

과요오드산-산화 가용성 전분에 의한 *Aspergillus awamori* α -Glucosidase의 안정성 및 변형

† 안 용 근

충청대학 인체예술학부 식품영양전공

Stability and Modification of *Aspergillus awamori* α -Glucosidase with IO₄-oxidized Soluble Starch

† Yong-Geun Ann

Chungcheong College

Abstract

Periodate-oxidized soluble starch increased pH stability of *Aspergillus awamori* α -glucosidase. After incubation for two hours, the enzyme in the absence of oxidized soluble starch was stable in the range of pH 3-7 at 40 °C, pH 3-6 at 50 °C and the enzyme in the presence of oxidized soluble starch was stable in the range of pH 3-9 at 40 °C, pH 3-8 at 50 °C. At 60 °C, the enzyme was stable in pH 3-6 regardless of the presence or absence of IO₄-oxidized soluble starch, but when IO₄-oxidized soluble starch existed in pH 5-6, remained activity of the enzyme increased 20% more than when it didn't exist. The enzyme modified with IO₄-oxidized soluble starch remained 70% of activity in pH 9, but native enzyme didn't remain, showing the increase of stability due to modification. In thermal stability, modified enzyme remained 12% at 50 °C and 7% at 80 °C. But native enzyme remained 8% at 50 °C and didn't remain at more than 70 °C. The result of HPLC analysis revealed the subunit of the enzyme at under pH 2 or over pH 9 was separated or the enzyme was denatured and conjugated. Protein structure of native enzyme was denatured by acidic and basic pH but was stable in the presence of IO₄-oxidized soluble starch.

Key words : stabilization of *Aspergillus awamori* α -glucosidase, modification of *Aspergillus awamori* α -glucosidase, periodate-oxidized soluble starch

서 론

당단백질은 구조단백질, 운반체 단백질, 면역계 단백질, 호르몬, 인터페론, 효소 등 생체의 주요 구성성분이다. 이것은 당단백질이 세포 사이, 분자 사이, 분

자와 세포 사이의 인식마커와 정보전달자로서 여러 생명현상에 관여하여 생체 대사와 활성발현을 조절하기 때문이다. 이것은 당단백질이 점성과 용해성, 유화성, 방부 효과 및 항산화 효과 등 많은 기능을 갖기 때문이다. 그래서 이들 기능을 이용하여 당단백질

본 연구는 2004년도 충청대학 교내학술 연구비로 수행되었음.

† Corresponding author : Yong-Geun Ann, Dept. of Food and Nutrition, Chungcheong College, Gangnae, Cheongwon, Chungbuk 363-890, Korea.

Tel : +82-43-230-2193, Fax : +82-43-230-2196, E-mail: annygn@hanmail.net

을 방부제, 선도 유지제, 신미각물질, 장내 세균 제어제, 충치 예방제, 기능성 단백질, 바이오리액터, 분리정제용 재료, 인공장기 재료, 바이오센서, 화장품 재료, 진단약 등으로 사용하려는 시도가 계속되고 있다. 이를 위해 여러 분야에서 인공적으로 당단백질을 조제하기 위해 노력하고 있다. 이를 탄수화물공학이라 하며, 유전자공학과 단백질공학에 이어 제3의 바이오테크놀러지로 주목받고 있다.¹⁻⁴⁾

그래서 전보에서는 싼 재료를 사용하여 쉽고, 간단한 방법으로 무해하고 유용한 기능성 당단백질을 조제하고자 NaIO₄-산화 전분 및 말토올리고당을 단백질과 반응시켜 당단백질을 만드는 방법을 개발하였다.^{5,6)} 분자 표면에 리신의 ϵ -NH₂기가 존재하는 효소는 이 방법으로 당단백질로 조제할 수 있으며, 전보에서 이 방법으로 고구마 β -아밀라아제에 산화당을 부가하여 고구마 β -아밀라아제의 서브유니트 구조와 기능을 해석한 바 있고⁷⁻¹¹⁾ *Aspergillus* sp. *a*-amylase¹²⁾, 보리 β -amylase¹³⁾, 밀 β -amylase¹⁴⁾, 기타 아밀라아제¹⁵⁾ 등에 대하여도 적용하여 안정성을 증가시키는 결과를 확인한 바 있다. 그러나 *a*-glucosidase에 대하여서는 보고된 바 없다.

a-Glucosidase(*a*-D-glucoside glucohydrolase, EC. 3.2.1.20)는 동식물, 미생물에 널리 존재하고, 전분이나 말토올리고당의 비환원말단의 α -1,4-결합을 glucose 단위로 가수분해하며 α -1,6-결합도 가수분해한다. 그러나, 분자가 큰 올리고당이나 전분에 대한 가수분해력과 α -1,6-결합에 대한 가수분해력은 약하다. *a*-Glucosidase는 동물의 소화효소로 타액과 위에서 *a*-amylase가 전분을 가수분해하여 생성된 올리고당을 포도당으로 가수분해한다. 생성된 포도당은 소화 흡수되어 해당과 TCA 회로 등을 통하여 몸에서 이용된다.¹⁶⁻¹⁸⁾

a-Glucosidase는 고농도 당농도에서는 이소말토올리고당을 합성하며, 이소말토올리고당은 난 소화성으로 비피루스균 활성화 인자로 작용하므로 산업적으로도 중요하지만 안정성이 낮아서 적용하기 어려운 경우가 많다.¹⁹⁾

본 연구는 *Aspergillus awamori*의 *a*-glucosidase(이하 *a*-glucosidase라고 한다)에 과요오드산-산화가용성전분을 부가시켜서 효소의 안정성 증가를 시도하고 생성된 당단백질 효소의 성질 변화를 분석한 결과이다.

실험 재료 및 방법

1. 재료

a-Glucosidase는 전보의 방법에 따라 *Aspergillus*

awamori KT-11에서 정제하여 사용하였다²⁰⁾. 이 효소는 1 mL에 2,461 unit/mL의 활성을 나타냈다. 기타 시약은 Sigma의 일급 및 특급을 사용하였다.

2. 환원당 정량

Somogyi-Nelson법²¹⁾을 사용하였다. 즉, 시료액 0.4 mL에 Somogyi-Nelson 시약 A용액 1 mL를 가하여 100 °C에서 10분간 가열한 다음 B용액 1 mL를 가하여 나머지를 물로 채워 25 mL로 하였다. 이 반응액을 분광광도계를 사용하여 500 nm에서 글루코오스를 표준 물질로 비색정량하였다.

3. α -글루코시다아제 활성 측정

0.1 M 아세트산 완충액(pH 4.8) 중에서 끓여 녹인 0.2% 가용성 전분 0.2 mL와 효소액 0.2 mL를 37 °C에서 10분간 반응시킨 다음 Somogyi-Nelson A 시약 1 mL를 가하여 반응을 중지시키고, 100 °C에서 10분간 가열하였다. 식힌 다음 Somogyi-Nelson B시약 1 mL를 가하고 증류수로 채워 25 mL로 하여 분광광도계로 글루코오스를 표준으로 500 nm에서 비색정량하였다. 1 Unit는 1분간에 글루코오스 1 μ mol을 유리하는 효소량으로 하였다.

4. NaIO₄에 의한 가용성 전분의 산화

가용성 전분 2 g을 100 mL의 0.2 M NaIO₄ 용액에 현탁하여 4 °C에서 40분간 교반하여 반응시킨 다음 ethyleneglycol 10 mL를 가해 미반응의 NaIO₄를 소모시켜서 제거하였다. 다음, 증류수에 투석하여 저분자물질을 제거한 다음 동결건조하였다.

5. 과요오드산-산화 가용성 전분 존재시의 온도별 pH별 변형에 따른 안정성

과요오드산-산화가용성전분 10 mg을 0.5 M 붕산완충액(pH 9.7) 20 μ L, 물 80 μ L 용액에 가하여 50 °C에서 15분간 녹인 다음 pH 2에서 12까지의 0.5 M 붕산완충액 60 μ L를 가하여 1/20로 희석한 효소액 40 μ L를 가하였다. 이 용액은 효소 200 μ L에 효소 4.9 unit, 과요오드산-산화가용성전분 5 %, 0.05 M 붕산완충액(pH 9.7) 농도를 가졌다. 이 용액을 40, 50, 60 °C에서 각각 15분간 반응시킨 다음 0.1 M 아세트산 완충액(pH 5.0) 5.8 mL를 가하여 희석한 다음 그중 200 μ L를 취하여 잔존 활성을 측정하였다.

6. 과요오드산-산화 가용성 전분 존재시의 pH 안정성

pH 9.7의 0.1 M 붕산 완충액 125 μ L에 과요오드산-

산화 가용성 전분 10 mg을 가한 후, pH 5.0의 0.5 M Britton-Robinson 광역 완충액($H_3PO_4 + CH_3COOH + H_3BO_3 + NaOH$) 60 μ L와 352 unit/mL의 활성을 가진 효소액 50 μ L를 가하여 각 온도에서 15분간 반응시킨 후, 사용직전에 조제한 1 M $NaBH_4-HCl$ 용액 (pH 7.5) 2.5 μ L를 가하여 40°C에서 10분간 환원시킨 다음 0.5% maltotriitol 200 μ L를 가하여 잔존 과요오드산-산화 가용성전분을 중화시키고 0.1 M 아세트산 완충액(pH 5.0) 2.25 mL를 가하여 안정 pH로 돌렸다.

7. pH 안정성

변형시킨 효소 및 변형시키지 않은 효소액 120 μ L에 0.5 M의 pH 2에서 pH 12까지의 0.5M Britton-Robinson의 광역 완충액 80 μ L를 가하여 37°C에서 3시간 항온한 후 pH 5.0의 0.1 M 아세트산 완충액 1.5 mL를 가하여 그중 200 μ L를 취하여 0.5% 말토트리이톨 2000 μ L를 가한 다음 Somogyi-Nelson법으로 비색정량하여 잔존활성을 측정하였다.

8. 열 안정성

상기와 같은 방법으로 조제한 당부가 효소액을 70°C에서 0분, 5분, 10분, 20분, 30분 간격으로 200 μ L씩 취해 기질(2% 가용성 전분/0.1 M 아세트산 완충액, pH 5.5) 200 μ L를 가해 37°C에서 10분간 반응시켜서 Somogyi-Nelson법으로 비색정량하여 잔존활성을 측정하였다.

9. HPLC

HPLC 펌프는 Shimadzu LC-6A, 적산기는 Shimadzu Chromatopak G-R3A, 검출기는 UV 검출기로 280 nm에서 검출하고, 컬럼은 SynChropak GPC 100(1 \times 30 cm)을 사용하여 0.2 M NaCl을 함유한 0.1 M K-인산완충액 (pH 6.8)으로 0.7 mL/min의 유속으로 유출시켰다.

결과 및 고찰

1. 과요오드산-산화 가용성 전분에 의한 효소의 pH 별 온도 안정성

산화 가용성 전분에 의한 효소의 pH별 온도 안정성을 살펴 보았다. 40, 50, 60°C에서 각 pH 별로 15분간 반응시킨 다음 잔존활성을 분석한 결과는 Fig. 1과 같다. pH 2에서는 과요오드산-산화 가용성전분 존재 여부에 관계없이 50°C 이상에서 실활하였고, pH 3~4에서는 과요오드산-산화 가용성전분의 존재 여부에 관계없이 안정하였으나, 과요오드산-산화 가용성전분 존재

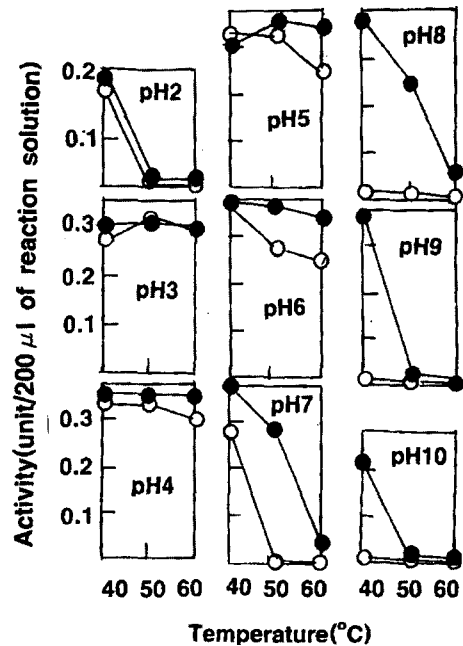


Fig. 1. Thermal and pH stability of *Aspergillus awamori* α -glucosidase in the presence or absence of IO_4 -oxidized soluble starch.

○; in the absence of IO_4 -oxidized soluble starch.
●; in the presence of IO_4 -oxidized soluble starch.

하에서는 pH 6까지는 안정하였다. 과요오드산-산화 가용성전분이 존재하지 않으면 pH 5와 6에서는 60°C에서 70%의 활성이 남았으나 pH 7 이상의 pH에서는 활성이 남지 않았다. 그에 비해 과요오드산-산화 가용성 전분이 존재하면 pH 6과 7까지 존재하지 않을 때보다 잔존활성이 높아서 pH 8에서도 50°C에 60%의 활성이 남았다(Fig. 1).

이 같이 과요오드산-산화 가용성전분은 α -글루코시다아제의 넓은 온도, 넓은 pH 범위에서 안정성을 증가시켰다.

2. 과요오드산-산화 가용성 전분에 의한 효소의 pH 안정성

변형시, 과요오드산-산화 가용성 전분의 알데히드기는 효소 표면의 리신의 아미노기와 Schiff 염기를 형성하여 공유결합한다⁵⁾. 그와는 별도로 과요오드산-산화 가용성 전분이 α -글루코시다아제의 pH 안정성에 영향을 미치지만 연구된 결과가 없다. 그래서 40, 50, 60°C로 온도를 달리하고 각 pH에서 과요오드산-산화 가용성 전분과 α -글루코시다아제를 15분간 항온한 다음 분석한 결과 Fig. 2와 같다.

40°C에서 과요오드산-산화 가용성 전분은 α -글루코

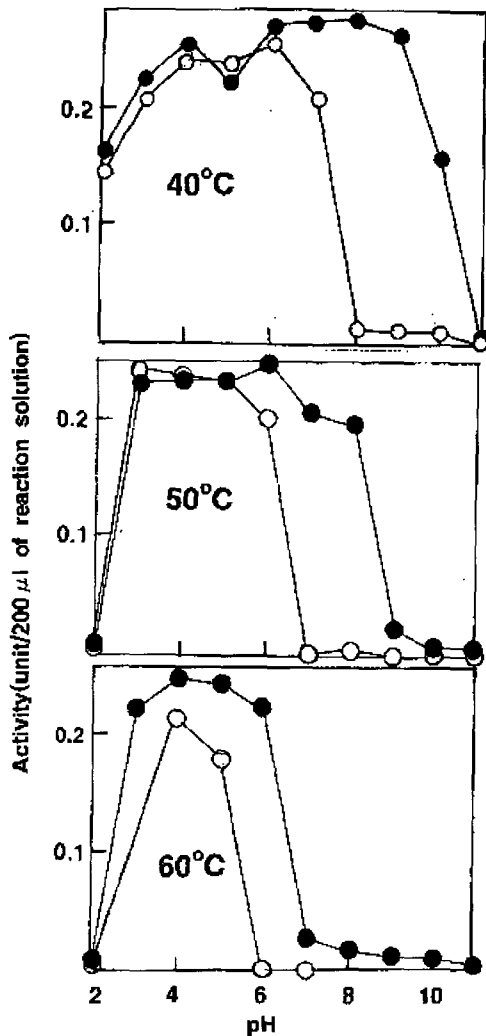


Fig. 2. pH stability of *Aspergillus awamori* α -glucosidase in the presence or absence of IO_4 -oxidized soluble starch.

○; in the absence of IO_4 -oxidized soluble starch.
 ●; in the presence of IO_4 -oxidized soluble starch.

시디아제를 pH 3에서 9까지 안정하게 하고, pH 2와 10에서는 50% 정도 활성이 남게 하였다. 과요오드산-산화 가용성 전분이 존재하지 않으면 pH 3에서 7까지 안정하고 pH 2에서는 50% 정도 남고, pH 8에서는 거의 활성을 잃어서 과요오드산-산화 가용성 전분이 존재하지 않으면 pH 안정 범위가 줄어들었다.

50°C에서 과요오드산-산화 가용성 전분은 α -글루코시디아제를 pH 3에서 8까지 안정하게 하였으나 pH 2와 9에서는 활성을 잃었다. 과요오드산-산화 가용성 전분이 존재하지 않으면 안정성은 pH 3과 6 범위로 줄고 pH 2와 7에서 거의 활성을 잃었다.

60°C에서 과요오드산-산화 가용성 전분은 α -글루코

시디아제를 pH 3에서 6까지는 안정하게 하였으나 pH 2와 7에서는 활성을 잃었다. 과요오드산-산화 가용성 전분이 존재하지 않으면 안정성은 pH 3과 5 범위로 줄고 pH 2와 6에서는 거의 활성을 잃었다.

이같이 과요오드산-산화 가용성 전분이 존재하면 산성 및 알칼리성 pH에 대한 α -글루코시디아제의 안정성은 높아졌다. 안정성은 온도가 높을수록 폭이 좁아졌는데, 같은 조건에서 과요오드산-산화 가용성 전분이 존재하면 안정성 폭은 증가하였다.

이같이 과요오드산-산화 가용성 전분은 α -글루코시디아제를 안정화시켰다. 과요오드산-산화 가용성 전분에 의한 α -글루코시디아제의 안정성 증가는 보고된 결과가 없다.

3. 변형 α -글루코시디아제의 pH 안정성

잔존 과요오드산-산화 가용성 전분을 말토트리톨로 환원시키고 희석하여 과요오드산-산화 가용성 전분의 영향을 줄인 다음 분석한 결과, Fig. 3과 같이 과요오드산-산화 가용성 전분으로 변형시킨 α -글루코시디아제는 변형시키지 않은 효소보다 pH 9에서 안정성이 증가하였다(Fig. 3).

한편, 밀 β -아밀라아제¹⁴⁾ 및 보리 β -아밀라아제¹³⁾는 과요오드산-산화 가용성 전분 변형으로 산성 및 알칼리성 pH에서 모두 안정범위가 증가하였다고 보고되었다. 보리 β -아밀라아제는 최적 안정 pH 피크가 5에서 7로 변하였다고 하였으나 본 결과와 밀 β -아밀라아제는 피크가 변동하지 않았다.

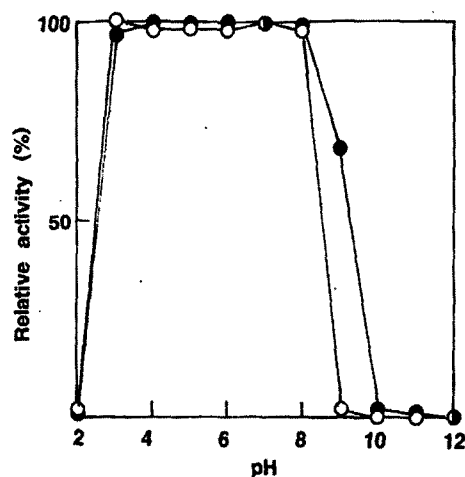


Fig. 3. pH stability of *Aspergillus awamori* α -glucosidase modified with IO_4 -oxidized soluble starch.

○; in the absence of IO_4 -oxidized soluble starch.
 ●; in the presence of IO_4 -oxidized soluble starch.

4. 변형 α-글루코시다아제의 열 안정성

변형시킨 α-글루코시다아제와 변형시키지 않은 α-글루코시다아제를 각 온도에서 2시간 항온한 다음 잔존 활성을 측정한 결과는 Fig. 4와 같이 온도가 높을수록 잔존 활성이 저하하였는데, 변형시킨 α-글루코시다아제는 30℃에서 53%, 40℃에서 23%, 50℃에서 12%, 80℃에서 7%가 남았으나, 변형시키지 않은 α-글루코시다아제는 50℃에서 8%, 60℃에서 3%를 나타내고 70℃ 이상에서는 남지 않았다. 이 같이 낮은 온도의 안정성은 크게 차이 나지 않지만 높은 온도에서는 변형 효소의 안정성이 높아졌다(Fig. 4).

한편 *Bacillus licheniformis* α-amylase¹²⁾와 고구마 β-아밀라아제^{8~10,15)}, *Aspergillus* sp. α-amylase¹²⁾도 과요오드산-산화용성전분 변형으로 안정성이 증가한 것으로 보고되었다.

5. α-글루코시다아제 단백질에 대한 pH의 영향

SynChropak GPC 100 겔크로마토그래피 컬럼을 사용하여 α-글루코시다아제의 순도와 pH에 대한 안정성을 분석한 HPLC 결과는 Fig. 5와 같이 pH 3~pH 8에서 α-글루코시다아제는 단일 피크로 순수한 것으로 나타났다. 각 pH에서 반응시킨 다음 HPLC로 분석한 결과 pH 2에서 α-글루코시다아제는 중심 피크가 없어지고 여러 분자량의 분포를 보였다. 이것은 α-글루코시다아제 단백질이 변성되었기 때문이다. pH 3과 8 범위에서는 변성되지 않아서 단일 피크로 나타났다. 그러

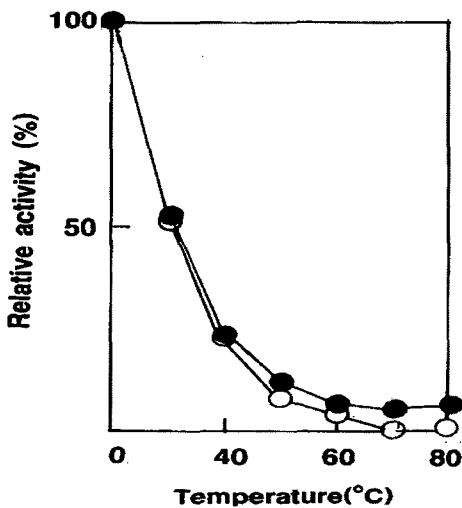


Fig. 4. Thermal stability of *Aspergillus awamori* α-glucosidase modified with IO₄-oxidized soluble starch.

○; in the absence of IO₄-oxidized soluble starch.
●; in the presence of IO₄-oxidized soluble starch.

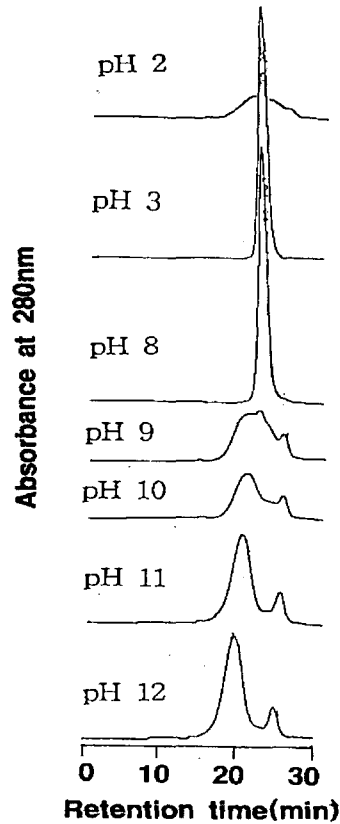


Fig. 5. HPLC of *Aspergillus awamori* α-glucosidase treated with acidic and basic buffer.

나 pH 9 이상에서는 변성되어 원피크는 없어지고 앞뒤로 다른 피크가 나타났다. 원피크보다 느린 피크는 분자량이 작은 서브유닛인데, 분리된 것이고, 원피크보다 빠른 피크는 변성 중합하여 커진 피크이다. pH 12에서는 원피크는 없어지고 변성 중합된 다량의 피크와 소량의 분리된 서브유닛만 나타났다.

6. α-글루코시다아제 변형시의 효소단백질에 대한 pH의 영향

α-글루코시다아제 변형시의 pH에 대한 영향을 HPLC로 분석한 결과 Fig. 6과 같이 pH 3.0 및 pH 6.8에서 변형시킬 경우, 변형 α-글루코시다아제의 단백질 피크는 변화가 없어서 안정한 것으로 나타났으나 pH 9.7에서는 분자량이 약간 작은 피크만 남아서 변성된 것으로 나타났다. 반면, 변형시키지 않은 α-글루코시다아제는 같은 조건에서 pH 6.8 외에는 피크가 거의 남지 않았다(Fig. 6).

pH 안정성에서 과요오드산-산화용성전분이 존재하면 α-글루코시다아제가 안정화된 경우는 HPLC 피크에 변화가 없고, 안정성이 떨어질 때는 HPLC 피크가 무너졌다.

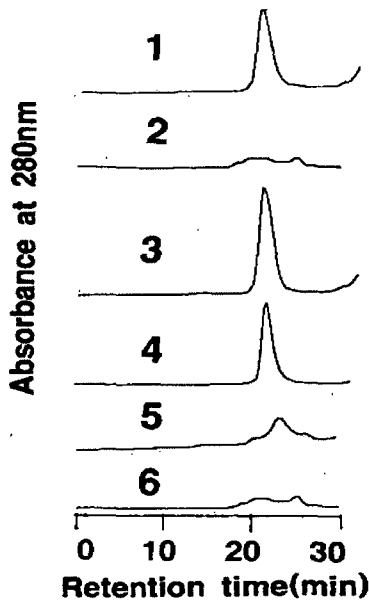


Fig. 6. HPLC of *Aspergillus awamori* α -glucosidase modified with IO_4 -oxidized soluble starch.

HPLC, Shimadzu system; column, SynChropak GPC 100 (1×30 cm); flow rate, 0.7 mL/min; eluate, 0.1M K-phosphate buffer(pH 6.8) containing 0.2 M NaCl; 1. enzyme modified in pH 3.0; 2, native enzyme in pH 3.0; 3. enzyme modified in pH 6.8; 4, native enzyme in pH 6.8; 5. enzyme modified in pH 9.7; 6, native enzyme in pH 9.7.

피크가 무너지는 것은 산이나 알칼리 pH에 의하여 α -글루코시다아제 단백질이 변성되어 침전되어 피크로 나타나지 못하기 때문이다.

요약

과요오드산-산화가용성전분은 *Aspergillus awamori* α -glucosidase의 pH 안정성을 증가시켰다. 40°C에서 두 시간 항온시킨 결과, 과요오드산-산화가용성전분이 존재하지 않을 때의 효소는 pH 3~7, 존재할 때의 효소는 pH 3~9, 50°C에서 과요오드산-산화가용성전분이 존재하지 않을 때의 효소는 pH 3~6, 존재할 때의 효소는 pH 3~8 범위에서 안정하였다. 60°C에서는 과요오드산-산화가용성전분의 존재여부에 관계없이 효소는 pH 3~6 범위에서 안정하였으나 pH 5와 6에서 과요오드산-산화가용성전분이 존재하면 효소의 잔존활성은 존재하지 않을 때보다 20% 더 높았다. 과요오드산으로 변형한 효소는 pH 9에서 활성이 70% 남았으나 변형하지 않은 효소는 남지 않아서 변형으로 안정성이 증가된 것으로 나타났다. 변형효소는 50°C에서

12%, 80°C에서 7%의 활성이 남았으나 변형시키지 않은 효소는 50°C에서 8%가 남고, 70°C이상에서는 남지 않았다. HPLC 분석 결과 pH 2 이하 및 9 이상에서는 효소의 서브유니트가 분리되고, 변성 중합되었다. 변형하지 않은 효소는 산성과 알칼리성 pH에서 변성되어 단백질의 구조가 무너졌지만 과요오드산-산화가용성전분이 존재하면 변성되지 않았다.

참고문헌

1. 楠本正一. 인터뷰, 바이오인더스트리. 3:2-4. 1991
2. N. 샤론著/大澤利昭譯. 糖蛋白質, 複合糖質. pp.19-27. 學會出版센터. 1986
3. N. 샤론著/大澤利昭譯. 糖의機能, 複合糖質. pp.109-130. 學會出版센터. 1986
4. 近畿바이오인더스트리振興會議. 通産省は次世代で『複合糖質生産利用技術』の開発. 바이오인더스트리. 3:5-6. 1991
5. Ann, YG. Glycosylation of protein by conjugation of periodate-oxidized sugars. *Korean J. Food Sci. Technol.* 31:62-67. 1999
6. Ann, YG. Preparation mechanism of glycoprotein by periodate-oxidized soluble starch and maltooligosaccharides. *Korean J. Food Sci. Technol.* 31:482-487. 1999
7. Ann, YG. Study on sweet potato β -amylase. PhD thesis. Osaka city university. 1989
8. Ann, YG, Iizuka, M, Yamamoto, T and Minamiura, N. Evidence for existence of an active monomer of sweet potato β -amylase. *Agric. Biol. Chem.* 53: 3109-3110. 1989
9. Ann, YG, Iizuka, M, Yamamoto, T and Minamiura, N. Preparation and some properties of active monomer of sweet potato β -amylase. *Agric. Biol. Chem.* 54:769-774. 1990
10. Ann, YG, Iizuka, M, Yamamoto, T and Minamiura, N. Active monomer of sweet potato β -amylase. Stabilization and an improved preparation method using α -cyclodextrin. *J. Ferment. Bioeng.* 70:75-79. 1990
11. Minamiura, N, Ann, YG, Iizuka, M, Ito, K and Yamamoto, T. Preparation of an active monomer from sweet potato tetrameric β -amylase in the presence of α -cyclodextrin. *Denpun Kakaku* 38:153-157.

- 1991
12. Ann, YG. Stabilization of *Aspergillus* sp. α -amylase by modification with IO_4^- -oxidized starch. *Korean J. Food & Nutr.* 12:265-270. 1999
 13. Ann, YG. Stabilization of barley β -amylase by modification with IO_4^- -oxidized starch. *Korean J. Food & Nutr.* 13:342-347. 2000
 14. Ann, YG. Stabilization of wheat β -amylase by modification with IO_4^- -oxidized starch. *Korean J. Food & Nutr.* 13:348-352. 2000
 15. Ann, YG, Anindyawati, T, Ito, K, Iizuka, M and Minamiura, N. Stabilization of amylolytic enzymes by modification with periodate-oxidized soluble starch. *Korean J. Food & Nutr.* 11:561-564. 1998
 16. 山本武彦. 上代淑人, 徳中正信, 八木達彦, 一島英治編. 3.2.1.20 α -D-Glucosidase, 酵素 핸드ブック. pp.499-500. 朝倉書店. 1982
 17. 岩政輝男, 武内忠男, 小川和朗編. 新酵素組織化學, α -Glucosidase, pp395-396. 朝倉書店. 1980
 18. Minamiura, N, Matoba, K, Nishinaka, H and Takehiko, Y. Identity of α -glucosidase of human kidney with urine F-1 α -glucosidase. *J. Biochem.*, 91:809-816. 1982
 19. 新家龍, 南浦能至, 北畑壽美雄, 大西正建編. ビヒズス因子活性(北畑壽美雄), 糖質の科學. pp95-105. 朝倉書店. 1996
 20. Anindyawati, T, Ann, YG, Ito, K, Iizuka, M and Minamiura, N. Two kinds of novel α -glucosidases from *Aspergillus awamori* KT-11 . Their purification, properties and specificities. *J. Ferment. Bioeng.* 85: 465-469. 1998
 21. Nelson, N. A photometric adaption of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 153:375-380 1944

(2004년 12월 8일 접수; 2005년 2월 20일 채택)