

고구마 β -아밀라제의 subunit

안 용근

大阪市立大學 理學部

(1988. 12. 10 수리)

Subunits of Sweet Potato β -Amylase

Yong-Geun Ann

Faculty of Science, Osaka City University

(Received December, 10, 1988)

ABSTRACT

β -Amylase was obtained from sweet potato extract in a crystalline state by dialysis against water after precipitated with acetone according to the method reported previously followed by DEAE Sephadex A-50 ion exchange chromatography plus gel chromatography of Sephadex G-200.

The purified enzyme was homogeneous by SDS PAGE. The efforts had done to remove the miner bands in SDS PAGE by Sephadex G-200 gel chromatography, DATE Sephadex A-50 ion exchange chromatography, isoelectrophocusing, affinity chromatography, hydroxyapatite chromatography, recrystallization and HPLC on a column of TSK gel SW 3000 but have given any result. But, N-terminal amino acid of the enzyme was revealed mainly alanine and trace of glycine and glutamic acid. Therefore, it seems that the miner bands in SDS PAGE have a role of subunit.

서 론

β -아밀라제 (α -1,4-glucan maltohydrolase EC 3, 2, 1, 2)는 glucan의 α -1, 4-결합을 비환원성 말단에서 차례대로 가수분해하여 β -anomeric maltose를 생산하는 exoenzyme이다.

β -아밀라제는 주로 식물계에만 존재하는 것으로 알려져 왔으나 근년 박테리아¹⁾ 및 곰팡이²⁾에서도 발견이 되는것으로 보고가 계속되고 있다.

β -아밀라제는 SH 시약에 의해 실활되므로 SH효소로 알려져 왔다. 그러나 고구마 β -아밀라제³⁾ 및 콩 β -아밀라아제⁴⁾에 대한 자세한 연구 결과를 통하여 SH기가 활성화에 관여하는 것은 사실이나 필수적인 것은 아니라고 밝혀졌다. 입체구조는 콩 β -아밀라아제⁵⁾를 중심으로 연구되어

왔다.

고구마 β -아밀라제의 구조와 촉매기능과의 관계에 대한 연구로는 본연구자가 개발, 전보에 보고한 상온아세톤 분획법^{6,7)}으로 정제한 효소를 사용한 전1차구조 결정결과⁸⁾가 있다. 그러나 2차구조와 3차구조에 대해서는 보고된 바 없다.

4차구조에 대해서는 분자량 55,592(아미노산 495 잔기)⁸⁾의 동일 subunit 넷으로 형성되어 있는 분자량 20만 정도의 tetramer⁹⁾로 알려져 있다. 그러나 본연구자가 정제효소를 전기영동으로 확인한 바, ordinary 전기영동으로는 균일한 단일 밴드를 나타내나 SDS 전기영동으로는 분자량 52,000을 나타내는 주밴드 외에 그보다 적은 분자량을 나타내는 소량의 여러 부밴드가 존재하며, 그들 부밴

드는 여러 정제 수단에 의해서도 제거되지 않았다. 그러나 현재까지 그에 대한 보고가 전혀 발견되지 않고 있다. 따라서 본연구자는 그들 성분의 존재의의를 밝히고자 본연구를 수행하였다.

재료 및 방법

효소의 정제

전보의 방법⁷⁾에 따라 고구마(일본산 高系14호) 추출액을 60°C에서 10분간 열처리하여 함유 β -아밀라제에 상온에서의 아세톤에 대한 내성을 부여한 다음, 50% 및 40% 아세톤분획으로 얻은 침전 효소를 Sephadex G-200 겔여과와 DEAE Sephadex A-50의 이온교환 크로마토그래피에 의해 정제한 다음, 결정화하였다. 결정은 다시 녹여 재결정후 동결건조하여 본실험에 사용하였다.

전기영동

Polyacrylamide disc gel 전기영동은 7.5%의 acrylamide 농도로 겔을 중합시켜 pH 8.3의 Tris-HCl 완충액계에서 영동하였다.

SDS 전기영동은 13.5×13.5cm의 plate를 사용, 5%에서 20%까지의 acryl amide의 직선 농도구배로 겔을 중합시켜 0.1%의 SDS를 함유하는 Tris-HCl완충액(pH 8.3)계를 사용, 영동하였다.

HPLC

TSK gel SW 3,000(0.75×30cm) 겔 크로마토그래피 칼럼에 대해, 0.1M K-인산완충액(pH-6.8)을 사용, 0.3ml/min 유속으로 본효소를 유출시켰다.

DEAE Sephadex A-50의 이온교환 크로마토그래피

0.01M Tris-HCl 완충액 (pH6.8)으로 평형화시킨 DEAE Sephadex A-50(2.5×72cm)의 칼럼에 본효소를 흡착, 0.5M(400ml)의 NaCl직선 농도구배로 효소를 용출시켰다.

Hydroxyapatite에 의한 크로마토그래피

0.01M K-인산완충액(pH6.8)으로 평형화시킨 1.2×7.2cm의 hydroxyapatite 칼럼에 동완충액으로 투석한 효소액을 가해 흡착시킨 다음, 0.01M에서 0.4M의 동완충액의 직선 농도구배에 의해 효소를 용출시켰다.

Affinity 크로마토그래피

Vretblad¹⁰⁾의 방법에 따랐다. 즉, Epoxyacticated Sepharose 6B 4g을 증류수 25ml에 현탁, 팽윤시킨 후 증류수와 NaOH로 여과세정하였다. 그를 L형 시험관에 옮겨 0.1N NaOH에 현탁시킨 α -cyclodextrin 300mg을 가한 다음, 40°C에서 진탕, coupling 반응시켰다. 반응후 gel을 증류수와 0.03M 초산완충액(pH4.8)으로 세정, 평형화 시켰다. 조제겔을 0.9×18cm의 칼럼에 충전, 효소(20mg)를 흡착시킨 다음 1% α -cyclodextrin을 함유한 동완충액으로 효소를 용출시켰다.

등전점 전기영동

110ml의 칼럼을 사용, 0%에서 50%까지 4.6ml×24단계의 설탕 농도구배 및 pH3.5에서 10.0까지 ampholyte의 pH 구배에 의해 500V 1mA의 전류를 12시간 가한 후 900V 1.5mA로 30시간 전기영동하였다. 영동후 3ml분획으로 받아 활성과 pH를 측정하였다.

N말단 아미노산 분석

Dansyl chloride 방법을 사용하였다. 즉, 효소 10nmole을 0.2M NaHCO₃액 10 μ l에 녹인 다음 0.5% dansyl chloride 의 아세톤 용액을 가해 37°C에서 1시간 반응시킨 후 건조하여 6N 염산을 가해 105°C에서 6시간 가수분해 하였다. 가수분해물을 plate에 marker와 함께 spot하여 1.5%개미산으로 1차전개후 벤젠-초산(9:1)용액으로 2차전개하여 형광으로 검출하였다.

결 과

정제효소의 전기영동 결과, ordinary 전기영동으로는 균일한 단일밴드 (Fig.1의 B)를 나타내나 SDS 전기영동에 의해서는 Fig.1의 A와 같이 분자량 5만2천의 주밴드 외에 4만천에서 2만3천 사이의 5~6의 소량의 부밴드를 나타냈다. 그러나 현재까지 고구마 β -subunit 넷으로 형성된 tetramer⁹⁾로서 알려져 왔기 때문에 이들 성분들이 불순물일 가능성이 있기 때문에 그를 제거하기 위해 다각적인 정제방법을 동원하였다.

겔여과 칼럼으로 정제효소를 HPLC분석한 결과 Fig.2와 같이 단일 피크를 나타내어 균일한 것으로 나타났다. 이외에 Sephadex G-200과 Biogel A-0.5M 및 Sepharose 4B에 의한 결과¹⁵⁾에 의해서도 SDS 전기영동상의 부밴드는 제거되지 않았다.

DEAE Sephadex A-50을 사용한 이온교환 크로마토그래피 결과, Fig.3과 같이 단일 피크를 나타냈으나 역시 SDS 전기영동상의 부밴드는 제거되지 않았다.

Hydroxyapatite 칼럼을 사용한 크로마토그래피 결과 (Fig.4)에서도 본효소는 단일 피크를 나타냈고, SDS 전기영동상의 부밴드는 제거되지 않았다.

등전점 전기영동을 통하여 본효소의 등전점을 분석한 결과 pH4.55를 나타냈다. 이는 pH4.75로

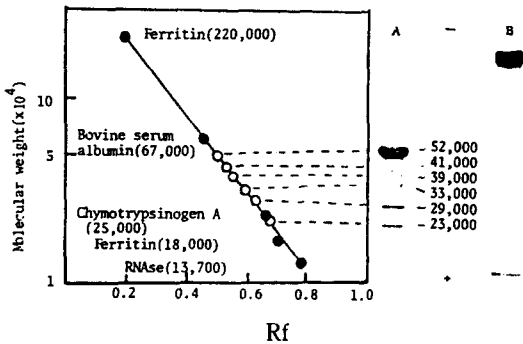


Fig.1 A, SDS Electrophoretal Patterns of Sweet Potato β -Amylase after treated with SDS(1%) and 2-ME(5%) at 100°C 2min. B, Ordinary Electrophoresis.

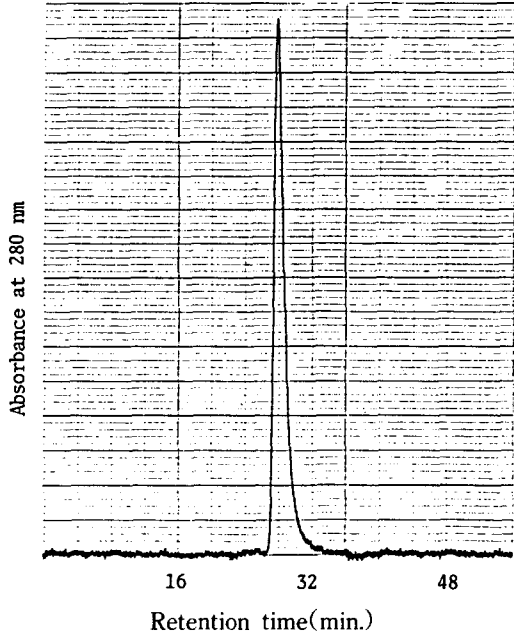


Fig.2 HPLC of sweet potato β -amylase on a column of TSK gel SW 3000
Column size ; 0.75×30cm
Flow rate ; 0.3ml/min.
Elution buffer : 0.1M K-phosphate buffer(pH 6.8)

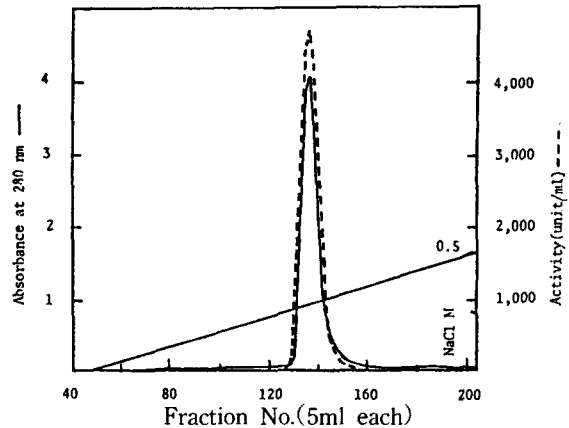


Fig.3 Ion Exchange Chromatography of Sweet Potato β -Amylase on a column of DEAE-Sephadex A-50 Colum(2.5×72cm) was equilibrated by 0.01M Tris-HCl buffer(pH6.8) and elution was carried out by linear gradient of NaCl from 0M to 0.5M.

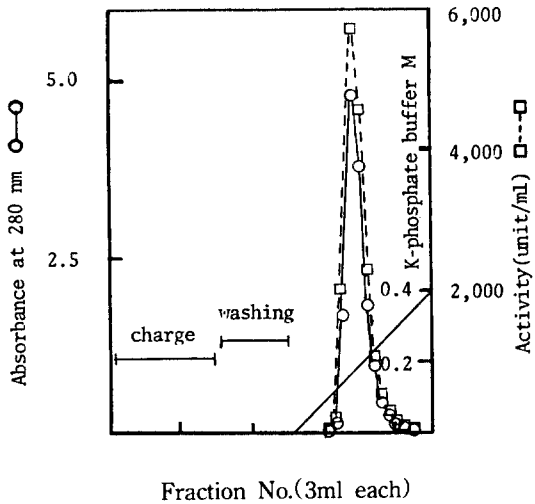


Fig.4 Adsorption and Desorption of Sweet Potato β -Amylase on a Column of Hydroxyapatite Column(1.2 \times 7.2cm) was equilibrated with 0.01M K-phosphate buffer(pH6.8) and elution was carried out by linear gradient of K-phosphate buffer from 0.01M to 0.4M

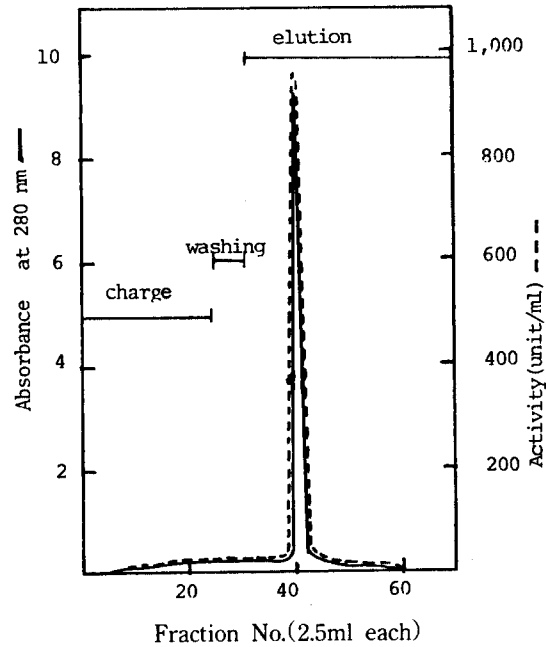


Fig.6 Affinity Chromatography of Sweet Potato β -amylase on Epoxyactivated Sepharose 6 B Coupled with α -Cyclodextrin Column size was, 0.9 \times 18cm. The enzyme used 20mg, Buffer used, 0.03M acetate buffer(pH4.8). The enzyme elution ; 1% α -cyclodextrin.

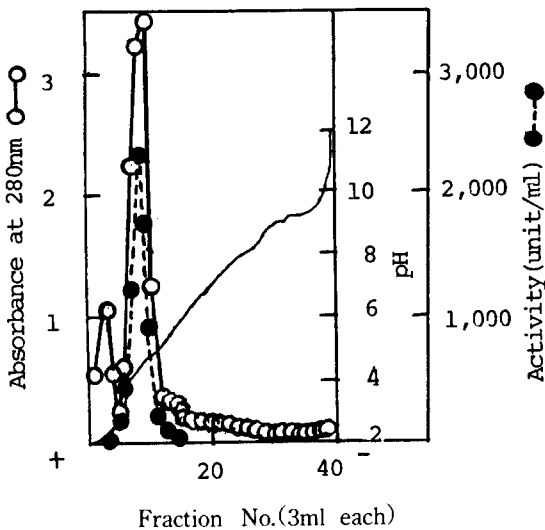


Fig.5 Isoelectrofocusing of Sweet Potato β -Amylase Column, 110ml; ampholyte used, pH3.5-10.0; density gradient formed, 50% sucrose; enzyme applied 3.8ml.

보고된 결과¹¹⁾와 약간의 차이를 나타낸다. 그러나 이에 의해서도 SDS 전기영동상의 부밴드는 제거되지 않았다 (Fig.5).

α -Cyclodextrin 으로 커플링시킨 Epoxyactivated Sepharose 6B 칼럼을 사용 affinity 크로마토그래피한 결과 Fig.6과 같은 형태를 나타냈다. 이 경우도 SDS 전기영동상의 부밴드는 제거되지 않았다.

본효소의 재결정화 결과, Fig.7 과 같이 뚜렷한 직사각형을 나타냈다. 이 결과는 전보⁶⁾와 마찬가지로 전보의 경우는 직사각형을 이루지 못한 것들도 많았으나 본결과의 경우 모두 직사각형을 형성하였다. 이 경우도 마찬가지로 SDS 전기영동 결과, 부성분들은 제거되지 않았다.

이상의 결과들은 SDS 전기영동상의 부성분들을 불순물로 판단하기 어렵게 만들고 있다.

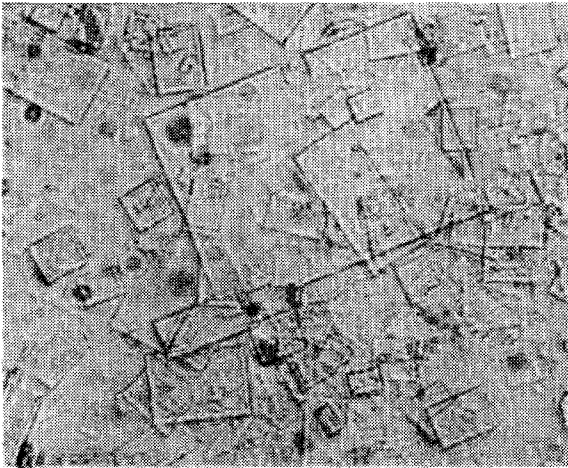


Fig.7 Crystalline Sweet Potato β -Amylase

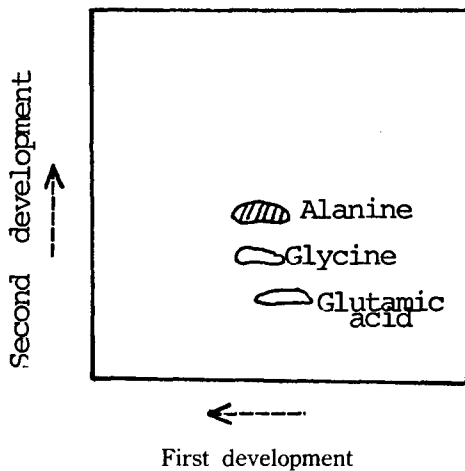


Fig.8 Dansylchloride Identification of N-terminal Amino Acid of Sweet Potato β -amyase

그러나 SDS 전기영동 결과만으로 그들 성분을 판단하기는 어렵기 때문에 DNS방법으로 본효소의 N말단을 조사한 결과 Fig.8과 같이 주잔기로서 alanine이 검출된 외에 소량의 glycine과 glutamic acid가 검출되었다. 현재까지 고구마 β -amylase의 N-말단은 alanine만으로 보고¹²⁾되었기 때문에 그들 결과는 다시 검토해야 할 것으로 보인다. 본 결과에서 나타난 glycine 과 glutamic acid는 SDS 전기영동상의 소량의 부성분에 의한 것으로 보인다.

다. 그러나 DNS 방법으로는 그들 N말단의 정량이 불가능하기 때문에 DNP 방법으로 정량한 결과 glycine 은 1.8mole% glutamic acid는 1.1mole%에 불과하였다.

고 찰

이상 살펴 본 바와 같이 2회의 아세톤 분획과 Sephadex G-200 겔 크로마토그래피, DEAE Sephadex A-50 이온교환 크로마토그래피 및 2회의 결정화를 통해 정제한 고구마 β -아밀라제를 사용하여 검토한 결과, ordinary 전기영동으로는 균일한 단일 밴드를 나타내나 SDS 전기영동으로는 주밴드 외에 그보다 적은 분자량의 5~6의 소량의 부밴드를 나타냈다. 이들 부밴드의 성분은 재결정화, 분자체 크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피, 친화 크로마토그래피, 물리적 흡착력에 의한 크로마토그래피 및 등전점 전기영동 등의 제정제 방법에 의해서도 제거되지 않았다. 그러나 지금까지 그에 대한 보고가 전혀 발견되지 않고 있는 것은 소량이기 때문에 발견하기 어려웠고, 발견하였어도 황산암모늄¹³⁾이나 아세톤분획¹⁴⁾으로 정제·결정화한 효소를 사용하고 있는 경우가 대부분이기 때문에 불순물로 생각하여 무시해 온 데 원인이 있을 것으로 생각된다.

그러나 상기의 여러 제정제 방법에 의해서도 제거되지 않는 것은 subunit로서의 가능성을 시사하며, main subunit를 연결하는 고리의 역할을 담당하고 있을 가능성이 있기 때문에 그를 확인하고자 N말단 아미노산을 정량하여 main subunit와의 mole비를 정량한 바, glycine이 1.79% mole, glutamic acid가 1.15% mole을 나타냈다. 이 결과는 그들 성분이 subunit를 보기에는 적은 양이다.

만약 불순물일 경우 main subunit 넷으로 형성되는 β -amylase 분자의 안쪽에 끼어들어 매몰된 상태로 존재하고 있는 경우, 제거되기 어려울 여지도 있다.

그러나 이상의 결과만으로는 불순물로도, subunit로도 판단하기 어렵기 때문에 여러 시약으로 su-

bunit를 개열, 그를 노출내지 분리하기 위해 이후의 실험을 진행시키고 있다. 이 문제가 해결되지 않는 한, 현재 보고되어 있는 전아미노산 배열 결정 결과⁸⁾(Toda 1988)는 의미를 상실할 여지가 많다.

요 약

2회의 아세톤 분획과 겔여과, 이온교환 크로마토그래피후, 2회의 결정화로 정제한 고구마 β -아밀라제는 Ordinary 전기영동상으로는 단일 밴드를 나타내나 SDS 전기영동으로는 분자량 52,000의 주밴드 외에 그보다 분자량이 적은 5~6의 소량의 부밴드들을 나타내며, 이들 부밴드들은 겔여과, 이온교환 크로마토그래피, affinity 크로마토그래피, hydroxyapatite 크로마토그래피, 등전점 전기영동 등의 여러 정제 방법에 의해서도 제거되지 않았다.

그러나 N말단 아미노산은 주성분으로서 alanine을 나타내는 외에 소량의 glycine과 glutamic acid가 검출되었다. 이들 결과로부터 SDS 전기영동상의 소량의 부밴드들은 subunit로서의 가능성이 있는 것으로 보인다.

참 고 문 헌

- Higashihara, M. and Okada, S. ; Studies of β -Amylase of *Bacillus megaterium* Strain No 32, *Agric. Biol. Chem.*, **35**(5), 1023-1027(1974)
- Shinke, R., Kunimi, Y. and Nishira, H. J. ; Isolation and Characterization of β -Amylase Producing Microorganisms, *J. Ferment. Tech.*, **53**, 687-692(1975)
- Spradlin, J. and Thoma, J. A. ; β -Amylase Thiol Groups, *J. Biol. Chem.*, **245**(1), 117-127(1970)
- Mikami, B., Aibara, S. and Morita, Y. ; Chemical modification of Sulfhydryl Groups in Soybean β -Amylase, *J. Biochem.*, **88**, 103-111(1980)
- Aibara, S., Yamashida, H. and Morata, Y. ; Molecular Shape and Packing in Crystals of Soybean β -Amylase, *Agric. Biol. Chem.*, **48**(6), 1575-1579(1984)
- 김준평, 안용근, 심우만 ; 고구마 β -아밀라제 정제에 관한 연구, 한국생화학회지, **18**(3), 290-296(1985)
- 안용근 ; 고구마 β -아밀라제 정제 및 결정화 방법, 한국특허공보 1332호(1987-1673)
- 戸田弘子, 崎山文夫, 金後平 ; β -一次構造解析, 日本農藝化學會誌 **62**, 342(1988)
- Takada, Y. ; Sweet Potato β -Amylase in *Handbook of Amylases and Related Enzymes*(the Amylase Research Society of Japan eds.) 89-91(1988), Pergamon Press, Oxford
- Vretbald, P. ; Immobilization of Ligands for Biospecific Affinity Chromatography via their Hydroxyl Groups. The Cydohexaamylose- β -Amylase, *J. Biol. Chem.*, **187**, 213-219(1950)
- Englard, S. and Singer, T. P. ; Phycochemical Studies on β -Amylase, *J. Biol. Chem.*, **187**, 213-219(1950)
- 심우만 ; 고구마 β -Amylase N-말단부근의 아미노산 배열에 관한 연구, 중앙대학교 박사학위논문, 1984
- Balls, A. K., Walden, M. K. and Thompson, R. R. ; A Crystalline β -Amylase from Sweet Potatoes, *J. Biol. Chem.*, **173**, 9-19(1948)
- Takeda, Y. and Hizukuri, S. ; Improved Method for Crystallization of Sweet Potato β -Amylase *Biochim. Biophys. Acta.* **185**, 469-471(1969)
- 安龍根 ; β -amylase 一部理化學的特性 isozyme 分離, 新韓學報, **22**, 273-287(1986)