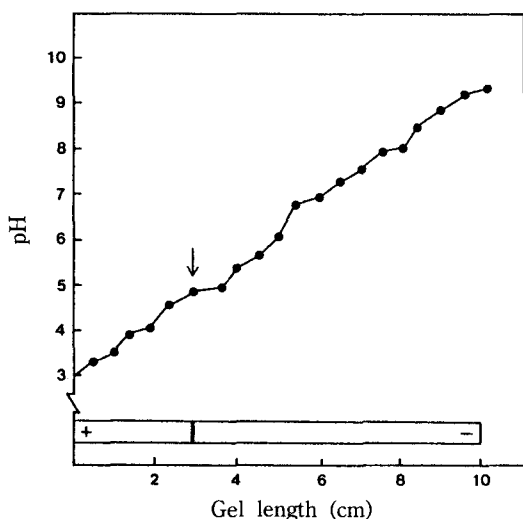


Fig. 14. Isoelectric focusing of α -galactosidase from soybean.

pH 5.5에서 10분 후 75%, 60분 후에는 70%, pH 6.5에서는 10분 후 90%, 60분 후에는 65%의 잔존활성을 보여 비교적 안정하였으나, pH 7.5에서는 10분 후 15%, 60분 후에는 3%로 거의 활성을 나타내지 않았다.

3) 기질 특이성

2 mM 농도의 raffinose, stachyose기질용액에 정제효소를 가하여 40°C에서 10분간 반응시킨 후 생성된 환원당을 정량한 결과는 Table 4와 같이 정제효소는 raffinose를 stachyose에 비하여 쉽게 분해하였다.

4) 금속이온의 영향

정제효소는 Table 5와 같이 Hg^{2+} , Ag^{+} 이온에 의해 심한 저해를 나타내었으며 기타 이온에 의해서는 별다른 영향을 받지 않았다. 한편 본 결과는 *Vicia sativa*,²⁸⁾ alfalfa¹⁵⁾

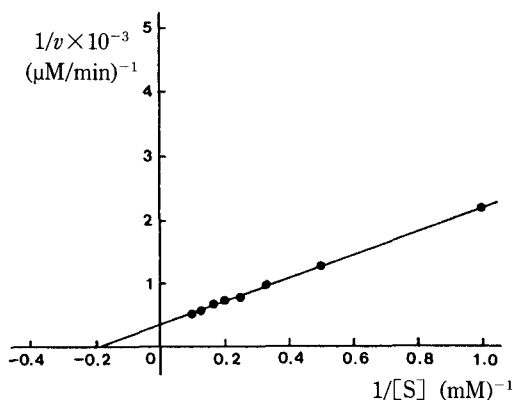


Fig. 15. Km value of α -galactosidase from soybean for PNPG determined by Lineweaver-Burk plot.

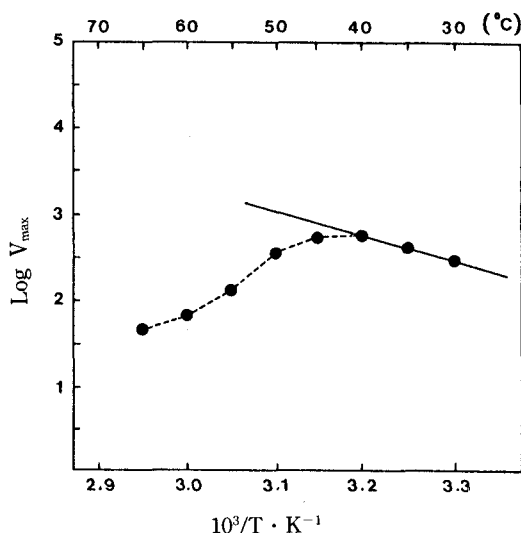


Fig. 16. Effect of temperature on α -galactosidase (Arrhenius plot).

종자 등의 α -galactosidase가 Hg^{2+} 와 Ag^+ 에 의해서 심하게 저해된다고 보고한 결과와 일치하였다.

5) 분자량 및 등전점

HPLC에 의하여 marker와 정제효소 단백질의 상대적 유출속도를 측정, 분자량을 산정한 결과는 Fig. 12와 같이 36,000으로 나타났다. SDS-PAGE에 의해 marker와 정제효소 단백질의 상대적 이동도를 측정하여 분자량을 산정한 결과는 Fig. 13과 같이 30,000으로 나타났다. 이들 결과로 보아 정제효소는 분자량 30,000의 monomer로 인정된다. Carchon 등¹⁰⁾은 커피콩 α -galactosidase의 분자량이 28,000(I), 36,500(II), Dey 등⁸⁾는 broad-bean α -galactosidase는 대부분 20,000~40,000의 monomer로 보고되어 있으나 mung bean⁹⁾의 분자량이 38,000(II)이었다고 보고하는 등, 두과식물의 α -galactosidase는 대부분 20,000~40,000의 monomer로 보고되어 있으나 mung bean⁹⁾의 경우는 분자량 45,000내외의 monomer 4개로 구성된 분자량 160,000의 tetramer로 인정되었다고 보고하였다.

정제효소의 등전점은 측정된 결과 Fig. 14와 같이 pH 4.8로 나타났다.

6) Km값 및 Vmax

정제효소의 PNPG에 대한 Km값 및 Vmax를 측정하여 Fig. 15와 같은 결과를 얻었다. PNPG에 대한 Km값과 Vmax는 5.3 mM, $2.85 \times 10^3 \mu M/min$ 를 나타내었다. 한편 mung bean⁹⁾ α -galactosidase의 경우 PNPG에 대한 Km값은 0.2 mM, broad-bean⁸⁾ α -galactosidase(I)(II)의 PNPG에 대한 Km값은 각각 0.38 mM, 0.45 mM로 보고하고 있다.

7) 활성화 에너지

Fig. 16와 같이 PNPG를 기질로 하여 정제효소의 활성화 에너지(Ea)를 측정된 결과, 13.024 Kcal/mole이었다. 이는 40°C 이상에서는 효소 단백질의 열변성으로 직선관계가 성립되지 않아 30~40°C 사이에서 얻는 값이며, 온도 10°C 상승에 따른 반응속도계수(Q₁₀)는 해당온도 범위에서 Q₁₀ = 2.0 이었다.

참 고 문 헌

- Omosaiye, O., Cheryan M. and Matthews, M.E. : J. of Food Sci., 43 : 354(1978)
- Mathew, C. D. and Balasubramaniam, K. : Phytochemistry, 26 : 1299(1987)
- Rackis, J. J., Sessa, D. J., Steggerda, F. R., Schimizu, T., Anderson T. and Pearl, S. L. : J. of Food Sci., 35 : 634(1970)
- Puwastien, P. and King, R. D. : Lebensm. -Wiss. u. Technol., 17 : 336(1984)
- East, J. W., Nakayama, T. O. M. and Parkman, S. B. : Crops Science, 12 : 7(1972)
- Hsu, S. H., Hadley, H. H. and Hymowitz, T. : Crops Science, 13 : 407(1973)
- Pridham, J. B., Walter, W. W. and Worth, H. G. J. : J. of Experimental Botany, 20 : 317(1969)
- Dey, P. M. and Pridham, P. B. : Biochem. J., 113 : 49(1969)
- Hankins, C. N. and Shannon, L. M. : J. Biol. Chem., 253 : 7791(1978)
- Carchon, H. and Bruyne, C. K. D. : Carbohydrate Research, 41 : 175(1975)
- Harpaz, N., Flowers, H. M. and Sharon, N. : Biochimica et Biophysica Acta, 341 : 213 (1974)
- Balasubramaniam, K. and Mathew, C. D. : Phytochemistry, 25 : 1819(1986)
- King, M. M. : Ph. D. Thesis, Arkansas University (1987)
- Alani, S. R. : Ph. D. Thesis, Michigan State University(1988)
- Itoh, T., Shimura, S. and Adachi, S. : Agric. Biol. Chem., 43 : 1499(1979)
- Malhotra, O. P. and Dey, P. M. : Biochem. J., 103 : 508(1967)
- 홍재식, 김대영 : 한국식품과학회지, 20 : 459(1988)
- 정상수, 이서래 : 한국식품과학회지, 18 : 450(1986)
- Bahl, O. P. and Agrawal, K. M. L. : J. Biol. Chem., 244 : 2970(1969)
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. T. : J. Biol. Chem., 193 : 265(1951)
- Somogyi, M. : J. Biol. Chem., 195 : 19(1952)
- Nelson, N. : J. Biol. Chem., 153 : 375(1944)
- Davis, J. : Annual N. Y. Academy Sci., 121 : 404(1964)
- Rickwood, D. and Hames, B. D. : Gel electrophoresis of protein. pp. 1-91, IRL press limited, England(1981)
- Righetti, P. and Drydale, J. W. : Biochem. Biophysics Acta, 236 : 17(1971)
- Lineweaver, H. and Burk, D. : J. Amer. Chem. Soc., 56 : 658(1934)
- 김창환, 하정욱 : 생화학계산법, p. 326, 유한문화사(1986)
- Petek, F., Villarroya et, E. and Courtois, J. E. : European J. Biochem., 8 : 395(1969)

Purification and properties of soybean α -galactosidase

Jong-Hwa Keum*, Man-Jin Oh and Seong-Yeol Kim(*Department of Food and Nutrition, Taejon Medical Junior College, Department of Food Technology, Chungnam National University, Taejon 305-335, Korea)

Abstract : To elucidate enzymatic properties of α -galactosidase (EC 3, 2, 1, 22) from germinated soybean, changes in the enzyme activities and oligosaccharide contents during germination of soybean were determined. α -Galactosidase from germinated soybean was purified by ammonium sulfate fractionation, ion exchange chromatography and gel filtration. Their chemical and enzymatic properties was investigated. α -galactosidase activity of soybean was maximized when it was germinated at 25°C for 120 hour. Raffinose and stachyose in soybean were decomposed completely after 96 hours and 120 hours of germination, respectively. Soybean α -galactosidase was purified by 6.6 fold by ammonium sulfate fractionation, ion exchange chromatography on DEAE-Cellulose and Sephadex A-50, and gel filtration on Sephadex G-150. Its specific activity was 825 Units/mg protein and the yield was 2.5% of the total activity of crude extracts. The purified α -galactosidase of soybean was found to be homogeneous by polyacrylamide gel electrophoresis and by HPLC. Isoelectric point of soybean α -galactosidase was determined analytical isoelectric focusing to be pH 4.8. The soybean α -galactosidase was monomeric and its molecular weight was estimated to be 30,000 by SDS-PAGE. The optimal temperature and pH for the soybean α -galactosidase activity were 40°C and pH 6.0 and 75% of its activity was lost by heating at 60°C for 10 min. The enzyme was appeared to have higher affinity to raffinose than to stachyose. The Km value of soybean enzyme was 5.3 mM for p -nitrophenyl- α -D-galactopyranoside and the activation energy on PNPG was calculated to be 13.02 Kcal per mole.