

Aspergillus niger α -Galactosidase의 정제 및 성질

금종화 · 오만진^{1*} · 김찬조¹

대전보건전문대학 식품영양학과, ¹충남대학교 식품공학과

Purification and Properties of α -Galactosidase from *Aspergillus niger*

Keum, Jong-Hwa, Man-Jin Oh^{1*} and Chan-Jo Kim¹

Department of Food and Nutrition, Taejeon Medical Junior College, Taejeon 300-090, Korea

¹Department of Food Technology, Chungnam National University, Taejeon 305-764, Korea

Abstract— To elucidate enzymatic properties of α -galactosidase (EC 3.2.1.22) from *Asp. niger*, α -galactosidase from wheat bran culture was purified by ammonium sulfate fractionation, ion exchange chromatography and gel filtration. And then its enzymatic properties were investigated. The highest level of α -galactosidase activity was obtained when *Asp. niger* was grown on wheat bran medium at 30°C for 96 hours. The α -galactosidase was purified by 23.7 fold by ammonium sulfate fractionation, ion exchange chromatography on DEAE-Cellulose and Sephadex A-50, and gel filtration on Sephadex G-150 and its specific activity was 1,229 Units/mg protein and the yield was 14% of the total activity of wheat bran culture. The purified α -galactosidase was found to be homogeneous by polyacrylamide gel electrophoresis and HPLC. The α -galactosidase was a tetrameric glycoprotein which consisted of identical subunits with molecular weight of 28,000 each by SDS-PAGE and isoelectric point was determined analytical isoelectric focusing to be pH 4.6. The optimal temperature and pH for the α -galactosidase activity were 40°C and pH 6.5, respectively, and 54% of its activity was lost by heating at 60°C for 10 mins. It was appeared to have higher affinity to raffinose than to stachyose. The K_m value and activation energy of α -galactosidase were 5.0 mM and 8.515 Kcal per mole for *p*-nitrophenyl- α -D-galactopyranoside, respectively.

대두는 가격이 저렴하고 단백질과 지질 등 영양성분의 함량이 높아 가공품의 원료로 널리 이용되고 있으나 대두 중에 존재하는 raffinose와 stachyose 등의 소당류(1)는 인체내에서 α -galactosidase가 생성되지 않기 때문에 분해되지 않으며 장내에서 세균에 의하여 혐기적 발효가 일어나 H₂, CO₂, methane 가스 등을 발생하여 팽만감을 주는 원인이 되는 것으로 알려지고 있다(2-4).

근래에 두유를 비롯한 각종 대두 제품의 소비가 증가되면서 이들 중의 소당류를 완전히 제거하거나 감소시키기 위한 많은 연구가 시도되고 있으며, 발아법(5-12), 발효법(13, 14) 및 한외 여과법(1) 등이

검토 보고된 바 있고 미생물 α -galactosidase를 이용한 소당류의 분해에 관한 많은 연구가 보고되고 있다.

미생물 기원의 α -galactosidase에 관한 연구로는 *Asp. niger*(15-20), *Asp. awamori*(21-23), *Asp. oryzae*(24-26), *Mortierella vinacea*(27-30), *Monascus pilosus*(31,32), *Candida javanica*(33), *Bacillus stearothermophilus*(34, 35), *Corticium rolfsii*(36), *Pycnoporus cinnabarinus*(37-39)로부터 α -galactosidase를 생산, 정제하여 성질을 검토, 보고하였다.

본 연구에서는 대두제품의 소당류를 미생물 α -galactosidase로 분해하기 위한 기초자료를 얻기 위하여 *Asp. niger*를 밀기울 고체배지에 배양하여 효소를 생산, 정제하고 효소학적 성질을 조사하여 몇가지 결과를 얻었으므로 보고하는 바이다.

Key words: *Aspergillus niger*, α -galactosidase

*Corresponding author

재료 및 방법

사용균주

충남대학교 식품공학과에 보관 중인 127주의 곰팡이 중 α -galactosidase의 활성이 가장 강한 *Aspergillus niger* ATCC 16513을 선정하여 공시균주로 하였다.

균의 배양 및 효소의 추출

밀기울 100g을 100 ml 삼각 플라스크에 넣어 수분 40%가 되도록 수도수를 첨가하여 121°C, 20분 살균한 후 *Asp. niger* 균주를 접종하여 30°C, 96시간 배양하였다. 배양물에 증류수 500 ml와 적당량의 해사를 가하여 마쇄하여 실온에서 3시간 추출한 다음 여과하여 효소 추출액으로 하였다.

활성 측정

효소의 활성은 정 등(15)의 방법에 준하여 측정하였다. 2 mM PNPG를 함유한 0.1 M McIlvaine 완충액 (pH 6.5) 1 ml에 효소액 1 ml를 가하여 40°C에서 10분간 반응시킨 후 1 M Na₂CO₃ 용액 5 ml를 가하여 반응을 정지시킨 다음 분광광도계로 400 nm에서 흡광도를 측정하여 생성된 p-nitrophenol(PNP)의 양을 측정하였다. 효소활성은 PNPG로부터 1분에 1 μ mole의 PNP를 유리하였을 때 1단위(17)로 하였다.

단백질 정량

단백질은 bovine serum albumin을 표준물질로 Lowry법(40)으로 정량하였으며 크로마토그래피의 용출 분획의 단백질은 280 nm에서 흡광도를 측정하여 표시하였다.

당 정량

환원당은 Somogyi-Nelson법(41,42)으로 정량하였다.

효소의 정제

상기와 같이 시험균주를 배양하여 효소를 추출한 후 Fig. 1과 같이 정제하였다.

단백질의 순도 검정 및 분자량 측정

Polyacrylamide disc gel 전기영동은 Davis의 방법(43)에 따라 pH 8.3의 tris 완충액계에서 8.5% acryla-

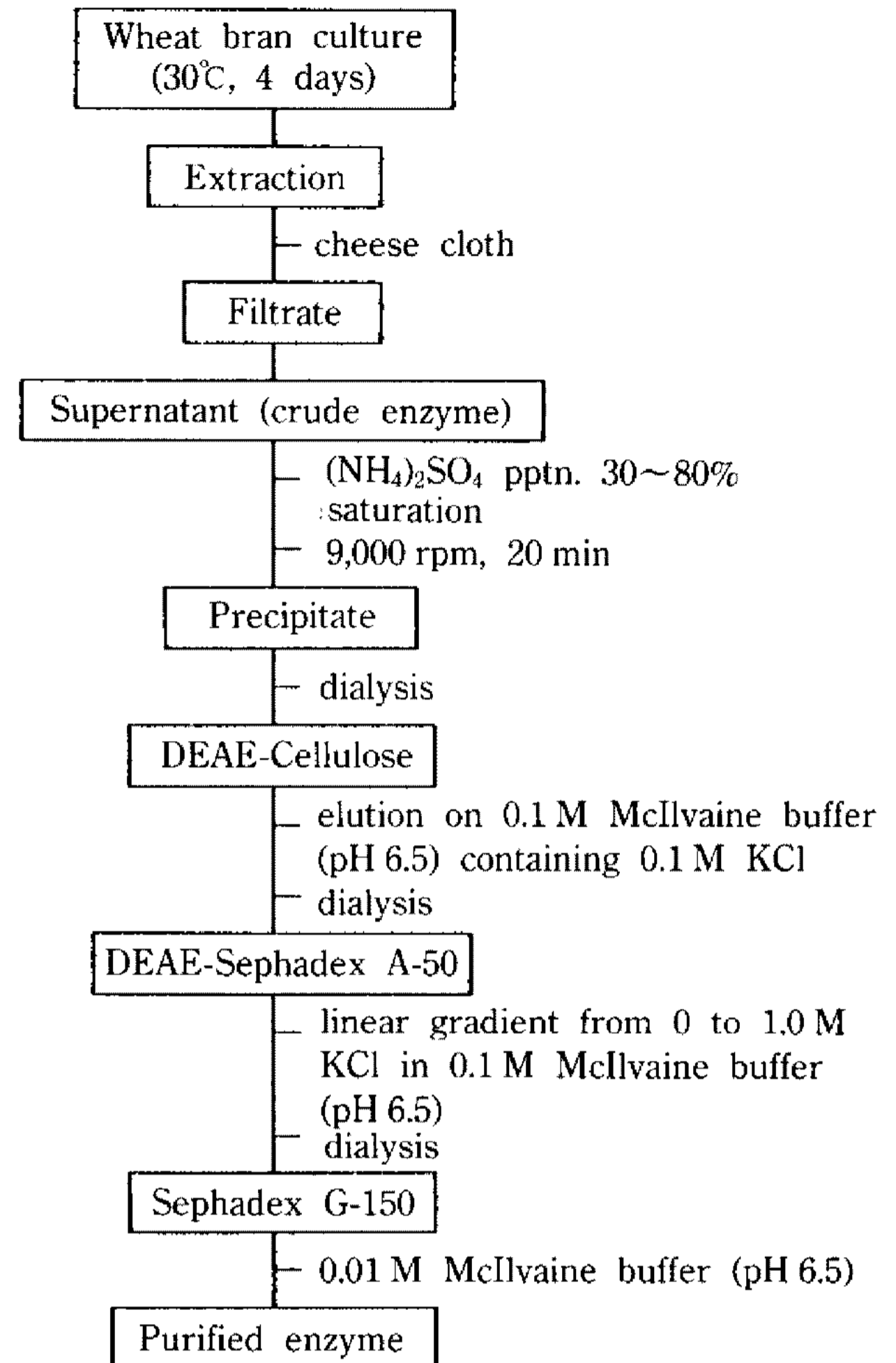


Fig. 1. Schematic diagram for purification of α -galactosidase from *Aspergillus niger*.

mide를 중합시켜 칼럼당 2 mA의 전류로 3시간 전기영동한 후 amido black 10B로 염색하였다.

Sodium dodecyl sulfate 전기영동은 Laemmli 등의 방법(44)으로 SDS-polyacrylamide gel 전기영동한 후 표준단백질과의 상대적 이동거리로부터 분자량을 산정하였다. 즉 정제효소와 표준단백질을 2% SDS와 5% 2-mercaptoethanol을 함유한 0.0625 M tris 완충액 (pH 6.8)으로 2분간 비등수욕에서 열처리한 다음, 7.5% polyacrylamide gel을 사용, 0.025 M tris 완충액 (pH 8.3)계에서 칼럼당 3 mA로 3시간 영동한 후 Coomassie brilliant blue R-250으로 염색하였다. 이때 분자량 측정용 marker로는 sigma사제(β -galactosidase, bovine serum albumin, ovalbumin, carbonic anhydrase, soybean trypsin inhibitor, α -lactoalbumin)를 사용하였다.

등전점 전기영동은 Righetti 등의 방법(45)에 따라 실시하였다. 즉 2% ampholyte(pH 3~10) 및 5% gly-

cerol을 함유하는 6% acrylamide rod형 겔을 중합시킨 후 anolyte로 0.01 M 인산용액, catholyte로 0.02 M NaOH 용액을 사용하여 30분 전기영동하여 ammonium persulfate를 제거하였다. 시료를 겔 튜브내에 주입 후 400 V에서 1 mA/column의 전류로 6시간 전기영동 후 겔을 Coomassie blue R-250으로 염색하였다. pH 측정용 겔은 0.5 cm 간격으로 잘라 증류수로 마쇄 용출시킨 다음 1시간 방치 후 pH미터로 pH를 측정하였다.

정제효소의 분자량은 Syncropak GPC 100 칼럼을 장착한 HPLC를 사용하여 Table 1과 같은 조건으로 표준단백질과의 유출속도를 비교하여 측정하였다.

당 단백질의 확인

정제효소의 당은 periodic acid schiff(PAS)로 염색(46)에 의하여 분석하였다. 즉 PAG 전기영동 후 겔을 trichloroacetic acid에 침지한 다음 과요소산으로 효소분자내의 당을 산화 개열시켜 생성된 aldehyde에 fuchsin sulfite 시약을 반응시켜 형성되는 schiff 염기 반응으로 당을 염색시켰다.

K_m 값 및 V_{max}

0.1 M McIlvaine 완충액(pH 6.5)에서 PNPG(0.125~10 mM)의 각 농도별 기질용액 0.1 ml에 정제효소 0.1 ml를 가하여 40°C 10분간 반응시킨 다음 생성된 PNP를 측정하여 반응속도를 구한 다음 Lineweaver-Burk plot(47)하여 K_m 값과 V_{max} 를 구하였다.

활성화에너지

정제효소의 활성화에너지(E_a)를 구하기 위하여 일정량의 효소액을 30~70°C의 온도범위에서 2 mA PNPG 용액과 반응시켜 기질의 가수분해속도 대 온도를 반대수표에 도시하였다. 즉 Arrhenius식(48)으로 $E_a =$

$-2.3 RT_2T_1/(T_2-T_1)\log K_2/K_1$ 으로 나타낸 다음 $\log V_{max}$ 에 대하여 $10^3 K^{-1}$ 를 도시한 기울기(slope = $-E_a/2.3 R$)로부터 활성화에너지를 계산하였다.

분해산물의 확인

0.5% stachyose, raffinose 및 melibiose 용액에 정제효소를 가하여 40°C, 24시간 반응시킨 다음 silica gel TLC판에 당표준액 및 반응액을 점적하여 benzene-acetic acid-methanol(20:20:60)을 전개용매로 20°C, 2시간 전개시킨 후 15% ethanolic- α -naphthol : H₂SO₄ : ethanol : H₂O(10.5:6.5:40.5:4.0) 용액을 분무하여 100°C에서 건조시켜 발색(49)하였다.

결과 및 고찰

*Aspergillus niger*의 α -galactosidase 생산

밀기울 배지를 이용하여 *Asp. niger*의 α -galactosidase 생산에 미치는 배양시간의 영향을 조사한 결과, Fig. 2와 같이 효소활성은 배양 4일째 가장 높았다. 이는 *Asp. oryzae*(25)가 4~7일에 최대 활성을 보였다는 결과와 유사하였다. 이 결과로 미루어 곰팡이 α -galactosidase는 30~40%의 수분을 함유한 밀기울

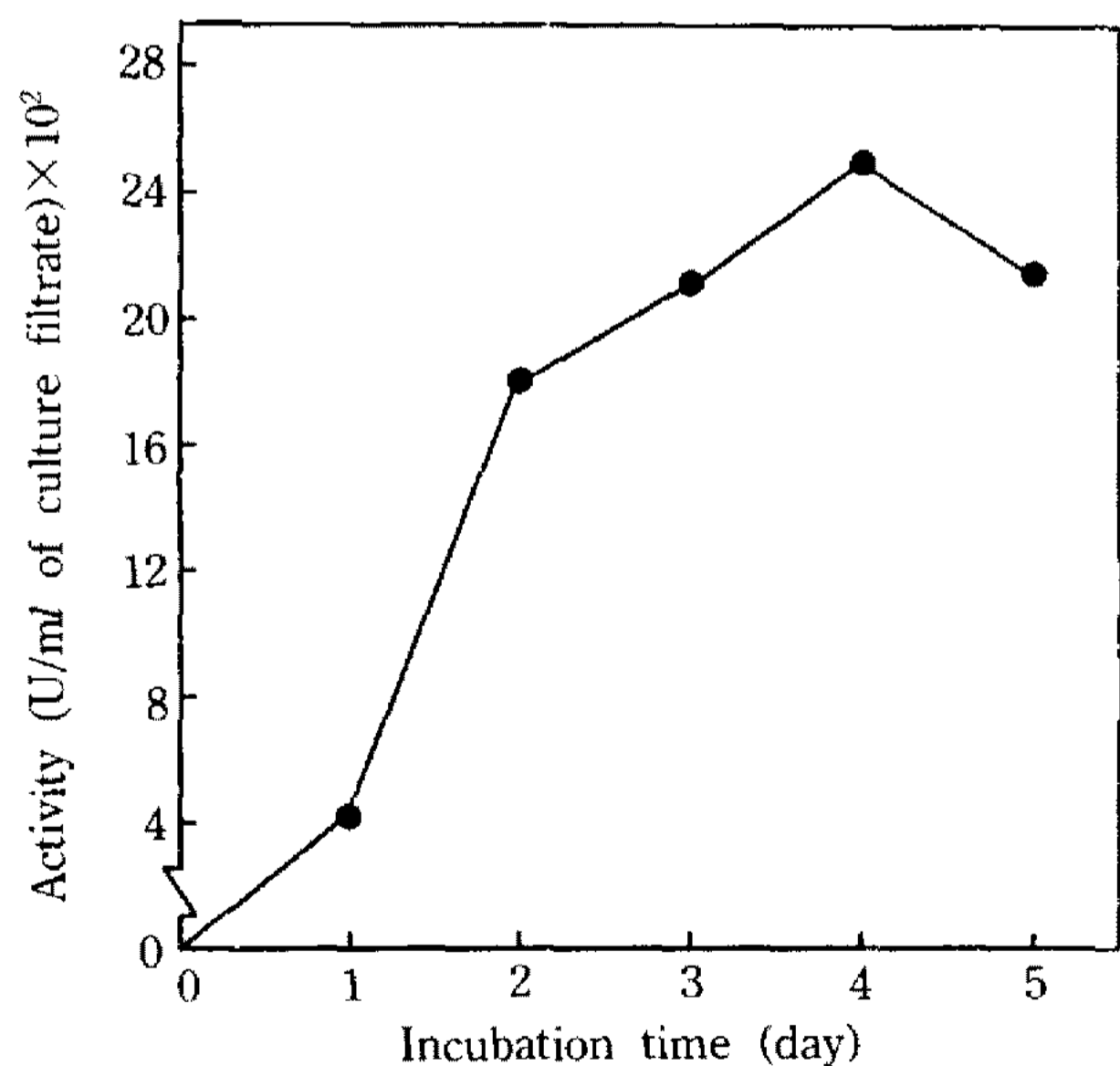


Fig. 2. Time course of α -galactosidase production from *Aspergillus niger*.

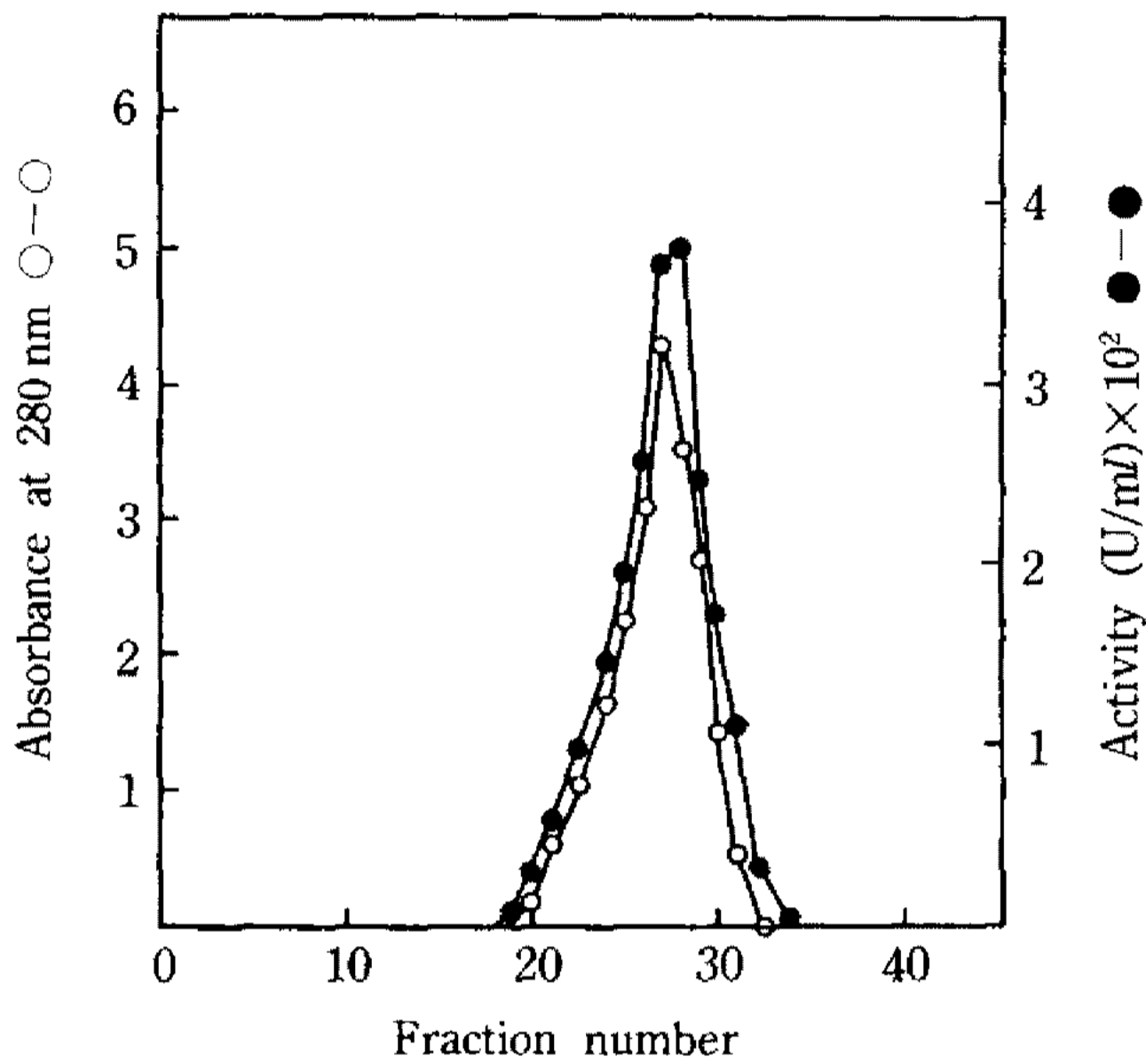
Aspergillus niger was grown at 30°C on the wheat bran medium. Crude enzyme solution was extracted from the wheat bran culture by adding 5-volumes of 0.1 M-McIlvaine buffer (pH 6.5) and incubating 3 hour at room temperature.

Table 1. Operating conditions of high performance liquid chromatography

Instrument	Waters Model 451
Column	Syncropak 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

Table 2. Summary of purification steps of *Aspergillus niger* α -galactosidase

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)	Purification factor (fold)
Crude enzyme	39,000	2,072,000	52	100	1.0
(NH ₄) ₂ SO ₄ fractionation (30~80% satn.)	3,675	1,860,000	506	89.8	9.8
DEAE-Cellulose chromatography	635	531,000	836	25.6	16.1
DEAE-Sephadex A-50 chromatography	335	352,240	1,052	17.0	20.3
Sephadex G-150 gel filtrationaphy	236	290,080	1,229	14.0	23.7

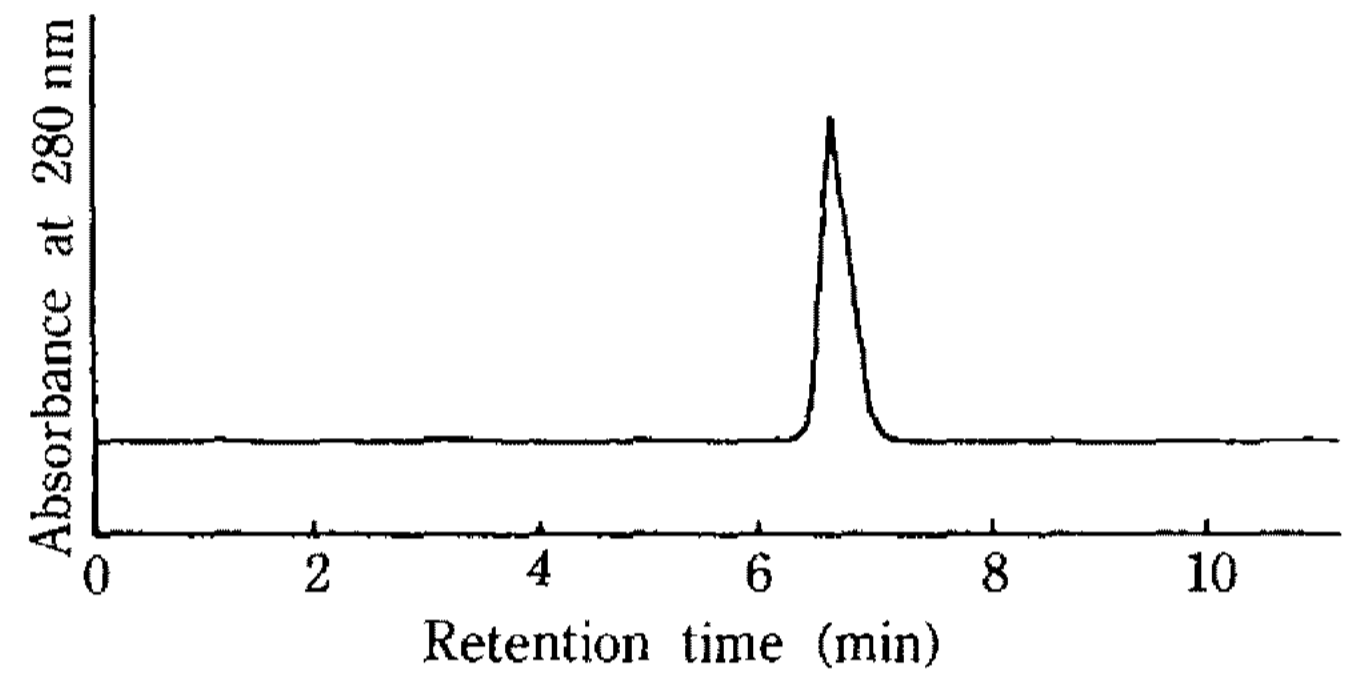
Fig. 3. Gel filtration of *Aspergillus niger* α -galactosidase on Sephadex G-150.

배지에서 4~5일 배양하는 경우 가장 높게 생산되는 것으로 생각된다.

α -Galactosidase의 정제

밀기울 배지로 30°C에서 4일간 배양한 액으로부터 황산암모늄을 30% 가해 원심분리하여 침전을 제거하고 황산암모늄을 다시 80%가 되도록 가하여 효소를 침전으로 회수하였다. 이를 투석농축하여 DEAE-Cellulose column에 흡착시킨 다음 0.1 M KCl로 용출시켰을 때의 결과는 Table 2에 나타난 바와 같았으며 유안염석 후의 비활성은 506 U/mg, DEAE-Cellulose 크로마토그래피의 결과는 비활성이 836 U/mg에 달하였다. 이것을 투석한 후 DEAE-Sephadex A-50 column에 흡착시킨 다음 KCl의 직선농도 구배로 효소를 용출시킨 결과, 비활성은 1052 U/mg을 나타냈다.

상기 DEAE-Sephadex A-50의 결과에서 활성분획

Fig. 4. HPLC pattern of the purified α -galactosidase.

을 모아 투석, 농축하여 Sephadex G-150으로 겔 크로마토그래피하여 Fig. 3과 같은 결과를 얻었으며 비활성 1,229 U/mg, 정제도 23.7배, 수율 14%를 나타내었고 전기영동과 HPLC에 의하여 순도가 균일함이 확인되었으므로 이를 정제효소로 인정하여 효소적 성질을 검토하였다.

효소의 순도

정제효소를 HPLC 및 PAG 전기영동으로 분석한 결과 Fig. 4, 5와 같이 단일 peak와 단일 band를 나타내어 균일하였다. 또한 각 정제효소를 SDS와 2-mercaptoethanol로 100°C에서 2분간 열처리하여 SDS-PAG 전기영동한 결과 Fig. 5와 같이 단일 band를 나타내어 균일하였다.

이들 결과로 미루어 판단할 때 *Asp. niger* α -galactosidase는 subunit 구조를 갖고 있지 않든가 가져도 동일 분자량의 subunit로 형성되어 있는 것으로 생각된다.

등전점

정제효소의 등전점을 측정한 결과 Fig. 6과 같이 pH 4.6으로 나타났다. 이 결과는 Lee 등(18)이 보고한

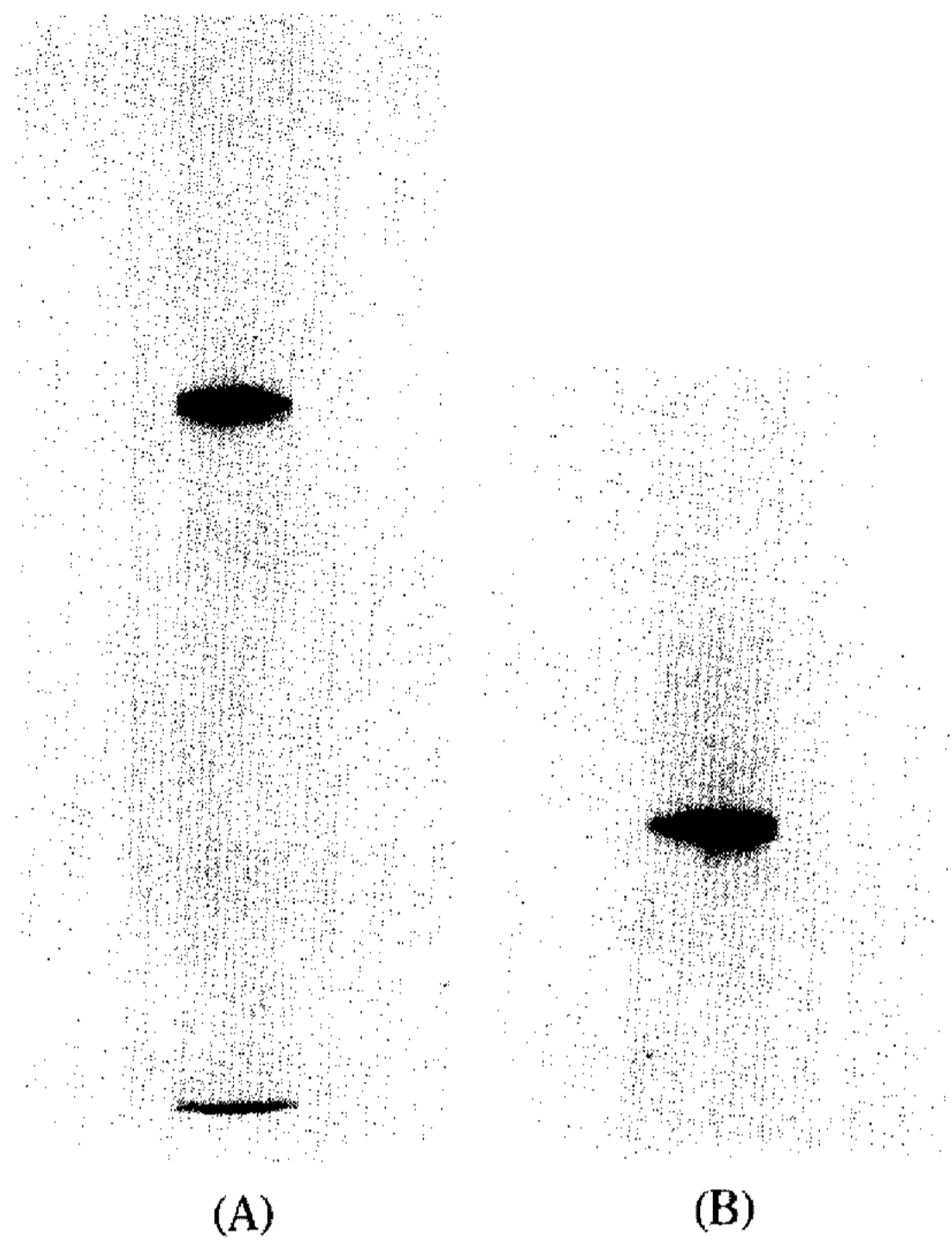


Fig. 5. PAGE (A) and SDS-PAGE (B) of α -galactosidase from *Aspergillus niger*.

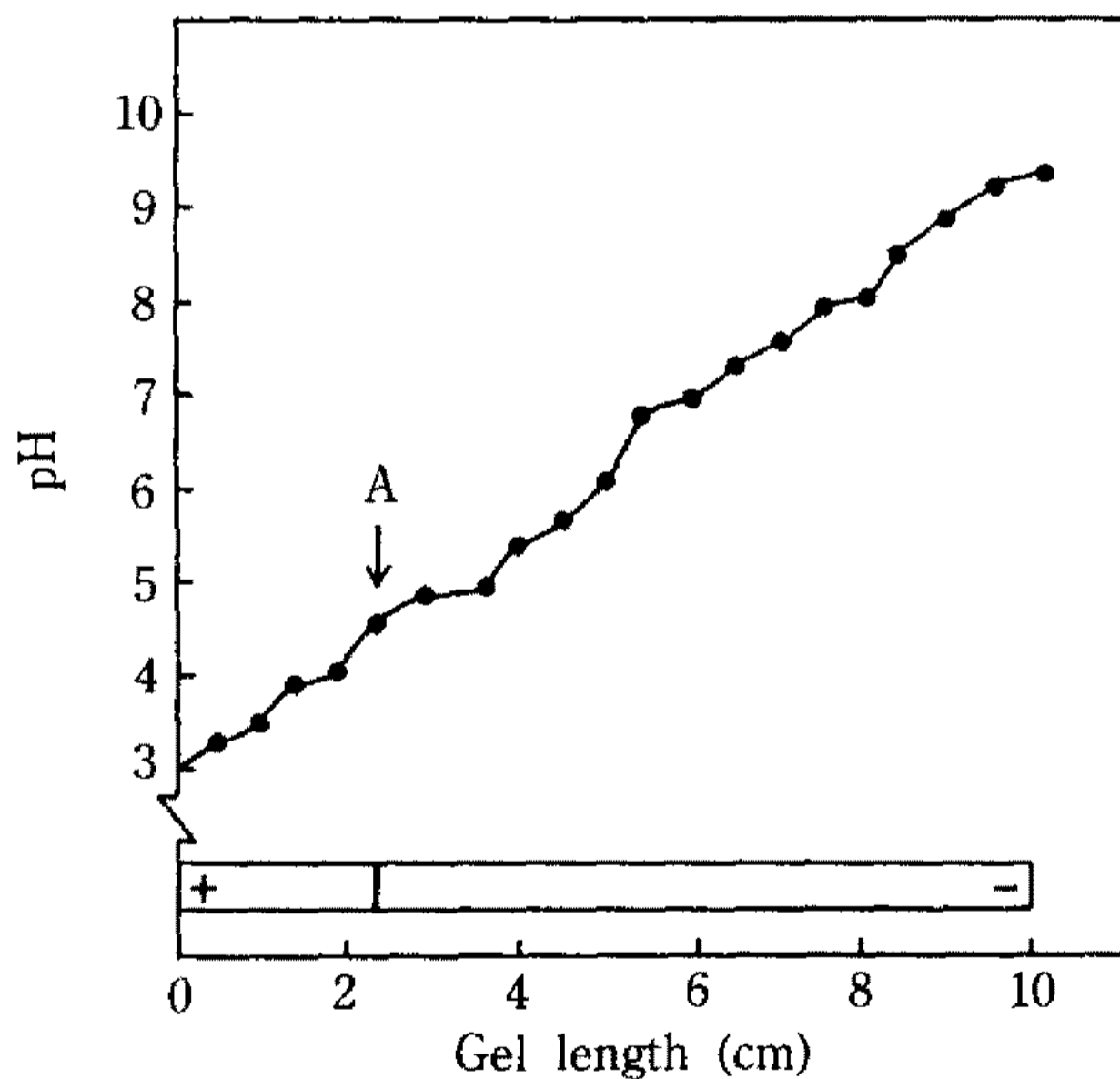


Fig. 6. Isoelectric focusing of α -galactosidase from *Aspergillus niger*.

*Asp. niger*의 α -galactosidase의 경우 pH 4.1~4.7의 등전점을 나타냈다는 결과와 유사하였다.

분자량

HPLC에 의하여 marker와 정제효소 단백질의 상대적 유출속도를 측정, 분자량을 산정한 결과는 Fig. 7과 같이 112,000으로 나타났고 SDS-PAGE에 의해

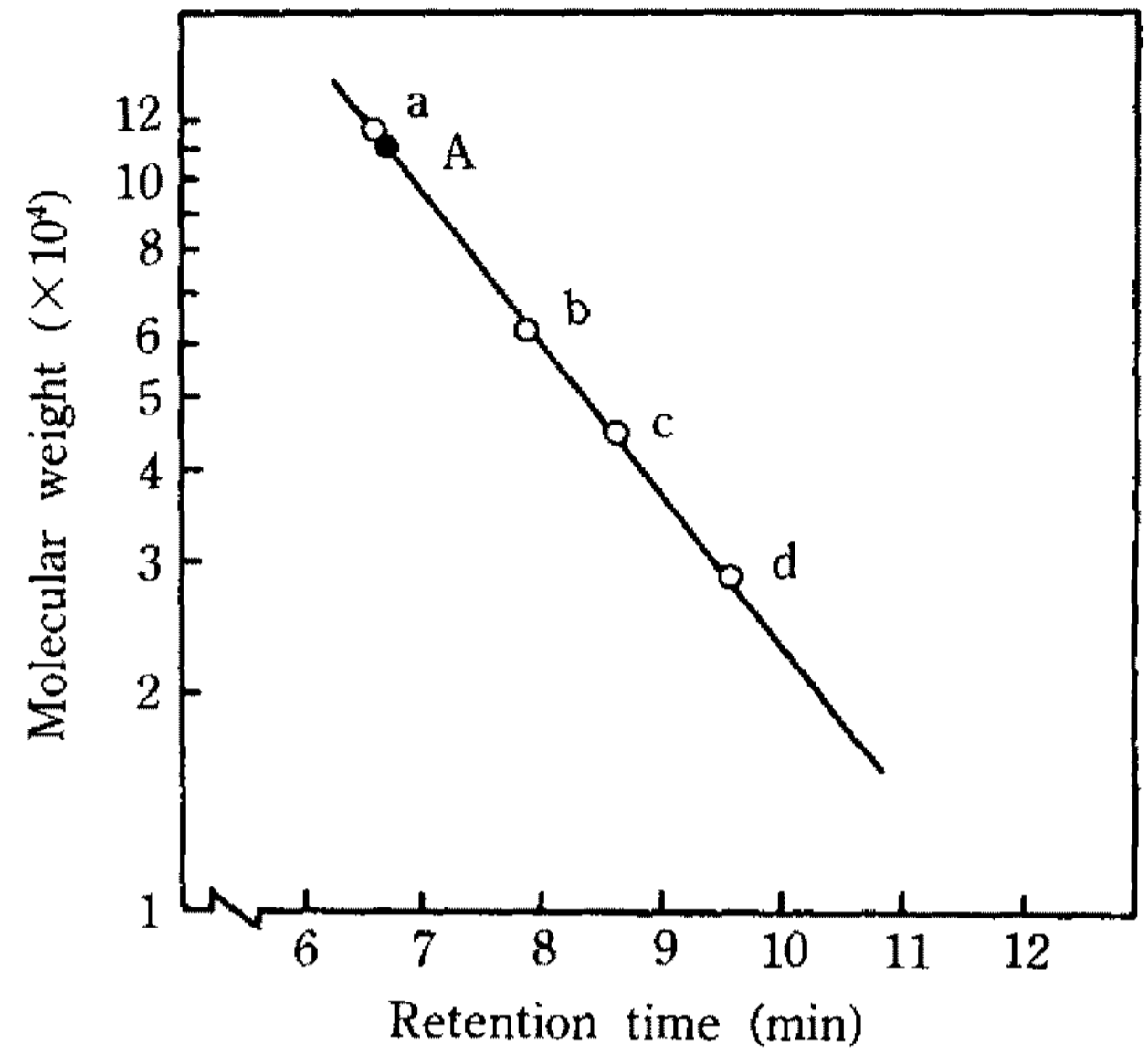


Fig. 7. Determination of molecular weight of α -galactosidase from *Aspergillus niger* by HPLC. a. β -galactosidase (116,000); b. bovine serum albumin (66,000); c. ovalbumin (45,000); d. carbonic anhydrase (29,000); A. α -galactosidase from *A. niger*

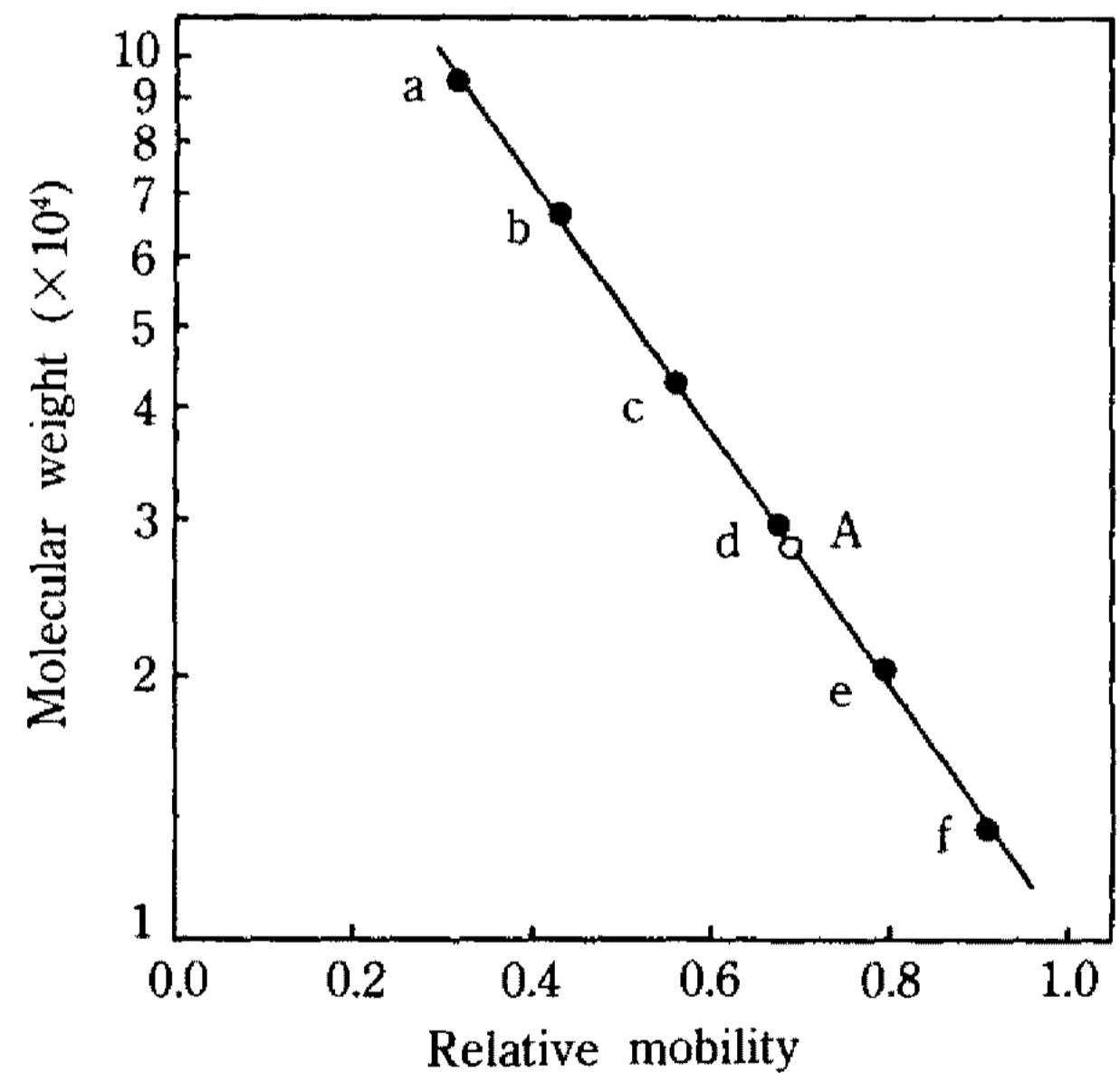


Fig. 8. Determination of molecular weight of α -galactosidase from *Aspergillus niger* by SDS-PAGE. a. phosphorylase b (94,000); b. bovine serum albumin (67,000); c. ovalbumin (43,000); d. carbonic anhydrase (29,000); e. soybean trypsin inhibitor (20,000); f. α -lactalbumin (14,400); A. α -galactosidase from *A. niger*

marker와 정제효소 단백질의 상대적 이동도를 측정하여 분자량을 산정한 결과는 Fig. 8과 같이 28,000으로 나타났다. 이 결과로 보아 *Asp. niger*의 α -galactosidase는 분자량 28,000의 monomer가 4개로 이루어진 분자량 112,000의 tetramer로 인정된다. 미생물



Fig. 9. PAS staining pattern on acrylamide gel electrophoresis of α -galactosidase from *Aspergillus niger*.

α -galactosidase의 분자량은 *Asp. saitoi*(50)의 α -galactosidase가 290,000, *Asp. oryzae*(25)의 α -galactosidase가 64,000 *Asp. awamorii*(23)의 α -galactosidase가 130,000 등으로 보고되어 다양하나 이들의 subunit 구조에 관하여는 검토된 바 없다.

당 단백질의 확인

정제효소를 전기영동 후 PAS로 염색한 결과는 Fig. 9와 같다. 그림에서와 같이 정제효소는 PAS에 의해 염색되었다. 따라서 *Asp. niger*의 α -galactosidase는 당을 함유하고 있는 것으로 판단된다. 그러나 구성당의 종류와 결합구조에 대해서는 밝히지 못하였다. 한편 당을 함유한 α -galactosidase에 관해서는 Adya 등(19), Civas 등(51), Suzuki 등(28)의 보고가 있어 본 실험 결과는 그들과 같은 결과를 나타내고 있다.

최적 작용온도 및 열안정성

Fig. 10과 같이 정제효소의 최적 작용온도는 40°C이었다. *Asp. oryzae*의 α -galactosidase에 대한 최적 작용온도는 Cruz 등(26)의 결과에서는 50°C, Annunziato 등(25)의 결과에서는 60°C이었으며, *Asp. awamorii*(23)의 α -galactosidase는 50°C이었다. 이들 결과에 비하여 본 결과는 낮은 최적 작용온도를 보이고 있다. Fig. 11과 같이 정제효소를 각 온도에서 15분

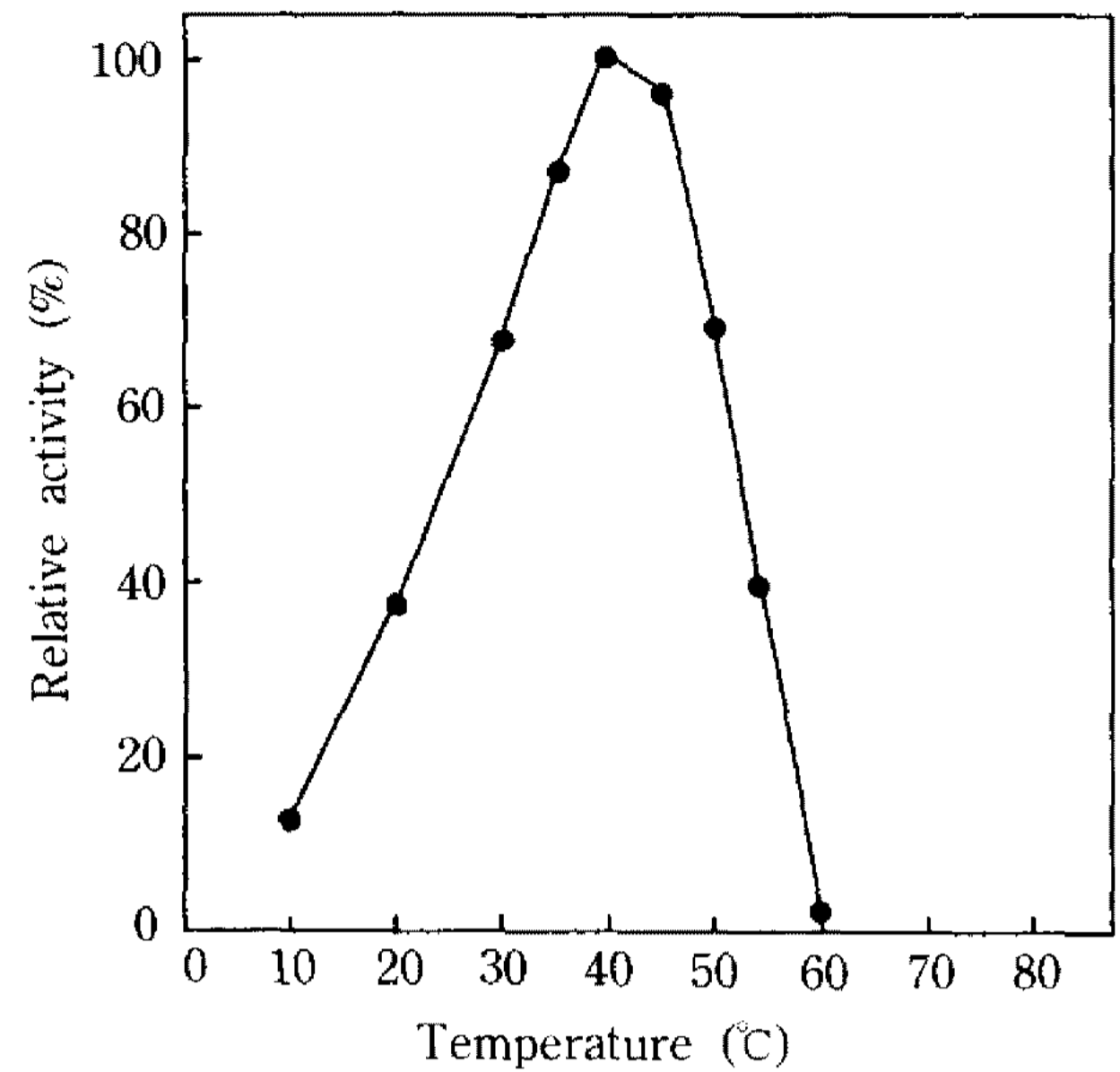


Fig. 10. Effect of temperature on α -galactosidase activity of *Aspergillus niger*.

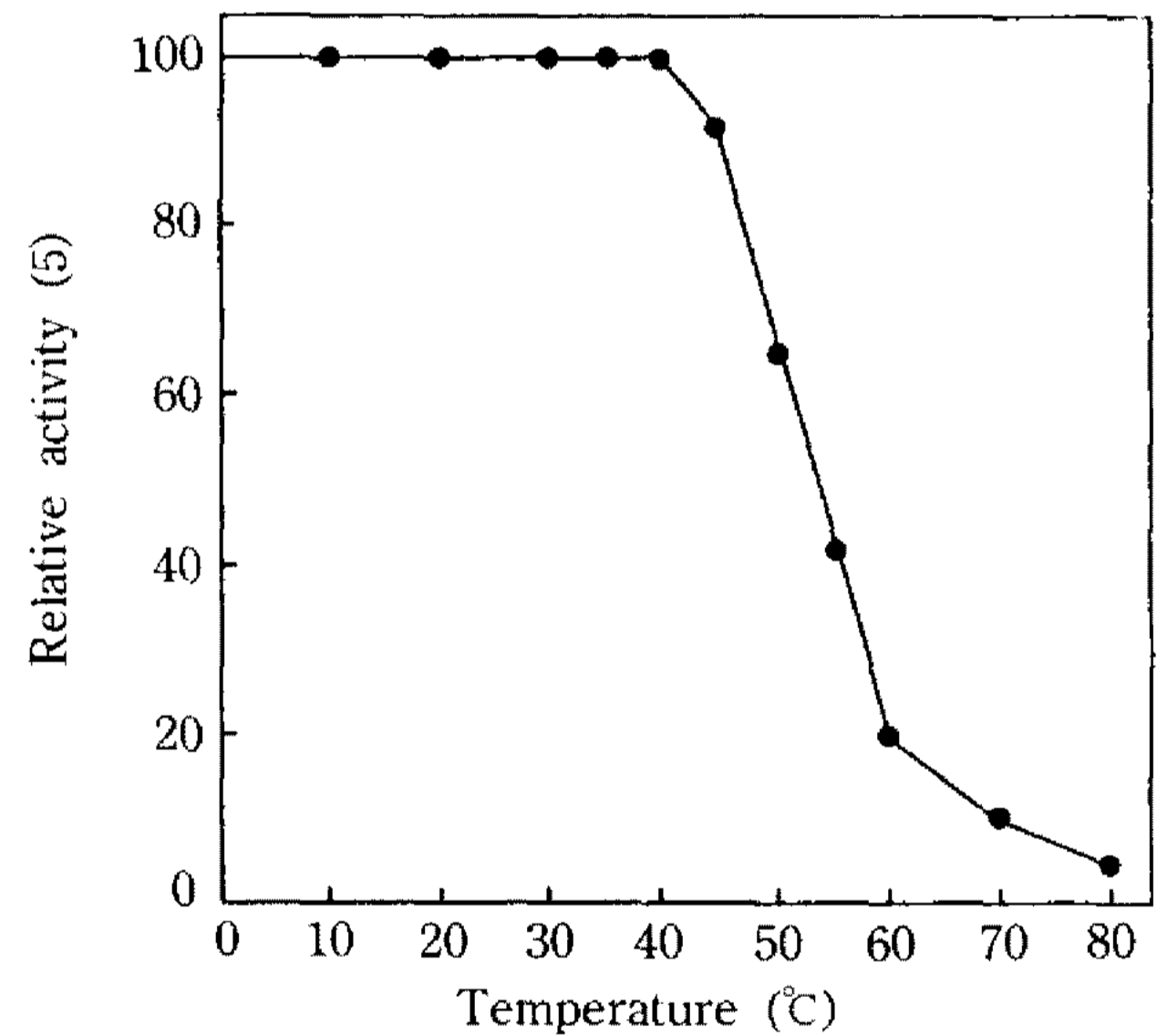


Fig. 11. Thermostability of α -galactosidase of *Aspergillus niger*.

방치 후 잔존활성을 측정한 결과 45°C 이하에서 90% 이상의 잔존활성을 보여 안정한 것으로 나타났다.

정제효소를 Fig. 12와 같이 60°C에서 10분 후에 46%, 60분 후에는 3%의 잔존활성을 나타내었다. 이는 *Asp. tamaritii* α -galactosidase(51)의 경우 45°C에서 10분 후 80%, 50°C에서 10분 후 75%의 잔존활성을 나타내었다, *Asp. oryzae* α -galactosidase(25)의 경우 40~55°C에서 30분 후에도 거의 활성이 감소하지 않았으며, 60°C에서 10분 후 85%의 잔존활성을 나타낸다고 보고한 바 있어 본 시험결과는 이들 결과에 비해 열안정성은 약간 낮았다.

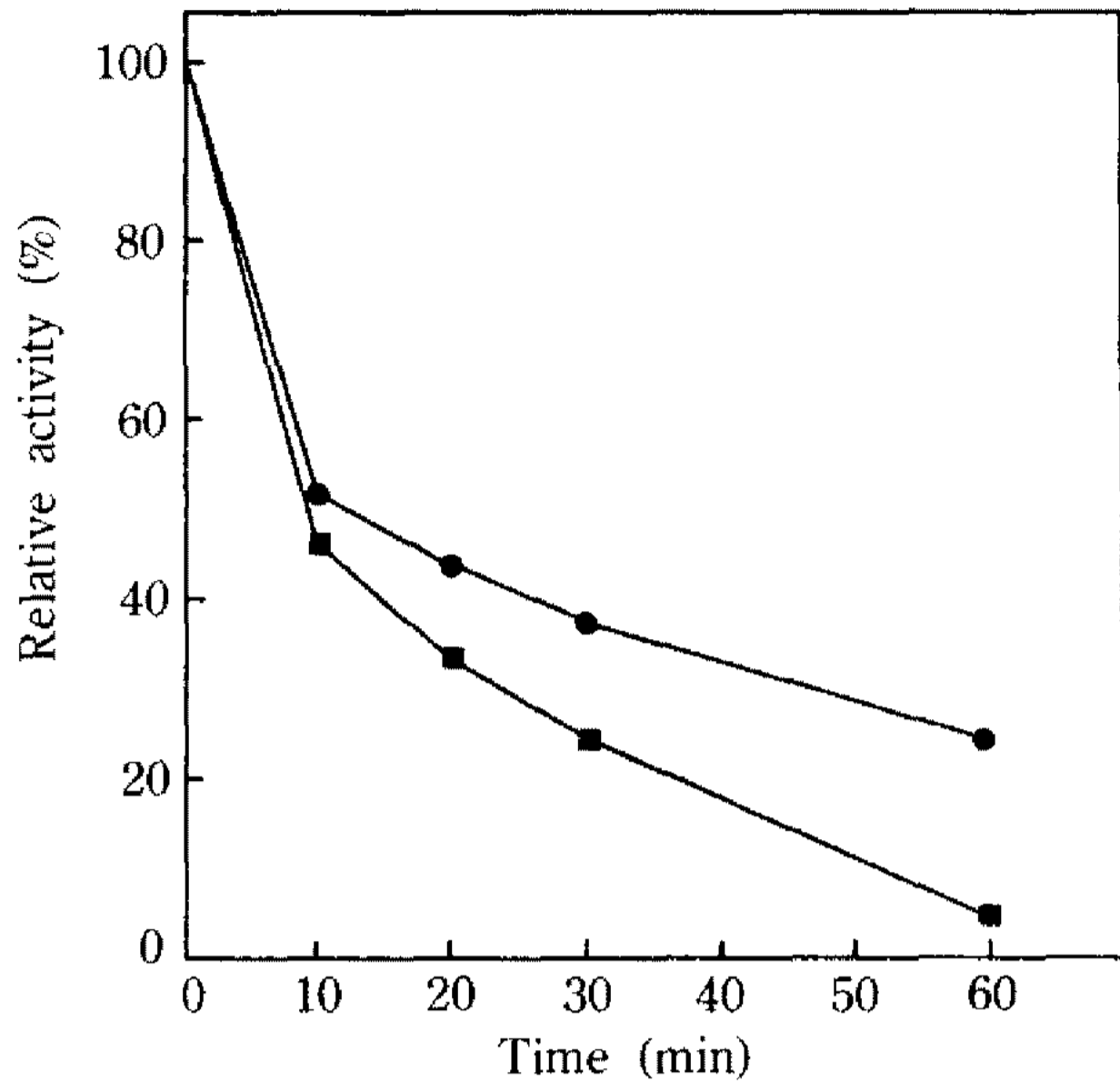


Fig. 12. Thermostability of α -galactosidase of *Aspergillus niger*.

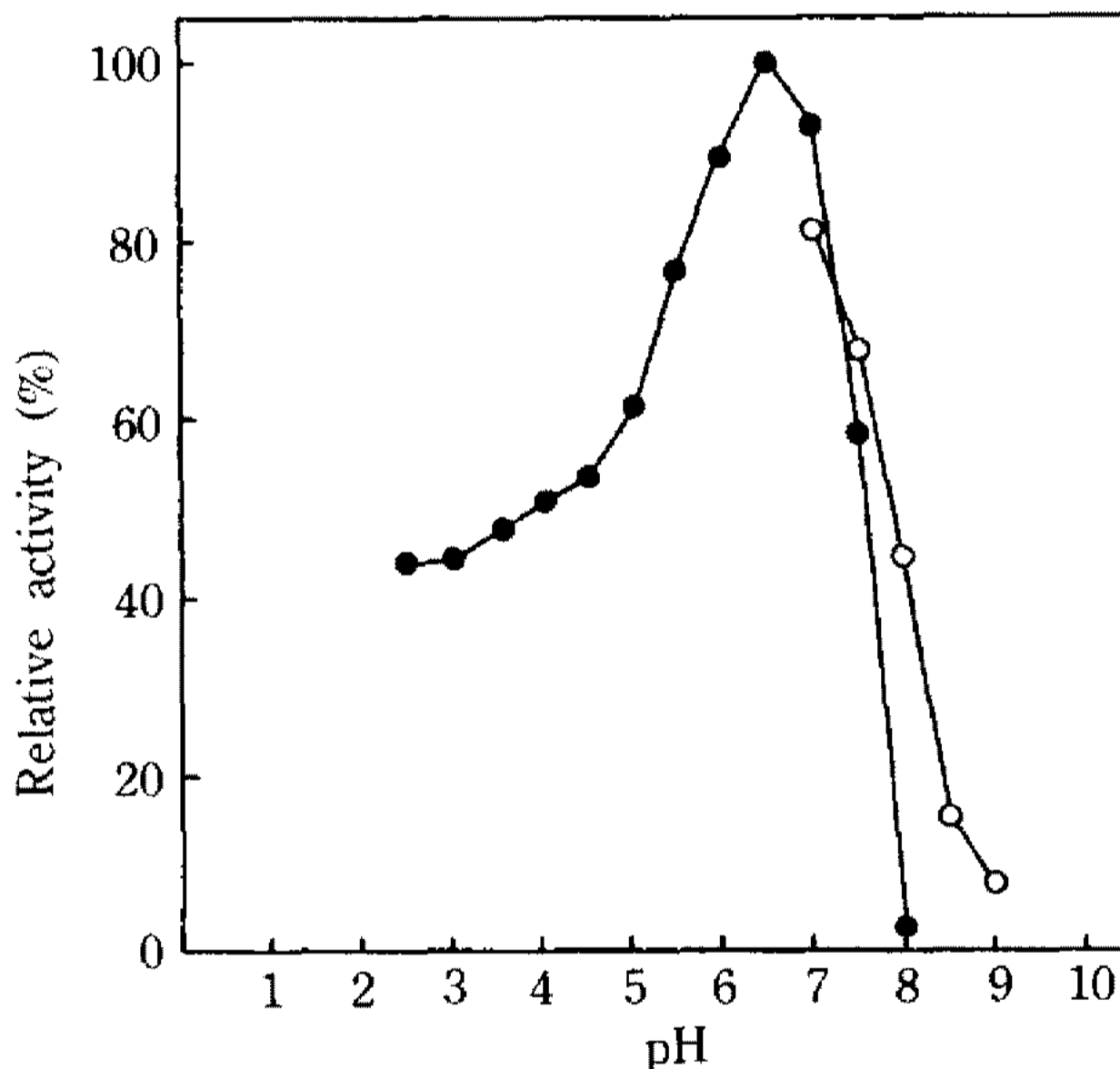


Fig. 13. Effect of pH on α -galactosidase activity of *Aspergillus niger*.

—●—, 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)

최적 작용 pH 및 pH안정성

Fig. 13에서와 같이 정제효소의 최적작용 pH는 6.5이었으며, 본 결과는 *Asp. oryzae*(26)에서는 pH 4.0, *Asp. awamorii*(23)에서는 pH 5.0에 비하여 약간 중성쪽에 기울어져 있었다.

각 pH에서 처리시간에 따른 정제효소의 pH 안정성은 Fig. 14와 같이 pH 5.5에서 10분 후 44%, 60분 후 44%, pH 6.5에서는 10분 후 90%, 60분 후 85%, pH 7.5에서는 10분 후 68%, 60분 후 33%의 잔활

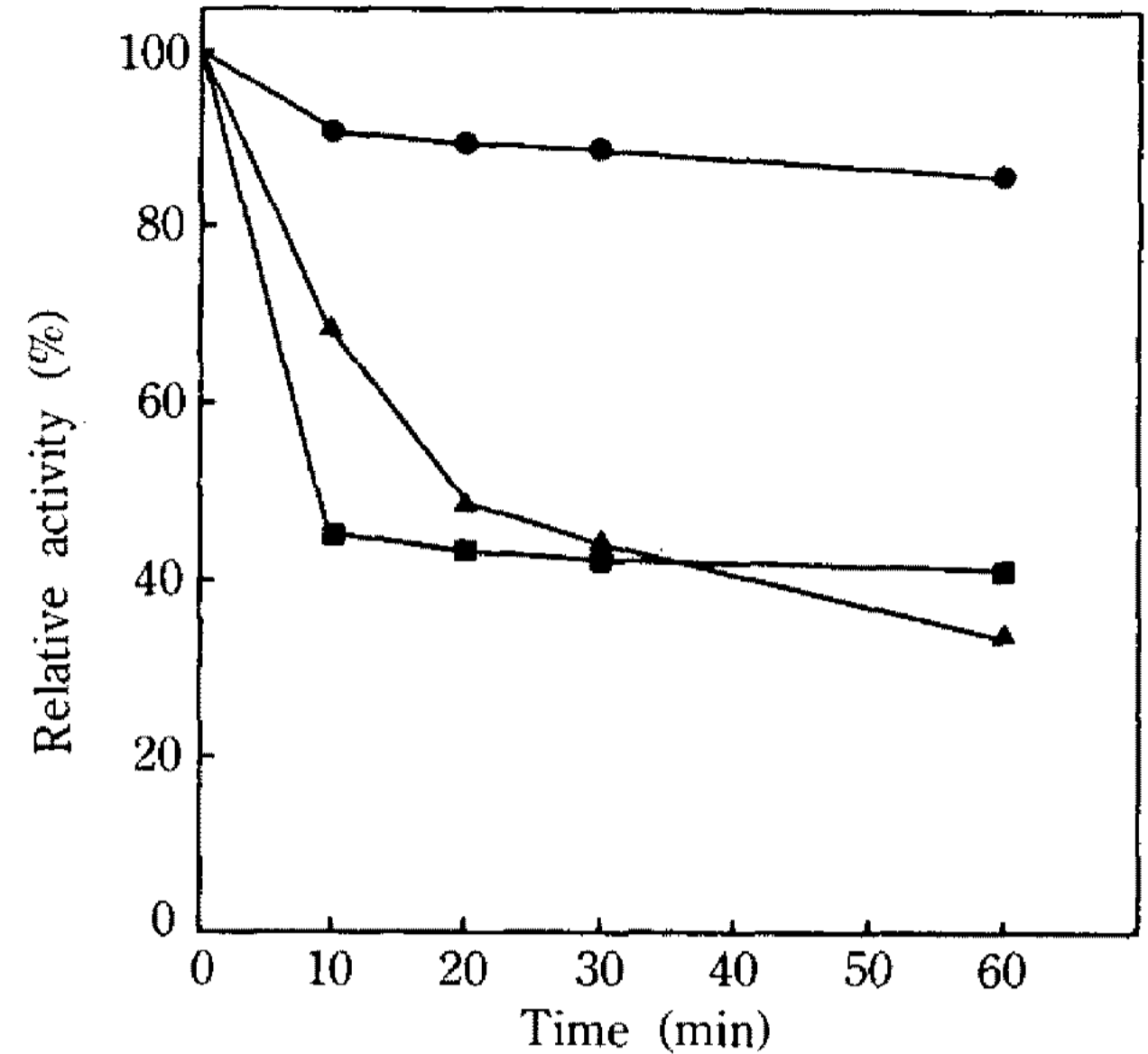


Fig. 14. pH stability of *Aspergillus niger* α -galactosidase. ■, pH 5.5; ●, pH 6.5; ▲, pH 7.5

Table 3. Substrate specificity of *Aspergillus niger* α -galactosidase on oligosaccharides

Substrates (2 mM)	Reducing sugar ($\mu\text{g/ml}$)
Raffinose	27.0
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.

성을 보여 중성에서 안정하였다.

기질특이성

2 mM 농도의 raffinose, stachyose 기질용액에 정제효소를 가하여 40°C에서 10분간 반응시킨 후 생성된 환원당을 정량한 결과는 Table 3과 같이 raffinose를 stachyose에 비하여 쉽게 분해하였다.

금속이온의 영향

정제효소는 Table 4와 같이 Hg^{2+} , Ag^+ 이온에 의해 심한 저해를 나타내었으며, 기타 이온에 의해서는 별다른 영향을 받지 않았다. 한편 본 결과는 *Asp. oryzae*(25), *Asp. saitoi*(50), *Asp. awamorii*(23), *Asp. niger*(18) 등의 α -galactosidase 모두 Hg^{2+} , Ag^+ 에 의해서 심하게 저해된다고 보고한 결과와 일치하였다.

K_m 값 및 V_{max}

Table 4. Effect of metal ions on the activity of α -galactosidase of *Aspergillus niger*

Reagent (10^{-3} M)	Relative activity (%)
Control	100
K ⁺	96
Ag ⁺	6
Mg ²⁺	98
Ca ²⁺	97
Ba ²⁺	98
Hg ²⁺	2
Co ²⁺	104
Fe ²⁺	103
Cu ²⁺	96
Zn ²⁺	99
Pb ²⁺	79
EDTA	101

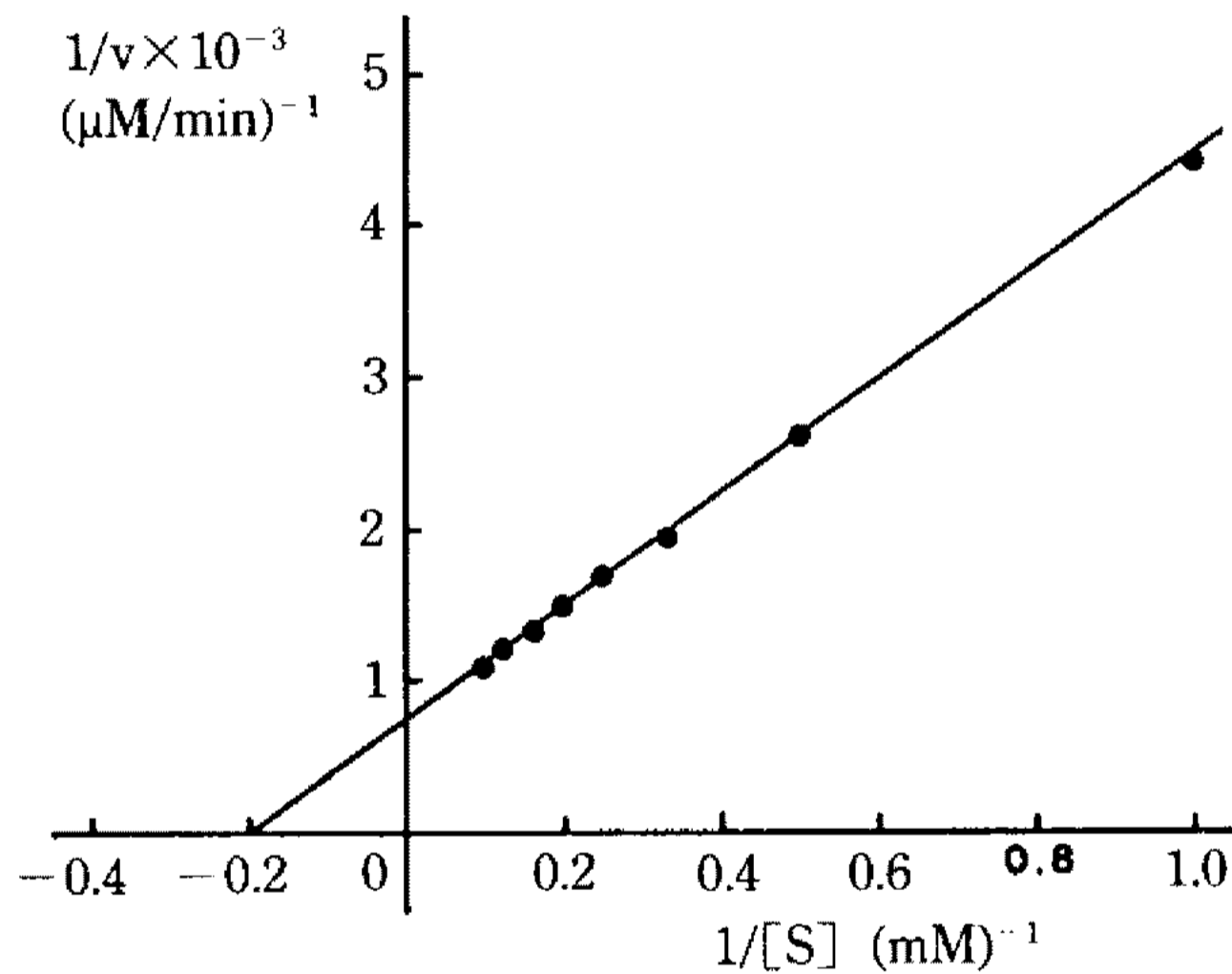


Fig. 15. K_m value of α -galactosidase from *Aspergillus niger* for PNPG determined by Lineweaver-Burk plot.

정제효소의 PNPG에 대한 K_m 값 및 V_{max} 를 측정하여 Fig. 15와 같은 결과를 얻었다. 정제효소의 PNPG에 대한 K_m 값은 5.0 mM, V_{max} 는 $1.33 \times 10^3 \mu\text{M}/\text{min}$ 이었다. 이는 *Aspergillus*속 α -galactosidase의 K_m 값이 PNPG(17, 18, 23, 25)에 대해서 0.35 mM~4.56 mM이었다는 보고와 유사한 결과를 나타내고 있다.

활성화에너지

Fig. 16과 같이 PNPG를 기질로 하여 정제효소의 활성화에너지(E_a)를 측정한 결과, 8.515 Kcal/mole이었다. 이 값은 30~45°C 범위에서 얻은 값으로 35~45°C 사이에서 $Q_{10}=1.38$ 이었다. 이는 *Asp. oryzae*(25)

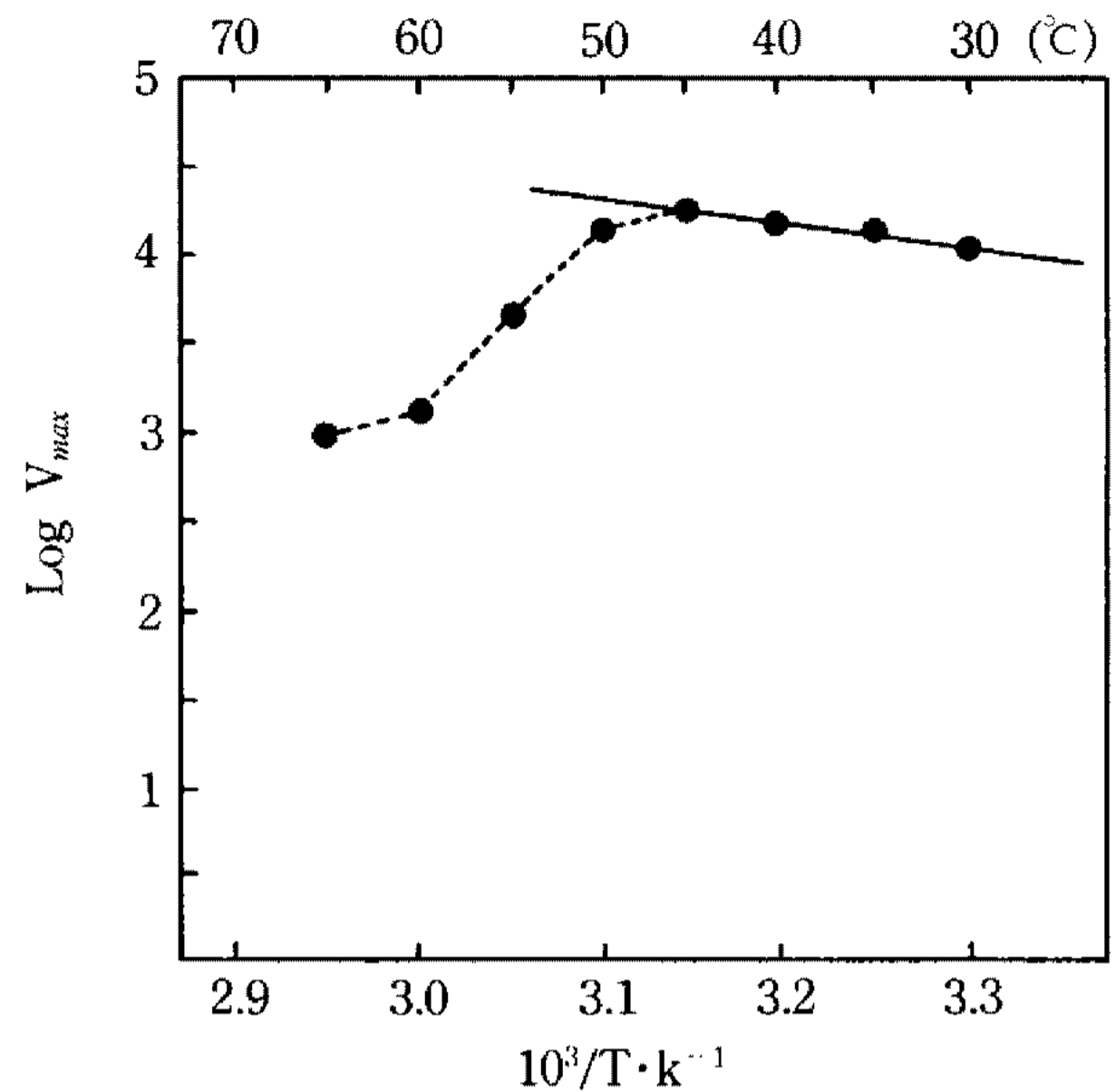


Fig. 16. Effect of temperature on α -galactosidase (Arrhenius plot).



Fig. 17. Thin layer chromatogram of hydrolyzates of oligosaccharides by *Aspergillus niger* α -galactosidase. A. stachyose; B. raffinose; C. melibiose; D. galactose; E. glucose; F. hydrolyzed products of stachyose; G. hydrolyzed products of raffinose; H. hydrolyzed products of melibiose.

116 Kcal/mole, *Asp. niger*(18) 16.4 Kcal/mole보다 낮은 결과를 나타냈다.

분해산물의 확인

Fig. 17과 같이 정제 α -galactosidase를 melibiose, raffinose와 함께 40°C, 24시간 반응시킨 결과 완전분해되어 galactose를 생성하였고, stachyose 반응액에서도 galactose가 검출되었다. 따라서 정제효소는 이들

소당류의 α -1,6-galactoside 결합을 분해하는 전형적인 α -galactosidase로서의 특징을 보임과 동시에 다른 유사 불순 효소는 함유하지 않은 것으로 확인되었다.

요 약

*Aspergillus niger*가 생산하는 α -galactosidase의 효소학적 성질을 조사하기 위하여 시험균주를 밀기울 배양한 후 생성된 α -galactosidase를 염석, 이온교환 크로마토그래피 및 겔 여과 등의 방법으로 정제한 후 정제효소의 효소학적 성질을 검토하였다. *Asp. niger*를 밀기울 배지에서 30°C, 4일 배양했을 때 효소활성이 가장 높았으며 α -galactosidase는 황산암모늄 염석, DEAE-cellulose 및 DEAE-Sephadex A-50 이온교환 크로마토그래피, Sephadex G-150 겔 여과 등에 의하여 23.7배까지 정제되었으며 비활성이 1,229 U/mg·protein, 수율 14%이었고 HPLC와 PAGE에 의해 순도가 확인되었다. 정제효소는 당 단백질로서 등전점은 4.6이었고 분자량이 28,000인 monomer 4개로 구성된 tetramer이었다. 정제효소의 최적작용 pH는 6.5, 최적 작용온도는 40°C이었고 60°C에서 10분 처리시 46%의 잔존활성을 나타내었다. 정제효소는 stachyose보다 raffinose를 쉽게 분해하였고 PNPg에 대한 K_m 값은 5.0 mM, 활성화에너지는 8.515 Cal/mole이었다.

참고문헌

- Omosaiye, O., M. Cheryan and M.E. Matthews: *J. of Food Sci.*, **43**, 354 (1978)
- Mathew, C.D. and K. Balasulbramaniam: *Phytochemistry*, **26**, 1299 (1987)
- Rackis, J.J., D.J. Sessa, F.R. Steggerda, T. Shimizu, J. Anderson and S.L. Pearl: *J. Food Sci.*, **35**, 634 (1970)
- Calloway, D.H., C.A. Hickey and E.L. Murphy: *J. Food Sci.*, **36**, 251 (1971)
- Kim, W.J., C.J.B. Smit and T.O.M. Nakayama: *Lebensm.-Wiss. U. Technol.*, **6**, 201 (1973)
- Puwastien, P. and R.D. King: *Lebensm.-Wiss. u. Technol.*, **17**, 336 (1984)
- Pridham, J.B., M.W. Walter and H.G.J. Worth: *J. of Experimental Botany*, **20**, 317 (1969)
- East, J. W., T.O.M. Nakayama and S.B. Parkman: *Crops Science*, **12**, 7 (1972)
- Shun, K., L.S. Wei, M.P. Steinberg, A.I. Nelson and T. Hymowitz: *J. of Food Sci.*, **41**, 361 (1976)
- Silva, H.C. and G.L. Braga: *J. of Food Sci.*, **47**, 924 (1982)
- Hsu, S.H., H.H. Hadley and T. Hymowitz: *Crops Science*, **13**, 407 (1973)
- Sathe, S.K., S.S. Deshpande, N.R. Reddy, D.E. Goll and D.K. Salunkhe: *J. of Food Sci.*, **48**, 176 (1983)
- Reddy, N.R. and D.K. Salunkhe: *Cereal Chem.*, **57**, 356 (1980)
- Mital, B.K. and K.H. Steinkraus: *J. of Food Sci.*, **40**, 114 (1975)
- 정상수, 이서래: 한국식품과학회지, **18**, 450 (1986)
- 전향숙, 이서래: 한국식품과학회지, **20**, 78 (1988)
- Bahl, O.P. and K.M.L. Agrawal: *The Journal of Biological Chemistry*, **244**, 2970 (1969)
- Lee, Y.C. and V. Wacek: *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **138**, 264 (1970)
- Adya, S. and A.D. Elbein: *J. of Bacteriology*, **129**, 850 (1977)
- Herder, I.F.D., P. Crowley, J.M. van Noort, J.G.M. Hensing, P.H. Pouwelsds and C.A.M.J.J. van Hondel: Fourth International Mycology Congress (1990)
- Smiley, K.L., D.E. Hensley and H.J. Gasdorf: *Applied and Environmental Microbiology*, **31**, 615 (1976)
- Silman, R.W., L.T. Black, J.E. McGhee and E.B. Bagley: *Biotechnology and Bioengineering*, **22**, 533 (1980)
- McGhee, J.E., R. Silman and E.B. Bagley: *J. of the American Oil Chemists' Society*, **33**, 244 (1978)
- Annunziato, M.E., R.R. Mahoney and R.E. Mudgett: *J. of Food Sci.*, **51**, 1370 (1986)
- Annunziato, M.E. and R.R. Mahoney: *J. of Food Biochem.*, **11**, 263 (1987)
- Cruz, R. and Y.K. Park: *J. of Food Sci.*, **47**, 1973 (1982)
- Suzuki, H., Y. Ozawa, H. Oota and H. Yoshida: *Agri. Biol. Chem.*, **33**, 506 (1969)
- Suzuki, H., S.C. Li and Y.T. Li: *J. of Biol. Chem.*, **245**, 781 (1970)
- Thananunkul, D., M. Tanaka, C.O. Chichester and T.C. Lee: *J. of Food Sci.*, **41**, 173 (1976)
- Kobayashi, H. and H. Suzuki: *J. Ferment. Technol.*, **50**, 625 (1972)
- Wong, H.C., C.H. Hu, H.L. Yeh, W.C. Su, H.C. Lu and C.F. Lin: *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**, 1147 (1986)
- Imanaka, T., T. Kaieda, K. Sato and H. Taguchi: *J. of Ferment. Technol.*, **50**, 633 (1972)
- Cavazzoni, V., A. Adami and R. Craveri: *Appl.*

- Microbiol. Biotechnol.*, **26**, 555 (1987)
34. Pederson, D.M. and R.E. Goodman: *Can. J. Microbiol.*, **26**, 978 (1980)
35. Delente, J., J.H. Johnson, M.J. Kuo, R.J. O'Connor and L.E. Weeks: *Biotechnol. and Bioengin.*, **16**, 1227 (1974)
36. Kaji, A. and T. Ichimi: *Appl. Microbiol.*, **18**, 1036 (1969)
37. Mitsutomi, M. and A. Ohtakara: *Biol. Chem.*, **48**, 3153 (1984)
38. Mitsutomi, M., Y. Uchida and A. Ohtakara: *J. Ferment. Technol.*, **63**, 325 (1985)
39. Ohtakara, A., M. Mitsutomi and Y. Uchida: *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 1319 (1984)
40. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.T. Randall: *Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
41. Somogyi, M: *J. Biol. Chem.*, **195**, 19 (1952)
42. Nelson, N: *J. Biol. Chem.*, **153**, 375 (1944)
43. Davis, J: *Annual N.Y. Academy Sci.*, **121**, 404 (1964)
44. Rickwood, D. and B.D. Hames: *Gel electrophoresis of protein*, IRL Press Limited, England (1981)
45. Righetti, P. and J.W. Drydale: *Biophysics Acta.*, **236**, 17 (1971)
46. Zacharius, R.M., T.E. Zell, J.H. Morrison, J.J. Woodlock: *Anal. biochem.*, **30**, 148 (1969)
47. Lineweaver, H. and D. Burk: *J. Amer. Chem. Soc.*, **56**, 658 (1934)
48. 김창환, 하정옥(편저): 생화학계산법, 유한문화사, 326 (1986)
49. Stahl, E. (ed): *Thin layer chromatography*, 2nd ed., Springer International Student Edition, 807 (1969)
50. Sugimoto, H. and J.P. Van Buren: *J. of Food Sci.*, **35**, 655 (1970)
51. Civas, A., R. Eberhard, P.L. Dizet and F. Petek: *Biochem. J.*, **219**, 849 (1984)

(Received September 4, 1991)