

大豆 β -Amylase의 N-말단 아미노산 配列

池義相 · 金觀猷* · 金俊平**

信興專門大學 食品營養科 · 金泉專門大學 食品營養科* · 中央大學校 食品加工學科**

N-Terminal Sequence of Soybean β -Amylase

Eui-Sang Ji · Kwan-Yu Kim* · Jun-Pyung Kim**

Dept. of Food and Nutrition, Shin-Heung Junior College

*Dept. of Food and Nutrition, Kim-Chun Junior College**

*Dept. of Food Science and Technology, Chung-Ang University***

ABSTRACT

The blocked N-terminus and N-terminal sequence of soybean β -amylase were determined by analyzing the acidic peptides derived on peptic digestion of the enzyme.

The acidic peptides were separated from the digest on a Dowex 50 \times 2 column(1 \times 5cm) and purified by reversed phase-high performance liquid chromatography(RP-HPLC).

The major acidic peptide, PEP-1, was a heptapeptide. The N-terminal 7 amino acid sequence of soybean β -amylase was deduced to be acetyl-Ala-Thr-Ser-Asp-Ser-Asn-Met- from the results of sequence analysis of PEP-1 and amino acid analysis of other acidic peptides.

I. 序 論

β -amylase[α -1, 4-glucan maltohydrolase, EC 3.2.1.2]는 starch나 glycogen과 같은 α -1, 4-glucan의 非還元性 末端으로부터 maltose 單位로 α -1,4-glycoside 結合을 順次 切斷하여 最終 生成物로 β -maltose와 β -limit dextrin으로 分解¹⁾하는 Exo型 酵素^{2,3)}로, 1924年 Kuhn⁴⁾에 의하여 처음으로 β -amylase라 命名되었다.

高等植物에만 存在하는 것⁵⁻⁸⁾으로 알려져 온 β -amylase는 最近 微生物에도 存在하는 것^{9,10)}으로 밝혀졌고, maltose 製造를 비롯한 食品工業은 물론 醱酵工業, 醫藥品工業 등에 이르기까지 産業적으로 그 利用도가 높다고 할 수 있다.

고구마 β -amylase¹¹⁻¹³⁾가 유일하게 分子量 50,000 dalton 程度의 同一 subunit 4個로 形成된

tetrameric enzyme인데 반하여 大豆^{5,14)}를 비롯한 밀¹⁵⁾, 보리¹⁶⁾, 쌀¹⁷⁾, 수수⁶⁾, 무우⁷⁾ 등의 高等植物에서 精製된 β -amylase는 分子量 50,000 ~ 60,000 dalton 程度의 monomeric enzyme으로 報告되었다.

β -amylase의 N-末端 아미노산에 대한 研究는 Gertler 等⁵⁾이 大豆 酵素로부터 Glu라고 報告하였고, Uehara 等¹⁸⁾은 고구마 酵素로부터 Ala라고 報告한 바 있다.

本 研究에서는 大豆 β -amylase의 N-末端 아미노산 分析을 위해 Sanger의 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene(FDNB)法¹⁹⁾, Fraenkel-Conrat 等に 의한 phenylisothiocyanate(PTC)法²⁰⁾, Gray의 方法²¹⁾을 변형한 Hartley 等の 1-dimethylaminonaphthalene-5-sulfonylchloride(DNS)法²²⁾을 行한 結果 어떤 아미노산도 檢出되지 않았다. 결국 大豆 β -amylase의 N-末端은 block되

이 있다고 판단하였고, N-末端부터의 酸性 peptide 調製를 시도하여 結果를 얻었다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 材 料

本 實驗에 使用된 大豆 β -amylase는 1988年 3月 日本 大阪, 不二製油(株)로부터 供給받은 soybean whey를 미리 報告²³⁾한 바와 같이 精製하여 使用하였다.

特殊試藥으로는 pepsin(Sigma Chemical Co., U.S.A.), Dowex 50×2(特級, Dow Chemical Co., Michigan, U.S.A.)를 使用하였고 아미노산 분석은 Hitachi 835 amino acid analyzer (Japan), RP-HPLC는 Shimadzu LC-4A (Japan)를 使用하였다.

2. 方 法

酸性 peptide의 調製를 위해, 17.6mg의 大豆 β -amylase를 0.01N-HCl 0.4ml중에서 0.1mg의 pepsin으로 12時間(37°C) 消化했다. 酵素消化 後 消化物을 凍結乾燥한 뒤, 1ml의 蒸溜水에 녹인 다음, 蒸溜水로 平衡化시킨 Dowex 50×2 column(1×5cm)에 걸었다. 15ml의 蒸溜水로 溶出한 液은 모아서 다시 凍結乾燥하였고, 凍結乾燥物은 1ml의 0.1% trifluoroacetic acid(TFA)에 녹인 다음, reversed phase-high performance liquid chromatography(RP-HPLC, Model; Shimadzu LC-4A) column으로 精製²⁴⁾한 後 amino acid analyzer(Hitachi 835)로 分析하였다.

III. 結果 및 考察

大豆 β -amylase의 酵素消化物로부터 Dowex 50×2 column에 걸어 얻은 酸性 peptide를 다시 Cosmosil ODS column에 걸어 精製한 peptide는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 4個의 peak(PEP-1,

2,3,4)로 分離되었으며, 얻어진 peak PEP-1에서 PEP-4까지의 아미노산 造成을 보면 Table 1과 같다.

가장 큰 peak인 PEP-1은 Asx(1.9), Thr(1.0), Ser(1.8), Ala(1.1), Met(1.0)의 아미노산 造成을 보였고, 그 yield는 50%를 나타냈으며, PEP-2와 PEP-4는 PEP-1과 거의 類似한 아미노산 造成의 N-末端 peptide로, Fig. 2에서 보는 바와 같이 PEP-2는 大豆 β -amylase의 N-末端 으로부터 8번째 amino acid인 leucine 殘基까지, PEP-4는 9번째의 leucine 殘基까지 各各 同定이 可能하였으나, PEP-3은 낮은 yield 때문에 아미노산 組成으로부터 N-末端 peptide로 認定하기 어려웠다. 한편, Gertler 等⁵⁾은 soybean β -amylase의 N-terminal amino acid가 glutamic acid라고 報告하였으나, PEP-1의 分析 結果로 大豆 β -amylase의 N-末端 아미노산은 block된 acetyl alanine으로 밝혀졌으며, PEP-1의 大豆 β -amylase 7개 N-末端 아미노산 배열 순서는 acetyl-Ala₁-Thr₂-Ser₃-Asp₄-Ser₅-Asn₆-Met₇-로 나타났다.

Table 1. Amino acid compositions of the acidic peptides derived on the peptic digestion of soybean β -amylase. The calculated compositions are based on the underlined amino acids taken as 1.0 and the nearest integers are given in parenthesis.

Amino acid	PEP-1	PEP-2	PEP-3	PEP-4
Asx	1.9 (2)	2.1 (2)	2.0 (2)	2.0 (2)
Thr	<u>1.0 (1)</u>	<u>1.0 (1)</u>	<u>1.0 (1)</u>	<u>1.0 (1)</u>
Ser	1.8 (2)	1.9 (2)	2.7 (3)	1.9 (2)
Glx	—	—	2.0 (2)	—
Pro	—	—	2.2 (2)	—
Gly	—	—	1.8 (2)	—
Ala	1.1 (1)	0.6 (1)	0.7 (1)	0.8 (1)
Met	1.0 (1)	1.0 (1)	0.9 (1)	0.9 (1)
Leu	—	0.6 (1)	1.3 (1)	1.5 (2)
Tyr	—	—	0.5 (1)	—
Total residues	7	8	16	9
Yield (%)	50.0	5.5	3.0	5.5

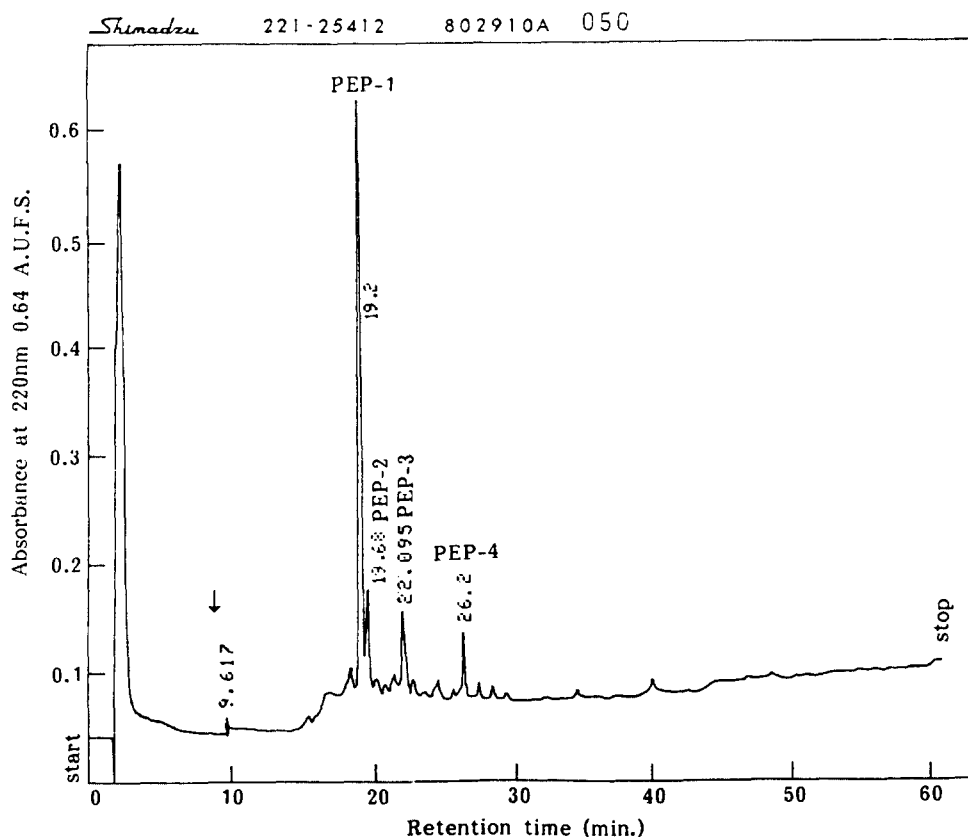


Fig. 1. Separation of acidic peptides derived on peptic digestion of soybean β -amylase by RP-HPLC.

Column: Cosmosil ODS 300 Å 5 μ m (4.6 \times 150mm)

Solvent: Linear gradient of CH₃CN 0-60% in 0.1% TFA (1%/min.)

Detection A₂₂₀: 0.64 A.U.F.S.

Sample: Acidic peptides derived from 1.2mg β -amylase

Flow rate: 1ml/min.

Temperature: Room temperature

The vertical arrow represents the start of an increasing gradient of acetonitrile concentration.

또한 最近 Toda¹⁾에 의하여 밝혀진 고구마 β -amylase N-terminal 附近的 아미노산 配列과 大豆 β -amylase N-terminal 아미노산의 배열을 比較하여 보면 Fig. 3에서 보는 바와 같이 Ala₁과 Met₇만이 같았으나, 고구마 β -amylase의 N-terminal amino acid인 alanine은 大豆 β -amylase의 경우와는 달리 acetyl化 되어 있지 않은 것으로 報告되었다. 그것으로 미루어 大豆 β -amylase는 分子量 56,000dalton의 single

polypeptide^{5,14)}인데 반하여 고구마 β -amylase는 分子量 50,000dalton 程度의 同一 subunit 4個로 이루어진 tetramer^{11~13)}임을 알 수 있었다.

IV. 要 約

大豆 β -amylase의 N-末端 아미노산을 알아내기 위하여 實驗한 結果 block되어 있음을 알았고, 따라서 酵素를 pepsin으로 消化하여 N-末端

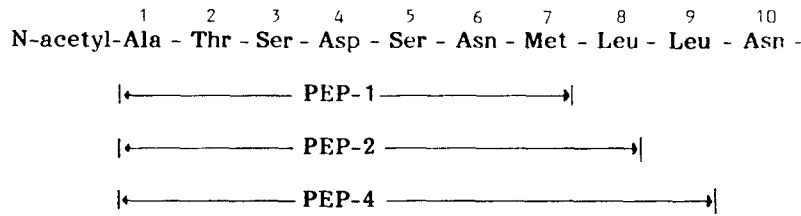
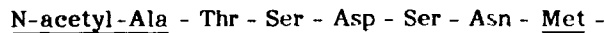


Fig. 2. Amino acid sequences of N-terminal peptides of soybean β -amylase.

Soybean β -amylase (PEP-1) ;



Sweet potato β -amylase ;

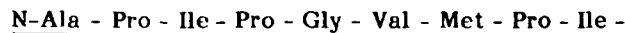


Fig. 3. Comparison of N-terminal peptides of soybean β -amylase and sweet potato β -amylase.

부터의 酸性 peptide를 調製하고 分析을 행하였다.

酸性 peptide는 Dowex 50×2 column(1×5cm)에 걸쳐 消化物로부터 分離하였고, RP-HPLC에 의하여 精製하였다. 精製한 peptide로부터 4개의 peak를 얻었고, 그 중 가장 큰 peak인 PEP-1을 아미노산 分析에 의하여 7개의 아미노산으로 이루어져 있음이 나타났고, PEP-1과 다른 酸性 peptide로부터 大豆 β -amylase의 N-末端 아미노산 配列을 acetyl-Ala-Thr-Ser-Asp-Ser-Asn-Met- 으로 되어 있음을 알았다.

V. 參考文獻

- Toda, H. : *Denpun Kagaku*, 36, 87-101(1989)
- Shukla, J.P. : *J. Indian chem. Soc.*, 21, 223 (1944)
- Marshall, J.J. and Whelan, W.J. : *Anal. Biochem.*, 52, 642-646(1973)
- Kuhn, R. : *Ber.*, 57B, 1965(1924)
- Gertler, A. and Birk, Y. : *Biochem. J.*, 95, 621-627(1965)
- Botes, D.P., Joubert, F.J. and Novellie, L. : *J. Sci. Food Agric.*, 18, 415-419(1967)
- Morita, Y. and Wadano, A. : *Bull. Res. Inst. Food Sci. Kyoto Univ.*, 37, 19-27(1974)
- Aibara, S. and Morita, Y. : *Tampakushitsu Kakusan Koso*, 4, 434-437(1976)
- Fogarty, W.M. and Griffin, P.J. : *J. Applied Chem. Biotech.*, 25, 229-238(1975)
- Takasaki, Y. : *Agric. Biol. Chem.*, 40, 1515-1522(1976)
- Balls, A.K., Thompson, R.R. and Walden, M.K. : *J. Biol. Chem.*, 163, 571-572(1946)
- Englard, S. and Singer, T.P. : *J. Biol. Chem.*, 187, 213-219(1950)
- Thoma, J.A., Spradlin, J. and Dygert, D. : *The Enzymes* 3rd ed. (Boyer, P.D. ed.) Vol. 5, Academic Press, New York, 115-189(1972)

14. Morita, Y., Yagi, F., Aibara, S. and Yamashita, H. : *J. Biochem.*, **79**, 591-603 (1976).
15. Tkaehuk, T. and Tipples, K.H. : *Cereal Chem.*, **43**, 62-79(1966)
16. Shinke, R. and Mugibayashi, N. : *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 1381-1390(1971)
17. Matsui, H., Chiba, S. and Shimomura, T. : *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 841-847(1977)
18. Uehara, K., Mizoguchi, T. and Mannen, S. : *J. Biochem.*, **68**, 359-367(1970)
19. Sanger, F. : *Biochem. J.*, **39**, 507-515 (1945)
20. Fraenkel-Conrat, H., Harris, J.I. and Levy, A.L. : *Methods of Biochemical Analysis*, (Glick, D., ed.) Vol. II, Interscience Publishers, Inc., New York, 359-425 (1955)
21. Gray, W.R. : *Methods in Enzymology*, (Hirs, C.H.W. and Timasheff, S.N., eds.) Vol. 25, Academic Press, New York, 121-128(1972)
22. Hartley, B.S. and Massey, V. : *Biochim. Biophys. Acta.*, **21**, 58-70(1956)
23. Ji, E.S. : *Korean J. Food & Nutrition*, **3**, 149-159(1990)
24. Tsunasawa, S. and Narita, K. : *J. Biochem.*, **92**, 607-613(1982)

(1991년 9월 9일 수리)