한국생물공학회지 제9권 제1호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 9. No. 1. 55-62(1994)

Aspergillus niger Glucose oxidase의 새로운 정제 방법 및 특성

한 상 배 · *김 광 진 · *임 한 진 · **김 태 년 · ***최 동 성
국립보건원
*생산기술연구원
**전주우석대학교 의상학과
***전주우석대학교 생물공학과

Novel Purification and Characterization of Glucose oxidase from *Aspergillus niger*

Sang-Bae Han, *Kwang-Jin Kim, *Han-Jin Lim,
**Tae-Nyeon Kim and ***Dong-Seong Choi

National Institute of Health, Seoul 122-020, Korea
*Korea Academy of Industrial Technology, Seoul 135-080, Korea
**Department of Clothing and Textiles, Chonju Woosuk University, Chonju 565-800, Korea
***Department of Biotechnology, Chonju Woosuk University, Chonju 565-800, Korea

ABSTRACT

Glucose oxidase(EC 1.1.3.4) was purified to electrophoretic homogeneity from *Aspergillus niger* by a combination of ammonium sulfate fractionation, ion exchange chromatography, and ultrafiltration. Two active fractions, A and B, of glucose oxidase were obtained from the hydrophobic chromatography on phenyl sepharose CL-4B. The enzyme A and B were glycoproteins with the same denatured molecular weight of 78,000 and had specific activities of 2,191 and 1,273 units/mg protein, respectively. But the two enzymes showed differences in native molecular weight which was measured by HPLC gel filteration, maximum absorbtion wavelength, and isoelectric point. The enzyme A oxidized β-D-glucose only and was resistant to sodium dodecyl sulfate. Activity optimum was found at 30℃ and pH 3.5. Also the enzyme A was inhibited greatly by Hg^{2+}(10mM). The results of chemical modification experiments suggested that cysteine and cystine residues might be involved in the active site of the enzyme A.

서 론

Glucose oxidase(GOD)(β-D-glucose: oxygen 1-oxidoreductase, EC 1.1.3.4.)는 산소 존재하에 β-D-glucose를 glucono-δ-lactone으로 산화하고, 과산화수소를 생성하는 반응을 촉매하는 2량체의 효소이다: β-D-glucose+O_2 ⟶ glucono-δ-lactone+H_2O_2. *Aspergillus niger* 추출물 중에 GOD 활성이 들어있음이 Muller(1)에 의해 처음으로 보고된 이후, Pazur와 Kleppe(2), Swoboda와 Massey(3) 등에 의해 효소가 분리 정제되어졌고, 그의 native 형은 2분자의 FAD cofactor를 함유하는 분자량

150.000(2)인 당단백질(4)임이 밝혀졌다.

효소의 작용기구 및 생화학적 기초연구는 *Asp. niger* 효소에 대해서 주로 이루어졌으나, *Pencillium notatum*(5), *Pen. amagasakiense*(6), *Pen. verruculosum*(7), *Phanerochate chrysosporium*(8), *Talaromyces flavus*(9) 등의 효소에 대해서도 이루어져 있다. GOD가 D-mannose, D-galactose, N-acetyl glucosamine 등의 당을 약 16% 함유하고 있는 당단백질로 보고된(4) 이후 수식된 당과 효소의 촉매기능의 연관성에 대하여 많은 연구가 진행되었는데 Nakamura 등(10)과 Kalisz 등(11)은 당 수식은 낮은 온도에서 단백질이 분해되는 것을 막아 안정성을 증가시키나 촉매기능과 면역반응, 효소단백의 conformation의 유지에는 직접 관여하지 않는다고 하였다. 한편 GOD의 각 subunit에는 2분자의 인산이 1분자의 FAD cofactor와 pyrophosphate linkage로 결합되어 있고, FAD는 인산과 subunit중의 2개의 아미노산 잔기와의 비공유결합에 의해 GOD와 연결되어 있다(12, 13). 이 phosphate bridge는 disulfide 결합처럼 효소의 2차구조의 변화에 중요한 역할을 한다고도 하나(12), 노화 또는 분해 효소에만 존재하여 native GOD의 구성 성분이 아니라고도 한다(13).

GOD는 β-D-glucose만을 특이적으로 산화시킬 수가 있으므로 biological material에 들어 있는 glucose의 검출에 유효하여 glucose정량용 biosensor의 제조(14)에 이용되고 있으며, GOD를 특별한 전극의 표면에 고정하여 glucose 양을 측정할 수 있는 전기화학적 방법은 혈액과 같은 혼탁한 시료로부터 glucose를 선택적으로 정량할 수 있다는 이점이 있기 때문에 크게 각광을 받고 있다. 식품에 있어서 산소 제거제, glucose 제거제, 갈색화 반응의 억제제로 이용되기도 하며, 특히 식품 저장시 과산화수소의 발생원으로서 이용되기도 한다(15).

본 연구는 glucose biosensor 제조에 사용하고자 *Asp. niger* 균체로부터 순도 높은 GOD를 얻을 수 있는 새로운 정제 방법을 확립하여 대량 생산을 위한 기초 자료를 얻는데 목적이 있으며, 한편 정제된 효소의 특성을 조사하고 이미 보고된 GOD의 특성과 비교하여 그의 촉매 기구를 이해하기 위한 기초 자료를 얻고자 수행하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

효소 정제에 사용한 *Aspergillus niger* JM 82의 균체는 미화화학(경기도 이천군 부발면)에서 배양한 것을 분양받아 사용하였으며, 모든 시약은 특급을 사용하였다.

효소의 정제

균체의 파쇄에는 The Bead beater™이 사용되었으며, 균체 200g, 0.5mm zirconium bead 50g을 냉각한 10mM 인산 완충액(pH 6.8)에 혼합한 다음, 1분씩 7회 milling한 후 그의 파쇄액을 회수하고 원심분리하여 상등액을 조효소액으로 하였다. 이 조효소액에 황산암모늄을 가하여 60~90%의 농도에서 분별 침전되는 침전물을 원심분리하여 회수하고, 이것을 10mM 인산 완충액에 용해한 다음 동일 완충액에 대해 48시간 동안 투석시켰다.

10mM 인산 완충액으로 미리 평형화시킨 DEAE-cellulose 칼럼(2.6×25cm)에 상기 효소액을 주입하고, 동일 완충액으로 칼럼을 세정한 다음 10mM 인산 완충액과 1M NaCl을 함유한 동일 완충액을 직선 농도 구배가 되도록 0.8ml/min의 유속으로 용출시켰다. 효소 활성이 있는 분획을 모아 Amicon concentrator에서 한외 여과(MW cut-off 30,000)를 하면서 완충액의 교환 및 농축을 행하였다.

한외 여과로 얻어진 농축액을 1M 황산암모늄-10mM 인산 완충액으로 미리 평형화시킨 phenyl sepharose CL-4B 칼럼(1.8×14cm)에 주입하고, 상기 완충액으로 세정한 다음, 1M~0M 황산암모늄의 직선 농도 구배가 되도록 0.8ml/min의 유속으로 용출시켰다. 효소 활성이 있는 분획을 모아 한외 여과를 하고, 동결 건조하여 정제 효소로 하였다.

효소 활성의 측정

GOD 활성은 Sigma사의 assay manual에 준하여 측정하였다. 즉, 50mM sodium acetate 완충액(pH 5.1)에 녹인 0.21mM *o*-dianisidine 2.4ml, 10% β-D-glucose 0.5ml, peroxidase solution(60 purpurogallin units/ml) 0.1ml를 혼합하여 35℃에서 평형화시킨 후 500nm에서 흡광도를 측정하고, 여기에 효소액 0.1ml를 가하여 즉시 혼합한 다음 500nm에서 1분 동안의 흡광도의 변화를 측정하였다. 1unit는 35℃ pH 5.1의 조건 하에서 1분 동안 1μmol의 glucose를 산화시키는 효소의 양으로 정하

였으며, 그의 계산식은 다음과 같다.

$$\text{효소 활성도}\left(\frac{\mu\text{mole units}}{1\text{ml의 효소액}}\right) = \frac{\triangle A_{500nm/min} \times 3.1}{7.5 \times \text{반응 혼합액 중의 효소액의 양(ml)}}$$

여기에서 3.1은 혼합 반응물의 부피이고, 7.5는 mM 흡광계수(extinction coefficient)이다. 비활성도(specific activity)는 단백질 1mg당의 효소활성(unit)으로 표시하였다.

등전점의 조사

효소액을 1% glycine에서 투석시킨 후, Ampholyte(pH 3.0~10.0)를 이용하여 600V, 5W에서 14시간 동안 preperative isoelectric focusing하고, fraction grid로 0.5cm 간격으로 겔을 절단 분리하였다. 이 겔의 각 분획을 1ml의 증류수에서 2시간 침출시킨 다음 그 상등액의 pH를 측정하고 효소의 활성을 측정하였다.

효소의 화학적 수식

Arginine 잔기는 phenyl glyoxal(16), cysteine 잔기는 5,5′-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)(17), histidine 잔기는 diethyl pyrocarbonate, iodoacetic acid(18), lysine 잔기는 ethylacetimidate(19), cystine 잔기는 dithiothreitol(20)로 각각 처리하여 효소의 화학적 수식을 행하였으며, 반응시간에 따른 효소 활성의 변화를 측정하였다.

분석 방법

전기영동은 Laemmli의 방법(21)으로 행하였고, 겔 염색은 Fairbank 등의 방법(22)에 준하였으며, 당단백 확인을 위한 겔 염색은 periodic acid-schiff (PAS) 염색법(23)에 의하였다. 단백질은 bovine serum albumin을 표준 단백질로 하여 Bio-Rad protein assay kit(24)로 정량하였고, 탄수화물은 maltose를 표준 탄수화물로 하여 phenol-sulfric acid법(25)으로 정량하였다.

HPLC 겔여과에 의한 분자량 측정은 Bio-sil SEC-250칼럼(ϕ300×7.5mm), 10mM 인산 완충액(pH 7.0), 유속 0.5ml/min의 조건에서 행하였다. 표준 단백질로는 γ-globulin(158,000), thyroglobulin (67,000), ovalbumin(44,000), myoglobulin(17,000), Vitamin B_{12}(1,350)이 사용되었다.

결과 및 고찰

Glucose oxidase의 정제

Asp. niger 균체를 파쇄하여 얻은 조효소액을 황산암모늄 분별 침전, DEAE-cellulose 칼럼 크로마토그래피, phenyl sepharose CL-4B 칼럼 크로마토그래피(Fig.1)를 행하여 효소를 정제하였으며, 정제 과정과 효소의 역가와의 관계를 Table 1에 제시하였다. 조효소액 중의 효소의 비활성도는 1,575units/mg 단백질이었고, 황산암모늄 분별 침전에 의해 비활성도가 2,071units/mg 단백질로 1.31배가 증가되었으며, DEAE-cellulose 칼럼 크로마토그래피에 의해서는 비활성도가 2,190units/mg 단백질로 1.39배 증가하였다. Phenyl sepharose CL-4B 칼럼 크로마토그래피에서는 효소의 활성이 A획분(A)과 B획분(B)에 나타났으며, 모두가 효소의 고유한 색인 노란색을 띠었고, SDS-PAGE 분석에 의해 단일 단백질띠로 이동하여 순수하게 정제되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 2A). A와 B의 비활성도는 각각 2,191 units, 1,273units/mg 단백질이었다. Phenyl sepharose CL-4B 칼럼 크로마토그래피에 의한 최종 정제는 본 실험에서 처음 시도된 방법으로 본 정제 과정을 통해 활성이 낮은 새로운 GOD(B)의 분

Table 1. Summary of purification of glucose oxidase form *Aspergillus niger*.

Step	Total volume (ml)	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg protein)	Purication (fold)	Yield (%)
Crude extract	540	63,000	40.0	1,575	1.00	100.0
Ammonium sulfate fractionation	25	62,153	30.1	2,071	1.31	98.7
DEAE cellulose chromatography	19	48,195	22.0	2,190	1.39	76.5
Phenyl sepharose CL-4B chromatography						
A fraction	28	36,815	16.8	2,191	1.39[a]	58.4[a]
B fraction	10.5	4,709	3.7	1,273	0.81[a]	7.5[a]

[a]: On the basis of crude extract

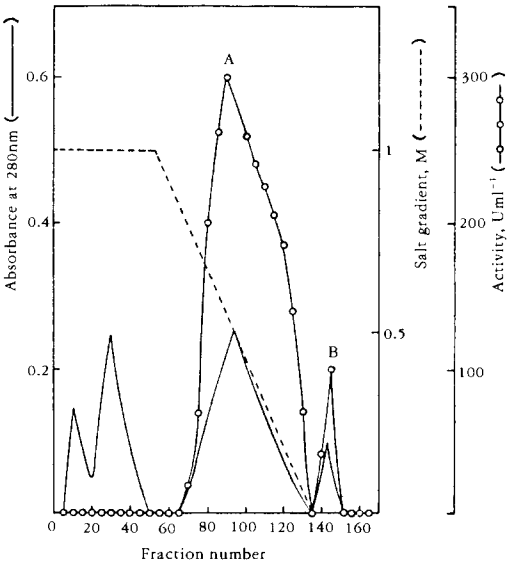

Fig 1. Elution profile of purified glucose oxidase from *Aspergillus niger* on phenyl sepharose CL-4B. Salt gradient, 1.0−0M$(NH_4)_2SO_4$.

리 제리 제거가 가능하게 되었다. 한편 Hwang과 Kim(7)은 *Pen. verruculosum*의 GOD를 그의 액침 배양액으로부터 황산암모늄 분별침전, DEAE-sephacel 칼럼 크로마토그래피 2회, 한외 여과, hydroxy-apatite 칼럼 크로마토그래피를 행하여 순수 정제하였는데, 본 실험의 정제방법으로 칼럼 크로마토그래피를 1회 생략할 수가 있었다.

분자량과 당 함량

SDS-PAGE와 HPLC 겔 여과에 의해 A의 분자량은 각각 78,000과 158,000으로 추정되었으며, 정제된 GOD(A)가 dimer로 존재하고 있음이 시사되었다. *Asp. niger*의 GOD는 분자량이 150,000이고 dimer로 존재한다는 Pazur와 Kleppe(2)의 보고와 GOD의 분자량이 변성 조건과 비변성 조건의 PAGE에서 각각 80,000과 157,000이라는 Kalisz 등(11)의 보고와 비슷한 결과가 얻어졌다. Ye와 Combes(26)는 GOD가 mono-, di-, tri-, tetramer로 존재하고, 그 중 di-, trimer에만 효소 활성이 있다고 보고한 바 있다. B의 분자량은 SDS-PAGE와 HPLC 겔 여과에 의해 각각 78,000과 112,000으로 추정되었다. 한편 A,B 모두 SDS-PAGE상에서 단백질 띠가 넓게 퍼진 양상을 보여, PAS염색으로 정

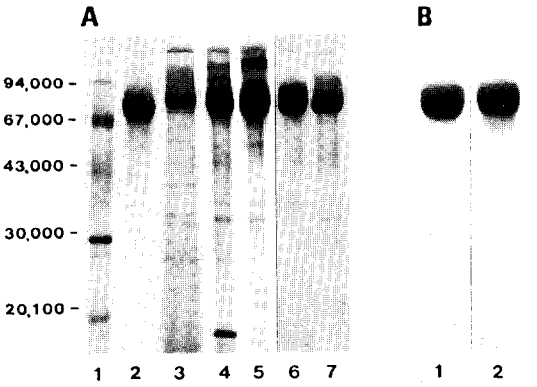

Fig 2. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of glucose oxidase from *Aspergillus niger*.
A. Purity check of *Aspergillus niger* glucose oxidase at each purification step. Five μg of each of purified enzymes were dissolved in sample buffer, 10mM sodium phosphate buffer(pH 7.1), 3% mercaptoethanol, 0.005 % bromophenol blue and 20% glycerol at 100℃ for 5min, then applied on 12.5% SDS-polyacrylamide gel. Finally the gel was stained with coomassie brilliant blue. Lane 1, molecular weight standard proteins; lane 2, purified glucose oxidase from Sigma company; lane 3, crude extract after treatment of cell rupture; lane 4, ammonium sulfate precipitates; lane 5, DEAE-cellulose chromatography; lane 5, enzyme A of phenyl sepharose CL-4B chromatography; lane 7, enzyme B of phenyl sepharose CL-4B.
B. Confirmation of glycoprotein of *Aspergillus niger* glucose oxidase on SDS-polyacrylamide gel. Gel was stained by PAS staining. Lane 1, enzyme A; lane 2, enzyme B.

제 효소가 당단백임을 확인하였고(Fig. 2B), 당 함량을 정량한 결과 1mg당 0.15mg(A), 0.14mg(B)의 당을 각각 함유하였다. Swoboda와 Massey(3)는 *Asp. niger*의 GOD는 단백질 중량의 16.5%(±0.8%)당을 함유한다고 보고한 바 있으며, Nakamura 등(10)은 GOD의 당 함량은 12%이고, D-mannose, D-galactose, N-acetyl glucosamine 등

의 당으로 구성되어 있는데, 그 주성분은 D-mannose라고 보고하였다. 이와 같이 당의 함유량에는 약간씩의 차이를 보이기는 하지만 GOD가 당단백이라는 데는 일치된 견해를 보이고 있다. 그러나 Kelley와 Reddy(8)가 *Phanerochate chrysoporium*으로부터 정제한 GOD는 당을 함유하지 않아, 모든 GOD가 당단백이라고 단정하기는 어렵다.

Visible scanning에 의한 구조적 특성

A와 B효소의 구조적 차이를 알아보기 위하여 340~600nm 파장에서 스캐닝을 행하였다. A효소는 파장 450nm에서 흡수 peak가 가장 높이 나타났으며, 이때 흡광계수(ε)는 3,680$M^{-1}cm^{-1}$이었고, 380nm에서 두번째 높은 흡수 peak(ε= 2982$M^{-1}cm^{-1}$)를 보였다(Fig. 3). 이러한 두 개의 peak는 환원형 FAD를 함유하는 GOD의 전형적인 흡수 peak인 375nm와 450nm(27)에 거의 일치하였다. 한편 B 효소는 그의 흡수 파장에 약간 차이가 있었다. 즉, 380nm에서 최대 흡수 peak(2,982$M^{-1}cm^{-1}$)를 480nm에서 두번째 높은 흡수 peak(2,100$M^{-1}cm^{-1}$)를 보였는데, 이러한 결과는 두 효소 분자의 구조적 특성이 다르다는 것을 시사하고 있다.

등전점 조사

Isoelectric focusing으로 조사한 정제 GOD A, B의 등전점은 각각 6.85와 6.40이었다. *Asp. niger*에서 분리한 GOD의 등전점이 4.2이라고 하는 보고(2)와는 큰 차이가 있었는데, 이와 같은 차이는 균주의 차이에 의한 것이 아닌가 생각되어지며, 한편 A와 B효소의 등전점의 차이는 당 함량의 차이에 기인한 것으로 판단된다.

지금까지의 실험 결과에서 A와 B는 소수성, 분자량(HPLC 겔여과), 최대 흡수 파장, 등전점 등에 차이를 보여, native form 또는 분자 구조에 차이가 있음이 시사되었으며, 이와 같은 결과는 지금까지 보고된 바가 없어 두 효소의 특성을 자세하게 비교 검토하는 것이 필요할 것으로 여겨진다. 차후의 실험에서는 우선 A에 대해서만 실험을 행하였다.

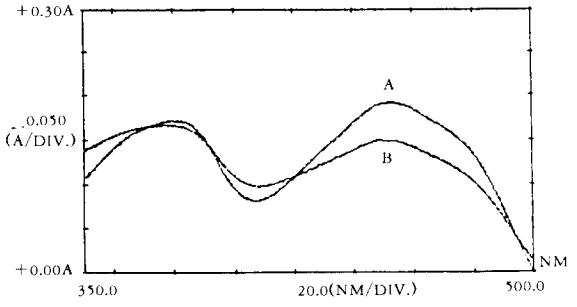

Fig. 3. Visible scanning of *Aspergillus niger* glucose oxidase. Five μg of enzymes were dissolved in 10mM sodium phosphate buffer(pH 6.8).

정제 효소의 특성

열안정성

25℃, 30℃, 40℃, 50℃, 60℃에서 1시간 incubation 시킨 후 GOD의 활성을 측정한 결과, 25℃와 30℃는 100%의 활성을 유지했지만 40℃, 50℃, 60℃에서는 원래 활성의 87%, 40%, 0%로 떨어졌다(Fig. 4). 즉, 이 효소는 열에 상당히 민감하며, 그 3차 구조는 열에 의하여 쉽게 변화된다는 것을 보여준다.

기질 특이성

몇 가지 기질을 사용하여 정제 효소의 반응성을 조사하였다. 기질로서 10% 농도의 β-D-glucose, D-xylose, β-D-arabiose, cellobiose 등이 사용되었는데, β-D-glucose에만 특이적으로 반응하였고, β-D-glucose 이외의 다른 기질들은 전혀 산화시키지 못하였다. GOD가 D-mannose, D-galactose, D-xylose, L-glucose , D-arabinose 등을 산화시키지 못

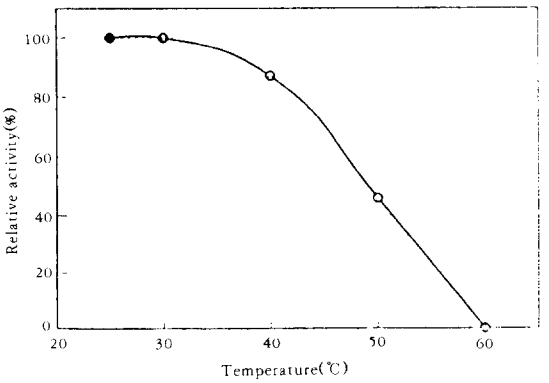

Fig. 4. Effect of temperature on the activity of *Aspergillus niger* glucose oxidase. Five μg of enzyme was preincubated in 50mM sodium acetate buffer(pH 5.1) at each temperature for 60min, then repidly cooled. The enzyme assay was carried out as described in the text and expressed as relative activity.

하고, β-D-glucose에 대해서만 활성을 나타낸다고 하는 보고(8, 11, 28)와 본 실험의 결과가 일치하였다. GOD는 D-glucose 이외에도 2-deoxy-D-glucose, 4-O-methyl-D-glucose, 6-deoxy-D-glucose, 4-deoxy-D-glucose, 3-deoxy-D-glucose, 3-O-methyl-D-glucose 등을 순서대로 산화시킬 수가 있는데(2), 이 기질 화합물들의 산화율 차이는 효소반응에 중요한 차이를 보이는 hexose분자의 구조적 차이에 기인한다. 즉, chair form에 있어 1, 3번 위치의 수산기가 적도방향에 위치해 있는 pyranose ring의 경우 효소-기질 복합체 형성에 많은 영향을 준다고 알려져 있다.

pH의 영향

Sodium acetate 완충액(pH 3.0~6.5)에서 pH의 영향이 조사되었다. pH 3.5에서 가장 안정하였고, 이보다 낮은 3.0에서는 활성이 50%로 감소되었다. 반면에 pH 3.5 이상에서는 그 감소율이 낮아 pH 6.5에서 73%의 활성도를 보였다(Fig. 5). 한편, *Phanerochate chrysoporium*의 GOD는 pH 4.6~5.0 (8), *Pen. notatum*의 GOD는 pH 5.5~5.6(29), *Pen. verruculosum*의 GOD는 pH 6.0(7), 벌꿀 중의 GOD는 pH 6.1(28)에서 최대활성을 갖는다고 보고되었는데, 본 실험에서 정제된 GOD는 이들의 것보다 낮은 pH에서 안정하여, 다른 균주와 비교해 보았을 때 비교적 산에 강한 효소임이 시사되었다.

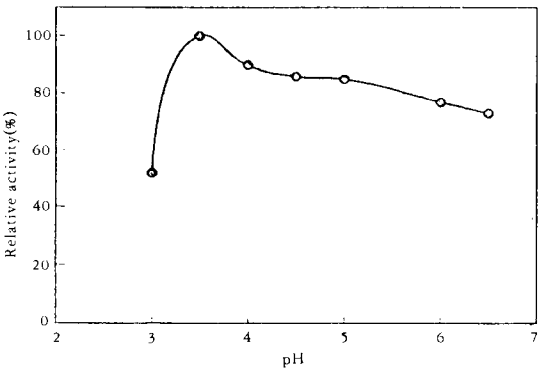

Fig. 5. Effect of pH on the activity of *Aspergillus niger* glucose oxidase. Five μg of enzyme was preincubated in 50mM sodium acetat buffer(pH 3.0 to 6.5) at 30℃ for 60min. Enzyme assay was carried out as described in the legend of Fig. 4.

SDS 저항성

SDS에 대한 정제 효소의 저항성이 조사되었다. 정제 효소는 SDS 0.1%와 0.2%에서는 거의 영향을 받지 않았으나, 1.0%에서는 34%, 5%에서는 80%의 효소활성이 감소되었고(Fig. 6), 10%에서는 95%의 효소활성이 실활되어 SDS에 대하여 비교적 강한 저항성을 나타내었다. Nakamura 등(10)은 변성 시약인 SDS에 GOD가 매우 안정하여 1% SDS를 첨가한 시료를 30℃에서 30시간 배양한 후에도 효소 활성에 변화가 없다고 했는데 본 실험 결과와는 약간의 차이가 있었다.

금속이온에 대한 영향

몇 가지 금속이온이 GOD 활성에 미치는 영향을 조사하였다. 이들 중 가장 현저하게 저하시키는 것은 $HgCl_2$로서 10mM의 농도에서 효소의 활성을 18%로 감소시켰으며, $FeCl_2$는 10mM 농도에서 효소의 활성을 40%로 감소시켰다(Table 2). FAD를 조효소로 하여 촉매 기능을 수행하는 GOD가 Hg^{2+}와 같은 금속이온과의 반응에 의해 효소 활성이 억제되는 현상은 이들 이온이 효소에 결합된 환원형의 조효소($FADH_2$)가 재산화되는 과정을 방해하기 때문이라 한다(7). 한편, Cu^{2+}나 Ag^{+}이온은 GOD의 활성에 큰 영향을 주지 않았다.

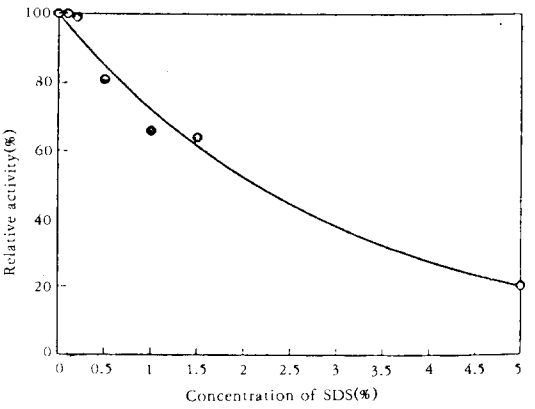

Fig. 6. Effect of sodium dodecyl sulfate on the activity of *Aspergillus niger* glucose oxidase. Five μg of enzyme was preincubated in 50mM sodium acetate buffer(pH 5.1)-SDS solution(0.1% to 10%) at 30℃ for 30min. Enzyme assay was carried out as described in the legend of Fig. 4.

Table 2. Effect o metal ions on the activity of *Aspergillus niger* Sglucose oxidase.

Metal	Conc.(mM)	Relative activity(%)
none	·····	100
$AgNO_3$	10	85
KCN	10	65
$HgCl_2$	10	18
$FeCl_2$	10	40
$CuCl_2$	10	90

효소의 활성부위

효소의 활성부위를 조사하기 위하여 활성부위의 아미노산에 대해 선택적으로 반응할 수 있는 시약들

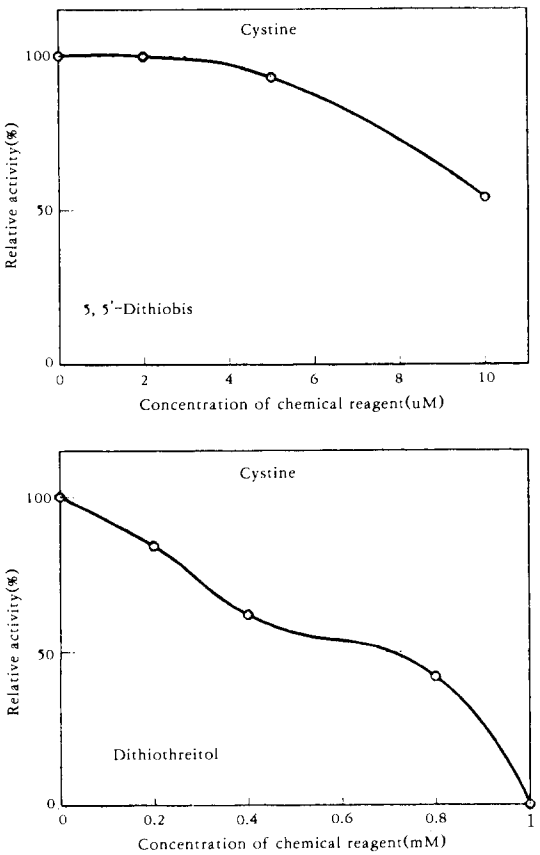

Fig. 7. Effect of modification reagents on the relative activity of *Asperillus niger* glucose oxidase. Chemical modifications and enzyme assay were carried out as described in the text.

이 사용되었다. 사용된 시약들 중 cysteine에 선택적으로 작용하는 5,5′-dithiobis-(2-nitro benzoic acid)(DTNB)가 10M의 농도에서 54%, cystine에 작용하여 환원시키는 dithiothreitol(DTT)는 1mM 농도에서 효소의 활성을 완전히 실활시켰다(Fig. 7). 또한, 수식 시약의 농도 증가에 따라 그 활성감소 비율도 커짐을 보였다. GOD의 subunit에는 3개의 cysteine 잔기가 함유되어 있는데(30), cysteine 중의 SH기는 -S-S-결합으로 효소의 활성에 관여하고, 그의 기능으로서는 2가지를 생각해 볼 수가 있다. 하나는 subunit들의 결합에 disulfide 결합으로 관여할 가능성과 또 하나는 활성 부위에서 이들의 관여 가능성이다. Ye와 Combes(26), Hwang과 Kim(7)에 의하면 GOD의 subunit는 -S-S-결합이 아닌 어떤 비공유결합적인 방법에 의해 결합되어 있다고 하며, -S-S-결합의 기능으로서는 전자보다는 후자인 활성부위에의 관여 가능성이 크다 하겠다. 한편 GOD중의 -S-S-결합에 관여하지 않는 SH기는 효소의 열안정성에 크게 기여한다고 한다(26).

이러한 결과들로부터 GOD의 glucose 산화 기작에는 FAD/FADH2 와 cysteine/cystine의 상호 작용이 관여할 것으로 추측되어진다. 더욱 자세한 기작을 조사하기 위해서는 화학적 수식, 기질농도의 영향, 수식에의 반응시간의 영향 등이 더 조사되어져야 할 것이다.

요 약

Aspergillus niger 균체로부터 황산암모늄 분별침전, 이온교환 크로마토그래피, 한외여과, 소수성 크로마토그래피 과정을 거쳐 glucose oxidase(EC 1.1.3.4)를 순수 정제하였다. 최종 정제과정인 소수성 크로마토그래피에 의해 소수성은 다르나 glucose oxidase의 활성을 갖는 A, B fraction이 얻어졌고, 그의 비활성도는 각각 2,191, 1,273units/mg이었다. A와 B는 분자량 78,000의 당단백질임이 확인되었으나, HPLC 겔 여과로 측정한 분자량, 최대 흡수 파장, 등전점 등에 차이를 보였다. 효소 A는 β-D-glucose를 특이적으로 산화하였고, 촉매 활성에 대한 최적 온도는 30℃, 최적 pH는 3.5이었으며, SDS에 대하여 비교적 강한 저항성을 나타내었고, 촉매 기능은 10mM Hg^{2+}에 의해 급격히 억제되었다. 화학 수식 실험 결과 cysteine/cystine중의 SH기가 glucose oxidase의 활성에 관여하고 있음이 시사되었다.

감 사

본 연구는 상공자원부의 공업기반 기술과제로 수행하였으며, 연구를 수행함에 있어 조언을 해준 전북대학교 엄태붕 교수에게 심심한 감사를 드립니다.

참고문헌

1. D. Müller(1928), *Biochem. Z.*, **199**, 136.
2. J. H. Pazur and K. Kleppe(1964), *Biochemistry*, **3**, 578.
3. B. E. P. Swoboda and V. Massey(1965), *J. Biol. Chem.*, **240**, 2209.
4. J. H. Pazur, K. Kleppe and A. Cepure(1965), *Arch. Biochem. Biophys.*, **111**, 351.
5. D. Keilin and E. F. Hartree(1948), *Biochem. J.*, **42**, 221.
6. K. Kusai, I. Sekuzu, B. Hagihara, K. Okunuki, S. Yamauchi and M. Nakai(1960), *Biochim. Biophys. Acta.*, **40**, 555.
7. H. J. Hwang and D. S. Kim(1988), *Korean Biochem. J.*, **21**, 430.
8. R. L. Kelley and A. Reddy(1986), *Bacteriology J.*, **166**, 269.
9. K. K. Kim, D. R. Fravel and G. C. Papavizas (1990), *Can. J. Microbiol.*, **36**, 760.
10. S. Nakamura, S. Hayashi and K. Koga (1976), *Biochim. Biophys. Acta.*, **445**, 294.
11. H. M. Kalisz, H. -J. Hecht, D. Schomburg and D. Schmid(1991), *Biochim. Biophys. Acta.*, **1080**, 138.
12. T. L. James, D. E. Edmonson and M. Hussain (1981), *Biochemistry*, **20**, 617.
13. J. L. Johnson, R. E. London and K. V. Rajagopalan(1989), *Proc. Acad. Natl. Sci. U. S. A.*, **86**, 6493.
14. S. S. Updike and G. P. Hicks(1967), *Nature*, **214**, 986.
15. J. G. Banks, R. G. Board and N. H. C. Sparks (1986), *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **8**, 103.
16. F. Berrocal and J. Carreras(1983), *Comp. Biochem. Physiol.*, **76**, 9.
17. A. F. S. A. Habeeb(1972), Methods in Enzymology, Vol. 25, 457-464, Academic Press, New York.
18. F. Berrocal and J. Carreras(1983), *Comp. Biochem. Physiol.*, **76**, 795.
19. K. D. Schnackerz and E. A. Noltmann(1971), *Biochemistry*, **10**, 4837.
20. W. W. Cleland(1964), *Biochemistry*, **3**, 480.
21. U. K. Laemmli(1970), *Nature*, **227**, 680.
22. G. Fairbanks, T. S. Steck and D. F. H. Wallach(1971), *Biochemistry*, **10**, 2606.
23. R. M. Zacharius, T. E. Zeil, J. H. Morrison and J. J. Woodlock(1969), *Anal. Biochem.*, **30**, 148.
24. M. M. Bradford(1976), *Anal. Biochem.*, **72**, 248.
25. M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers and F. Smith(1956), *Anal. Chem.*, **28**, 350.
26. W. N. Ye and D. Combes(1989), *Biochim. Biophys. Acta.*, **999**, 86.
27. E. P. Swoboda and V. Massey(1966), *J. Biol. Chem.*, **241**, 3409.
28. A. I. Schepartz and M. H. Subers(1964), *Biochim. Biophiys. Acta.*, **85**, 228.
29. E. C. Adams, C. E. Burkhart and A. H. Free (1957), *Science*, **125**, 1082.
30. K. R. Frederick, J. Tung, R. S. Emerick, F. R. Masiarz, S. H. Chamberlian, A. Vasavada, S. Rosenberg, S. Chakraborry, L. M. Schopter and V. Massey(1990), *J. Biol. Chem.*, **265**, 3793.