

효소법에 의한 NAD^+ 의 β -casein에의 고정화

윤 세 역 · 박 선 영 · 김 명 곤 · 김 강 현
전북대학교 농과대학 식품공학과

Transglutaminase-Catalysed Formation of Coenzymatically Active Immobilized NAD^+

Se Eok Yun, Sun Young Park, Myung Kon Kim and Kang Hyun Kim

Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Chonbuk National University, Chonju 560-756, Korea.

ABSTRACT

NAD^+ analogs, 8-(6-aminohexyl) aminonicotinamide adenine dinucleotide and N^6 -[(6-aminohexyl)-carbamoylmethyl]- NAD^+ , were immobilized on bovine caseins by the action of transglutaminase. It appears that NAD^+ analogs bind with α_{S1} - and β -caseins through formation of the γ -glutamylamine bond between the amino groups attached to the hexyl chains in NAD^+ analogs and the glutamyl residues in caseins. The NAD^+ analogs immobilized on the caseins were enzymatically reducible by alcohol dehydrogenase. β -Casein was more useful carrier than the α_{S1} -casein and 8-substituted NAD^+ analog was more effective than N^6 -substituted one in immobilization. Michaelis constant of 8-substituted NAD^+ analog immobilized on β -casein in alcohol dehydrogenase reaction was similar to that of free form of NAD^+ and that of NAD^+ analog. Immobilized NAD^+ was much more stable at alkaline pH than free NAD^+ and its analog while maximum velocity was reduced to 31% of the free NAD^+ analog. The coenzyme casein conjugated was recovered almost completely in casein precipitated by calcium.

서 론

최근 adenine nucleotide coenzyme (NAD^+ , $NADP^+$ 및 ATP)을 고분자화하여 보효소재생계 bioreactor system (Coenzyme-Regenerating Bioreactor System)을 구축하거나(1~3) 이들 coenzyme을 필요로하는 효소의 affinity chromatography에 이용하기위한 연구(4,5)가 활발히 행하여지고 있다.

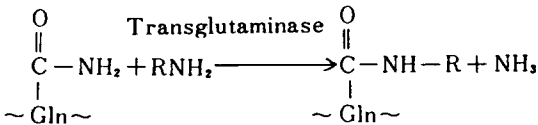
현재까지 알려진 성질기지의 효소는 2,000종이 넘으나 20여종의 효소만이 공업적 생산에 이용되고 있는데 많은 효소공정이 산업화되지 못하고 있는 것은 해결되어야 할 몇가지 문제점때문이다. 첫째로 효소는 비교적 불안정하여 장기간의 사용에 부적절하기 때문에 이의 안정성을 높이기 위하여 효소 또는 미생물을 고정화하여 사용하는 방법이 개발되고 있으나 아직 미흡한 상태이다. 둘째로 전효소의 약 40%가 보효소를 필요로하므로, 이러한 효소반응을 이용할 경우 bioreactor내에 보효소를 계속적

으로 공급해 주어야 하는데 가격이 비싸므로(\$ 1,000/mol NAD , \$ 800/mol ATP) 재생하여 사용하지 않으면 안된다. 그러나 재생효율이 낮으므로 현실적으로 이러한 효소가 이용되기는 어려운 실정이다. 보효소의 경제적 사용이라는 관점에서 또 한가지 해결하여야 할 문제는 보효소는 수용성저분자(분자량 500~800)이므로 효소처럼 포괄법 등과 같은 간단한 방법으로는 잘 고정화되지 않으며 고정화되지 않은 상태로는 연속반응중에 생성물과 함께 유출되어버리므로 어떠한 형태로든 적절히 고분자화하여 bioreactor내에 머물러 있으면서 반응에 계속 사용될 수 있도록 하지않으면 안된다. 효소나 미생물 균체에 대하여는 이미 오래전부터 연구가 되어오고 있어 고정화 방법이 어느정도 확립되어있으나 보효소는 이와는 달리 쉽게 불활성화되는 등 간단한 방법으로는 잘 고정화되지 않는다.

보효소를 고분자화하는 방법은 첫째, 보효소 분자와 담체를 연결하기 위한 spacer를 보효소에 도입한 후(유

도체화), spacer 말단에 위치하는 적당한 관능기 (amino 기 또는 carboxyl 기)를 고분자담체에 가교시키는 방법. 둘째, 보호소에 도입한 spacer 말단에 acryloyl 기 등 중합성 관능기를 갖도록 한 후(유도체)에 이것을 다른 중합성단량체들과 중합시키는 방법. 셋째, 고분자담체에 epoxy 기 등과 같은 활성관능기를 도입시켜 놓고 여기에 보호소를 직접 연결시키거나 가교제를 써서 결합시키는 방법 등이 있다. Adenine nucleotide 에 속하는 보호소인 경우 주로 adenine 핵의 N¹, N⁶ 및 C⁸ site 가 spacer 의 결합장소로 선택되고 있으며, adenine 핵 이외에는 ribose 의 수산기를 결합위치로 하는 방법이 있으나 adenine 핵의 N⁶ site 와 C⁸ site 가 가장 일반적으로 선택되고 있다. 고분자담체로서는 dextran, sepharose, polyethyleneimine, polylysine, polyethyleneglycol 등이 쓰여지고 있는데, 이들 고분자담체에의 고정화는 BrCN 에 의한 황산화법(6-9), carbodiimide 에 의한 황산화법(10-12)등 화학적 방법에 의하여 행하여지고 있다.

본 연구에 있어서는 새로운 고분자담체를 개발하고자 β-casein 에 주목하였으며, 간단한 보호소의 고정화방법을 확립하고자 하였다. Transglutaminase 는 peptide 내 glutamine 잔기의 γ-carboxamide group 을 acyl donor 로 하고, lysine 잔기의 ε-amine group 을 acyl acceptor 로 하는 acyl 전이반응을 촉매하는 효소로서, acyl acceptor 가 일차 amine 인 경우에도 acyl 전이반응을 촉매한다(13).



때문에 β-casein 은 1분자중에 glutamine 잔기를 21개 함유하는 수용성 고분자물질로서 transglutaminase 의 촉매작용에 의해 amine 기와 γ-glutamylamine bond 를 형성하여 결합할 것으로 예상되었다. 또한 α_{s1}-casein 에 대하여도 검토하였다.

재료 및 방법

Caseins

신선한 우유를 탈지시킨 후 Hipp 들(14,15)의 방법에 의해 β-casein 과 α_{s1}-casein 혼합물을 얻었으며, 이 혼합물을 Tsugo 들(16)의 방법에 따라 두 성분으로 분리 정제하였다. β-casein 의 분자량을 24,000으로, α_{s1}-casein 을 분자량 23,500으로하여 계산하였다.

효소 및 시약

Transglutaminase (Glutaminyl - peptide γ - glutamyl

transferase : EC 2.3.2.13). Alcohol dehydrogenase (yeast) 등 효소와, N⁶-[(6-aminohexyl) carbamoylmethyl]-NAD⁺ (N⁶-NAD⁺ analog 로 약칭)와 8-(6-aminohexyl) aminonicotinamide adenine dinucleotide (C⁸-NAD⁺ analog 로 약칭)등 coenzyme analog 들은 Sigma 에서 구입하였다.

NAD⁺ analog 의 고정화

100mM Tris - HCl buffer (pH 7.5), 5mM CaCl₂, 10mM dithiothreitol, 1mM NAD⁺ 또는 NAD⁺ analog, 1mM NaN₃, 1.2mg/ml casein (β- 또는 α_{s1}-)을 함유하는 용액 (total volume 2.5ml)에 183 μg/ml 의 transglutaminase (2.5 unit/ml)를 가하여 37°C에서 2시간 incubation 하여 반응시킨 후, 반응액에 EDTA 를 최종농도가 36mM 이 되도록 가하여 반응을 종료시키고 유리의 NAD⁺ 또는 NAD⁺ analog 를 제거하기 위하여 10mM imidazole buffer (pH 6.0, 70mM KCl 함유)에서 투석시켰다. Control 은 36mM EDTA 를 처음부터 가하여 반응시켰으며 동일한 방법으로 투석하였다 (Fig. 1).

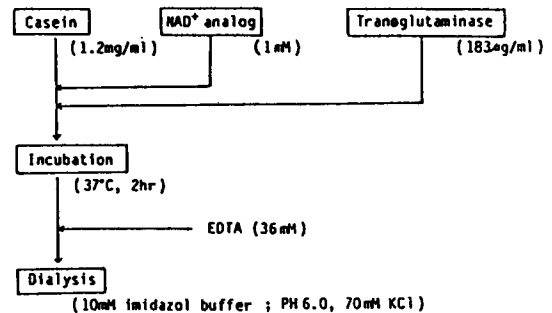


Fig. 1. Immobilization method of the NAD⁺ analog to casein.

고정화 NAD⁺의 측정

Casein 에 결합된 NAD⁺의 mole 수를 결정하기 위하여 Bartlett (17)의 방법에 따라 유기인산을 측정하였다. 결합된 NAD⁺는 transglutaminase 반응시킨 casein 중의 유기인산함량으로부터 control 중의 유기인산함량을 빼므로써 계산하였다. Control 중의 인산함량은 casein 의 인산함량(5 per mole of β-casein and 8 per mole of α_{s1}-casein)과 거의 동일하였다.

고정화 NAD⁺의 보호소 활성

NAD⁺, NAD⁺ analog 및 고정화 NAD⁺의 보호소 활성을 alcohol dehydrogenase 를 사용하여 측정하였

다. 70mM Tris - HCl buffer (pH 8.8), 33mM ethanol, 70mM semicarbazide, 1mM NAD⁺ 또는 NAD⁺ analog 또는 고정화 NAD⁺를 함유하는 용액 (total volume 2.5ml)에 alcohol dehydrogenase (0.1unit/ml)를 가하여 25°C에서 30분간 반응시킨 후 340nm의 spectrophotometer (SECIL SE 292)에서의 흡광도 증가량을 측정하였다.

고정화 NAD⁺의 Ca⁺⁺에의 침전성과 침전된 고정화 NAD⁺의 보호소 활성

고분자담체 casein의 Ca⁺⁺에의 침전성을 이용하여 고정화 NAD⁺의 재이용가능성을 검토하였다. 1mM 고정화 NAD⁺(casein의 양으로써 1.2mg) 용액에 1M calcium chloride를 최종농도가 35mM이 되도록 가하여 37°C에서 15분간 incubation 한 후 750×g에서 1분간 원심분리한 후 침전물을 1ml의 50mM EDTA에 용해시킨 후 protein 함량과 용액의 보호소활성을 측정하였다. 고정화 NAD⁺, 70mM Tris - HCl buffer (pH 8.8), 33mM ethanol, 70mM semicarbazide, alcohol dehydrogenase (0.1 unit/ml)를 함유하는 용액 (total volume 2.5ml)을 25°C에서 30분간 반응시킨 후 340nm에서의 흡광도증가량을 측정하므로써 고정화 NAD⁺의 환원성을 확인하였다. 상기의 용액에 1M calcium chloride를 최종농도가 35mM이 되도록 재차 가하여 37°C에서 15분간 incubation 한 후 750×g에서 1분간 원심분리하여 침전물을 얻은 후 1ml의 50mM EDTA에 녹여 protein 함량과 용액의 효소적산화성을 측정하였다. 고정화 NADH를 70mM Tris - HCl buffer (pH 8.8), 33mM acetaldehyde, alcohol dehydrogenase (0.1 unit/ml)를 함유하는 용액 (total volume 2.5ml)에 넣어 25°C에서 30분간 반응시킨 후 340nm에서의 흡광도감소량을 측정하므로써 산화를 확인하였다.

단백질 정량

단백질은 Lowry 들(18)의 방법에 따라 정량하였다.

결과 및 고찰

NAD⁺ analog의 casein에의 고정화

Straight aliphatic carbon chain에 존재하는 amino group은 transglutaminase의 반응에 있어서 acyl acceptor로서 반응할 것이므로(13), adenine 핵의 C⁸ site에 치환된 H₂N-(CH₂)₆-NH-terminal group을 가진 NAD⁺ analog (C⁸-NAD⁺ analog)와 adenine 핵의 exocyclic N⁶ site에 치환된 H₂N-(CH₂)₆-NH-CHO-CH₂-terminal group을 가진 NAD⁺ analog

(N⁶-NAD⁺ analog)를 casein의 glutaminy residue의 α-carboxamide group에 결합시키고저 하였다.

고정화는 실험방법 및 재료에서 언급한 바와같은 방법 (Fig. 1)에 따라 행하였으며, 특히 NaN₃가 첨가되었을 때 비로소 고정화되었는데, 이는 NaN₃의 안정화 작용으로 고정화반응중에 NAD⁺가 실패되는 것이 저지되기 때문인 것으로 보인다. Fig. 2는 고정화반응 후 유리

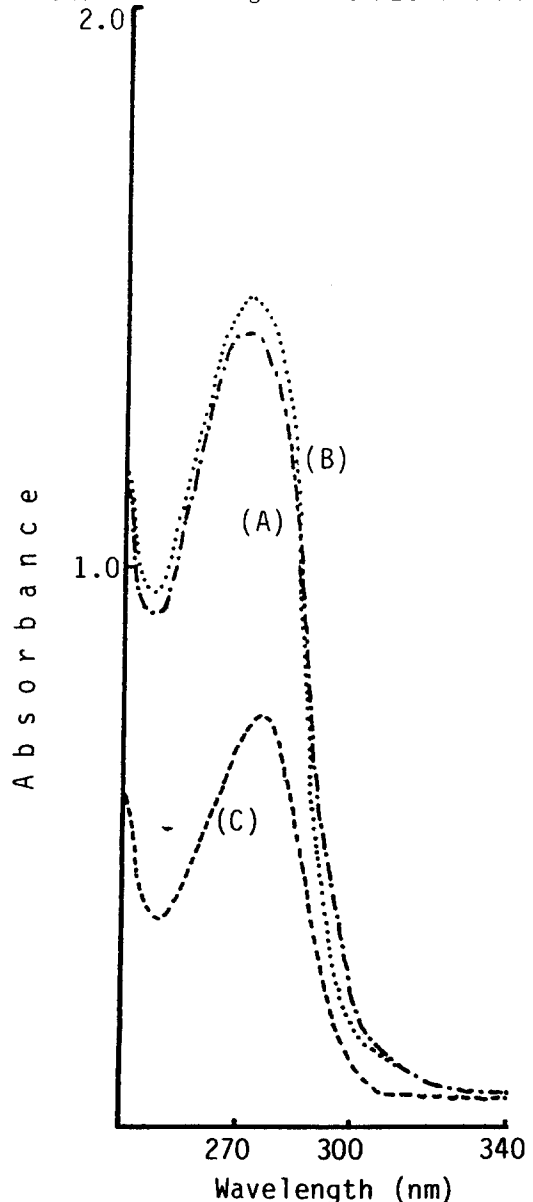


Fig. 2. Absorption spectra of β-casein-bound NAD⁺ (A), β-casein and NAD⁺ mixture (B), and β-casein (C).

NAD⁺ analog 를 충분히 투석제거하고 UV 파장에서의 absorbance 를 측정 한 결과이다. NAD⁺ analog 함유시료, 즉 NAD⁺ 고정화반응액(A in Fig. 2)은 270nm 부근에서의 흡광도가 β -casein (C in Fig. 2)에 비하여 훨씬 높은 동시에 β -casein 과 NAD⁺ analog 혼합액(B in Fig. 2)과 비슷하였던 것으로 보아 NAD⁺ analog 는 β -casein 에 어느정도 결합한 것으로 판단되었다. 이러한 경향은 N⁶-NAD⁺ analog 를 반응시켰을 때도 마찬가지였으며, 고분자담체로서 α_{s1} -casein 을 반응시켰을 경우에도 비슷하였다. 반응결과 NAD⁺ analog 들이 casein 에 어느정도 고정화 되었는지와 고정화에 의하여 NAD⁺의 보효소활성에 변화가 있는지의 여부를 검토하기 위하여 고정화 NAD⁺의 보효소활성을 측정하였다. 모든 NAD⁺ analog 들은 고정화한 후에도 보효소활성을 유지하고 있었으며 α_{s1} -casein 에 결합된 NAD⁺보다는 β -casein 에 결합된 NAD⁺의 보효소활성이 높았는데 이는 α_{s1} -casein 보다 β -casein 에 glutamyl residues 가 많은 사실에 기인한 것으로 보인다. 또한 Bartlett (9)의 방법에 따른 유기인산의 정량결과(Table 1)에 있어서도 α_{s1} -casein 에 보다는 β -casein 에 보다 많이 결합되고 있는 것이 확인되었다.

이상의 결과에서와 같이 NAD⁺ analog 는 α_{s1} -casein 에 보다는 glutamine 잔기가 더 많은 β -casein (1 분자당 21개)에 더 많이 결합되는 것으로 보아 glutamine 잔기 이웃의 amino acid sequence 에 크게 영향을 받지않는 것 같으므로 β -casein 보다 더욱 많은 glutamine 잔기를 갖는 고분자 화합물에 대하여 고정화시킬 경우 고정화수율은 커질 것으로 기대되나 좀 더 연구해 볼 과제이다.

고정화 NAD⁺는 Fig. 3에서와 같은 구조를 가질 것으로 여겨지는데 특히 C⁸ site 치환 analog 가 N⁶ site 치환 analog 에 비하여 고정화수율이 높은 결과를 보였는데 (Table 1), 후자의 경우 spacer 의 alkylcarbamoyl

Table 1. Coenzymatically active NAD⁺ immobilized on caseins.

Caseins \ Analog	N ⁶ -NAD ⁺	C ⁸ -NAD ⁺
β -Casein	2.1	2.8
α_{s1} -Casein	1.7	1.9

The number are the moles of adenine nucleotide coenzymes per mole of casein.

group 과 casein 의 carboxamide group 간에 electrostatic repulsion 이 일어나기 때문인 것으로 여겨진다.

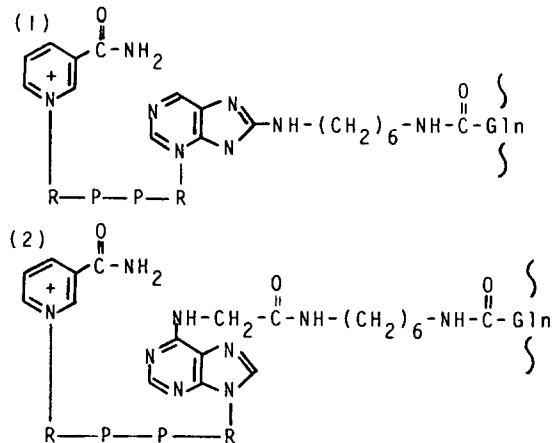


Fig. 3. The probable structures of the casein-bound NAD⁺ derivatives.

- (1) NAD⁺-C⁸-NH(CH₂)₆NH₂ ~ casein
 (2) NAD⁺-N⁶-CH₂CONH(CH₂)₆NH₂ ~ casein

이상의 결과에서 고정화담체로서는 α_{s1} -casein 에 비하여 β -casein 이 우수하며, adenine 핵의 C⁸ site 에 H₂N-(CH₂)₆-NH-terminal group 을 결합하고 있는 NAD⁺ analog 가 보다 유리할 것으로 판명되어, C⁸-NAD⁺ analog 의 β -casein 에의 고정화의 반응최적 조건을 검토하였다. 반응에 사용되는 β -casein 의 농도는 Fig. 4와 Fig. 5에서와 같이 1.2mg/ml (0.05mM 에 상당)에서 충분하였으며 2시간의 반응으로 고정화가 완료되었다.

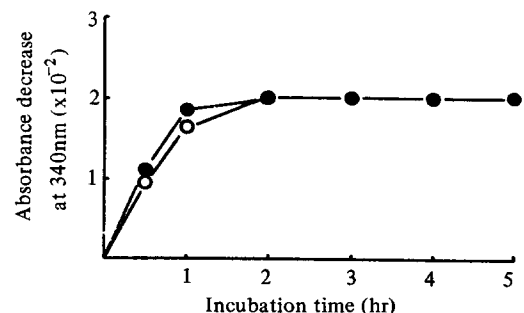


Fig. 4. Time-courses of immobilization of C⁸-NAD⁺ analog on β -casein.

The concentrations of β -casein in the transglutaminase reactions were 1.2mg/ml (○) and 4mg/ml (●).

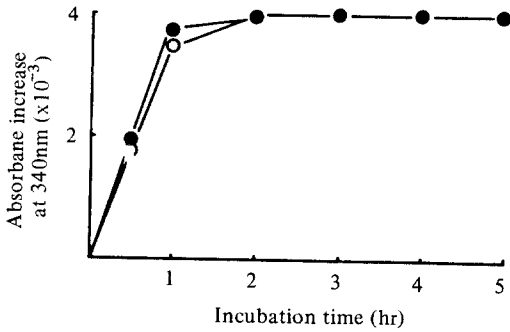


Fig. 5. Time-course of immobilization of C⁸-NAD⁺ analog on β-casein.
The concentration of β-casein in the transglutaminase reactions were 1.2mg/ml (○) and 4mg/ml (●).

고정화 NAD⁺의 성질

Table 2는 NAD⁺의 kinetic parameter 들로서 Lineweaver - Burk plot에 의하여 구하였다. NAD⁺ analog의 alcohol dehydrogenase에 대한 affinity는 casein에의 고정화로 크게 변화하지는 않았으나 maximum rate는 크게 감소되었다. Fig. 6에 NAD⁺ analog의 고정화가 stability에 미치는 영향을 나타내었다. 유리형 NAD⁺, NAD⁺ analog 및 고정화 NAD⁺를 37°C의 buffer 용액 (pH 8.8)에서 incubation 시켰을 때 고정화 NAD⁺는 유리형 NAD⁺나 NAD⁺ analog보다 안정하였다. 즉 NAD⁺는 β-casein에 고정화되므로써 안정성이 증대되었는데 특히 alkaline pH에서의 안정성 증대는, NAD⁺가 alkaline pH에서 불안정한 반면에 NAD⁺를 필요로하는 dehydrogenase의 기질산화반응의 속도는 이러한 pH에서 증가하는 사실에 비추어 매우 유리한 현상이다.

Table 2. Coenzymatic properties of C⁸-NAD⁺ analog immobilized on β-casein.

	Km (mM)	V max (%)
Free NAD ⁺	1.7	120
Free NAD ⁺ analog	1.7	100
Immobilized NAD ⁺	2.1	31

The reaction rates of coenzymes were measured by using alcohol dehydrogenase for NAD⁺. Kinetic parameters were obtained from Lineweaver-Burk plots.

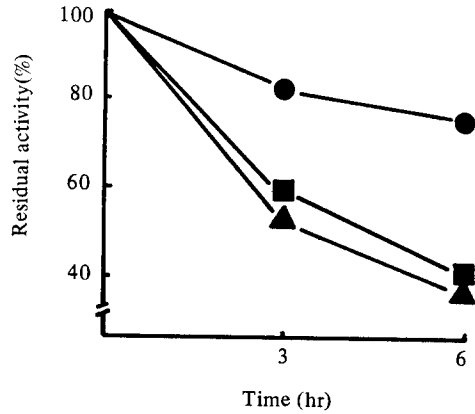


Fig. 6. Stability of C⁸-NAD⁺ analog immobilized on β-casein.

Free NAD⁺ (▲), free NAD analog (■), and immobilized NAD⁺ (●) were incubated in 70mM Tris-HCl buffer, pH 8.8. During incubation at 37°C, aliquots were taken out to measure the coenzymatic activity with alcohol dehydrogenase.

고정화 NAD⁺의 calcium에 의한 침전

Casein은 calcium에 의해 쉽게 침전되는 물질로서 재료와 방법에서 언급한 바와 같이 transglutaminase 반응 후 투석시킨, NAD⁺ analog가 함유된 β-casein 용액에 CaCl₂를 가하여 침전시켰다. 침전물은 50mM EDTA 용액에 용해시킨 후 Lowry법에 의하여 단백질을 정량함과 동시에 alcohol dehydrogenase를 사용하여 효소적 환원성을 측정한 결과 β-casein에 고정화된 NAD⁺ analog는 거의 완전히 EDTA 용액에 용해된 fraction에 회수되었다. 더욱이 환원형 고정화 NADH의 갈숨침전물의 보호소활성에 있어서도 alcohol dehydrogenase를 acetaldehyde와 incubation 시켰을 때 NADH형이 NAD⁺형으로 전환되었다. 활성은 최초의 고정화 NAD⁺의 보호소 활성의 약 80%이었다.

이상에서와 같이 β-casein에서 고정화 NAD⁺는 NAD⁺형(산화형)과 NADH형(환원형)으로 상호전환되어 재생되었으며 따라서 NAD⁺재생제 bioreactor에의 이용 가능성을 보여주었다.

요 약

보호소고분자화를 위한 담체로서 β-casein에 NAD⁺를 효소법으로 고정화하였다. β-Casein은 분자내에

21개의 glutamine 잔기를 함유하는 수용성고분자물질로서 transglutaminase 촉매작용에 의해 NAD⁺ analog의 amino기와 γ -glutamylamine bond를 형성하여 결합하였다. β -Casein은 α_{S1} -casein(1분자내에 15개의 glutamine 잔기를 함유)에 비하여 효과적인 고정화담체이였으며 8-(6-amino hexyl) aminonicotinamide adenine dinucleotide는 N⁶-[(6-aminohexyl)-carbamoylmethyl]-NAD⁺에 비하여 고정화수율이 높았다. 고정화에 있어 NaN₃의 첨가는 필수적이였다. 고정화 NAD⁺의 Km치는 NAD⁺ 또는 NAD⁺ analog와 비슷하였으나 max. rate는 고정화하므로써 31% 감소되였다. 그러나 고정화하므로써 NAD⁺의 alkaline pH에서의 안정성은 증대되었으며, 고정화 보효소를 칼슘침전하여 분리회수하였을 경우에도 보효소 활성을 유지, NAD⁺형(산화형)과 NADH형(환원형)으로 상호전환되므로써 재생되었다.

감 사

본 연구는 한국과학재단의 목적기초연구비로 수행하였으며, 이에 깊은 감사를 드립니다.

참고문헌

1. C. Wandrey, R. Wichman, and A. -S. Jandel(1982), *Enzyme Engineering*, **6**, 61.
2. T. Eguchi, T. Iizuka, T. Kagotani, J. Lee, I. Urabe, and H. Okada(1986), *Eur. J. Biochem.*, **155**, 415.
3. A. Nakamura, H. Minami, I. Urabe, and H. Okada(1988), *J. Ferment. Technol.*, **66**(3), 267.
4. M. Lindberg and K. Mosbach(1975), *Eur. J. Biochem.*, **53**, 481.
5. Y. Yamazaki, H. Maeda, and H. Suzuki(1977), *Eur. J. Biochem.*, **77**, 511.
6. S. Furusaki, I. Matsuura, and S.-I. Nakazato(1982), *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 1211.
7. H. -L. Schmidt and G. Grenner(1976), *Eur. J. Biochem.*, **67**, 295.
8. M. Lindberg, P. -O. Larsson, and K. Mosbach(1973), *Eur. J. Biochem.*, **40**, 187.
9. C. -Y. Lee, D. A. Lappi, B. Wermuth, J. Everse, and N. O. Kaplan(1974), *Arch. Biochem. Biophys.*, **163**, 561.
10. J. R. Wykes, P. Dunnill, and M. D. Lilly(1975), *Biotechnol. Bioeng.*, **17**, 51.
11. P. Zappelli, A. Rossodivita, G. Prosperi, R. Rappa, and L. Re(1975), *Eur. J. Biochem.*, **54**, 475.
12. P. Zappelli, R. Rappa, A. Rossodivita, and L. Re(1977), *Eur. J. Biochem.*, **72**, 309.
13. K. Ikura, T. Kometani, M. Yoshikawa, R. Sasaki, and H. Chiba(1980), *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 1567.
14. N. J. Hipp, M. L. Groves, J. H. Custer, and T. L. McMeekin(1950), *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 4928.
15. N. J. Hipp, M. L. Groves, J. H. Custer, and T. L. McMeekin(1952), *J. Dairy Sci.*, **35**, 272.
16. T. Tsugo and K. Yamauchi(1960), *Bull. Agric. Chem. Soc. Jpn.*, **24**, 96.
17. G. R. Bartlett(1959), *J. Biol. Chem.*, **234**, 466.
18. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall(1951), *J. Biol. Chem.*, **193**, 265.

(Received October 13, 1989)