

여러가지 형태에 따른 Alcohol-Oxidase의 특성 비교

이 명 숙

부산수산대학교 미생물학과

Comparison of the Characteristics of Alcohol-Oxidase by the Various Forms

Myung-Suk Lee

Dept. of Microbiology, National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea

Abstract

The properties of the alcohol-oxidase from yeasts assimilating of methanol(*Hansenula polymorpha* CBS 4732, *Pichia pastoris* CBS 2612 and *Candida boidinii* CBS 8106) as free(cellules, purified enzymes) and immobilized forms(immobilized cellules, immobilized enzymes) were investigated. Immobilization enhanced the activity and stability of alcohol-oxidase to a certain degree. The optimum temperature of the immobilized alcohol-oxidase was lower than those of the free forms. The pH/activity profiles of alcohol-oxidase did not change by immobilization, but changed by the microorganisms. When the immobilized cellules were stocked at 4° C in 10mM potassium phosphate buffer(pH 7.5 or 8.0), alcohol-oxidase was more stable than those were stocked in potassium phosphate buffer containing 0.65M sucrose. The immobilization modifies the conditions of oxidation on the various substrates. Alcohol-oxidase in immobilized forms showed a somewhat higher Km value for methanol than that in free ones.

Key words : alcohol-oxidase, immobilized enzymes, purified enzymes

서 론

Alcohol-oxidase[EC 1.1.3.13]은 1965년 *Basidiomycetes*에서 처음 분리 보고¹⁾된 이후 methanol자화성이 있는 효모에서도 생성된다고 알려져 있으며^{2,3)} 본 연구자 등도 효모내에서의 alcohol-oxidase생성능과 최적 생성조건을 알아보기 위하여 7종류의 효모를 대상으로 실험, 보고한 바 있다⁴⁻⁶⁾. 지금까지 본 효소에 관한 연구는 조효소나 정제효소를 대상으로 효소반응 특성이나 기질 특이성 등에 관하여 주로 행하여져 있는데 이들은 반응조건이나 기질과 반응 생성물의 농도에 의하여 도중에 실패되거나 변성될 우려가 많다⁷⁻⁹⁾. 그러나 고정화 효소는 안정성이 뛰어나며 생산, 조작 방법도 간단한 잇점이 있어¹⁰⁻¹⁴⁾ alcohol-oxidase를 산업적으로 이용하고자 할때는 다른 형태의 효소보다 유용할 것으로 사료된다. 그러나 고정화한 alcohol-oxidase의 성질과 반응 특성에 관하여서는 거의 연구되어 있지 않은 실정이다. 따라서 고정화 alcohol-oxidase의 반응조건을 최적화하고 효소의 안정성과 기질이용능을 다

른 형태의 alcohol-oxidase와 비교하기 위하여 균체, 고정화 균체, 정제 효소 그리고 고정화 효소의 반응 최적 온도와 pH, 효소의 안정성, 그리고 기질이용성을 실험하여 얻은 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

사용균주

본 연구자 등이 이미 사용한 3종류의 효모 7균주중⁴⁻⁶⁾ alcohol-oxidase생성능이 좋은 효모를 각 종류별로 한 균주씩 선택 사용하였다. 즉 *Hansenula polymorpha* CBS 4732, *Pichia pastoris* CBS 2612 그리고 *Candida boidinii* CBS 8106을 본 실험에 사용하였다.

배양방법

효모에 의한 효소의 생산은 2단계 배양법¹⁵⁾으로 행하였다. 즉 mineral salts medium에 1.0%의 glucose가 함유된 배지에서 정상기까지 배양후 이를 무균적으로 분

리하여 효소유도 배지(mineral salts medium에 1.0%의 methanol첨가)에서 일정시간 배양하였다. 균체배양과 효소 유도조건은 *H. polymorpha*는 각각 35°C, 24시간과 35°C, 30시간이었고 *P. pastoris*와 *C. boidinii*는 각각 30°C, 24시간과 30°C, 48시간이었다. 모든 배지의 pH는 7.5로 조정하여 500ml용 삼각 flask에 250ml씩 분취하여 250rpm의 진탕배양기(WTR, Infors)에서 실험하였다.

Alcohol-oxidase의 정제

전보의 방법^{4,9}에 따라 조제한 조효소액의 정제는 Couderc와 Baratti⁷에 의해 수정된 Tani 등¹⁵의 방법에 따랐다. 즉 40~85%의 ammonium sulfate분획(*Hansenula polymorpha* CBS 4732 ; 50 and 70%, *Pichia pastoris* CBS 2612 ; 40 and 60%, *Candida boidinii* CBS 8106 ; 40 and 85%)으로 침전 분리한 효소를 Sephadex G-200 column(2.6 × 24cm)에서 재정제하여 얻은 액을 정제효소로 사용하였다. 이때 column은 10mM 인산완충액(pH 7.5)을 3ml/hr로 증진시켰다. 이때 각 균체 20g을 사용한 경우 최종단계에서 얻은 정제효소는 *H. polymorpha*가 254mg, *P. pastoris*가 244mg, 그리고 *C. boidinii*가 209mg이었다.

Alcohol-oxidase와 균체 고정화

정제효소와 균체의 고정화는 glutaraldehyde와 serum bovine albumin을 사용한 방법¹⁶에 따랐다.

즉 serum bovine albumin 800mg, glutaraldehyde 100mg, sucrose 950mg, 그리고 균체(건조균체 1g) 혹은 정제효소(1000IU)를 혼합한 뒤 인산완충액(10mM, pH 7.5)으로 최종 농도가 12ml가 되도록 조정된 뒤 잘 혼합 교반한 다음 이 혼합액을 2시간동안 냉동하였다. 이를 4°C에서 4시간 완만하게 해동하면 스폰지 모양의 gel이 형성된다. 이 gel을 0.5mm 크기의 입자로 분쇄(Virtis)하여 millipore filtre (Type H.A., 0.45 μ m)로 여과한 다음 이를 인산완충액으로 3번정도 씻은 것을 고정화 효소(혹은 고정화 균체)로 사용하였다.

Alcohol-oxidase의 활성측정

Alcohol-oxidase의 활성은 효소반응에 의해 생성된 formaldehyde를 gas chromatography "Headspace" system으로 측정하였다. 즉 methanol 20mM, 준비된 효소(20IU), 그리고 인산완충액(10mM, pH 7.5)를 첨가하여 최종 용량이 5ml로 조정된 시험관을 30°C, 250 rpm의 진탕 배양기에서 30분 반응시켰다. 이 반응 액

을 gas chromatography "Headspace" system으로 분석하였고 이의 조건은 전보⁹와 동일하였다.

결과 및 고찰

온도의 영향

반응 온도에 따른 효소활성의 비교는 최적온도에서 30분 반응에 의해 생성된 formaldehyde의 양과 일정온도에서 생성된 formaldehyde량을 비교하여 상대활성으로 나타내었고 이의 결과를 Fig. 1에 나타내었으며 이를 상세히 비교하여 Table 1에 나타내었다.

Alcohol-oxidase의 반응최적온도는 생성균주와 효소의 형태에 따라 약간씩의 차이가 났다. 즉 균주에 따라서는

으로 높았으며, 효소형태에 따라서는 고정화한 효소의 반응최적온도가 약간 낮은 것으로 나타났다.

pH의 영향

반응 pH에 따른 효소활성은 최적온도에서 30분 반응후 생성된 formaldehyde를 측정하여 상대활성으로 비교하여 Fig. 2에 나타내었다.

반응 최적pH는 효소의 형태에 따라서는 별 차이가 없었고 생성균주에 따라 약간의 차이가 났다. 즉 *H. polymorpha*와 *P. pastoris*는 pH 7.5 그리고 *C. boidinii*는 pH 8.0이었다. Alcohol-oxidases 생성능이 있는 *Klockera* sp.와 *H. polymorpha*에서 추출 정제한 효소도 고정화효소보다 반응최적온도는 높았는데 비하여 최적 pH는 차이가 없는 것으로 보고 된 바도 있다^{7,12}.

기질이용성의 비교

위에서 준비한 4가지형태의 alcohol-oxidase의 기질이용성은 상대활성과 Michaelis상수(Km)로 나타내었고 각 균주별 실험 결과를 Table 2, 3 그리고 4에 각각 나타내었다.

상대활성과 Km치는 효소의 형태에 따라 약간의 차이가 났다. 고정화한 효소는 탄소수 8개이하인 직쇄

Table 1. Optimum temperature (°C) of reaction by the various forms of alcohol-oxidases

Enzyme	<i>H. polymorpha</i> CBS 4732	<i>P. pastoris</i> CBS 2612	<i>C. boidinii</i> CBS 8106
Immobilized cellule	35	30	25
Cellule	40	30	35
Immobilized enzyme	40	30	30
Purified enzyme	45	40	37

alcohols에, 조효소는 탄소수 7개, 그리고 정제효소의 경우에는 탄소수 5~6개에 각각 활성을 나타내었다. 그리고 효소의 형태에 따라 Km치는 상당한 차이를 나타

내었지만, 어떤 효소의 경우에도 탄소수가 길어질수록 Km치는 증가하는 경향을 나타내어 효소의 alcohols에 대한 친화도가 감소함을 알 수 있었다. 그리고 고정화

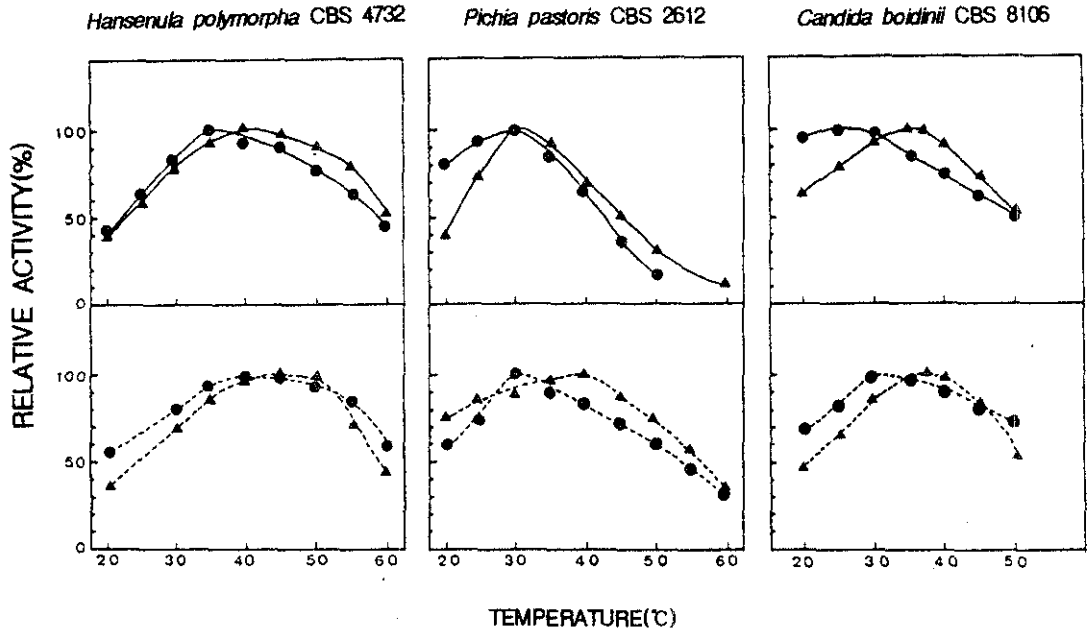


Fig. 1. Effects of the temperature for the reaction on the alcohol-oxidase activity of the cellules (▲—▲), immobilized cellules (●—●), purified enzymes (▲---▲) and immobilized enzymes (●---●).

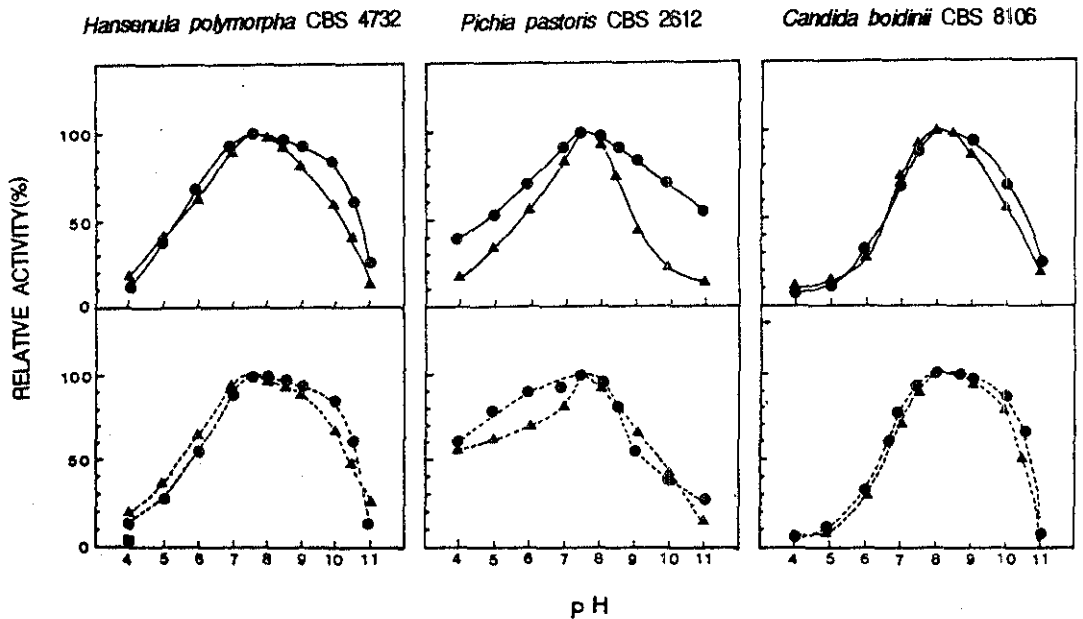


Fig. 2. Effects of the pH for the reaction on the alcohol-oxidase activity of the cellules (▲—▲), immobilized cellules (●—●), purified enzymes (▲---▲) and immobilized enzymes (●---●).

Table 2. Oxidation of substrates by various forms of alcohol-oxidase produced by *Hansenula polymorpha* CBS 4732

Substrates	Cellules		Enzyme				Cellule			
	Extracts		Purified		Immobilized		Libre		Immobilized	
	R.A.	Km	R.A.	Km	R.A.	Km	R.A.	Km	R.A.	Km
Methanol	100	1.39	100	1.25	100	12.98	100	1.50	100	13.70
Ethanol	32.4	5.25	29.5	5.10	52.8	24.10	35.6	5.47	55.1	23.81
Propanol	7.4	11.11	6.8	10.92	26.6	41.66	8.3	11.50	23.7	41.67
Butanol	2.9	105	2.7	98.10	17.6	97.09	3.2	109	17.8	83.35
Pentanol	0.6		0.5		7.2		0.8		7.6	
Hexanol	0.08		-		2.2		0.1		3.0	
Heptanol	0.04		-		0.8		0.05		1.5	
Octanol	-		-		0.2		-		0.4	
Nonanol	-		-		-		-		-	
Decanol	-		-		-		-		-	
Allyl alcohol	5.1	10.01	4.3	11.28	23.0	48.78	5.3	10.42	22.0	49.26
Crotyl alcohol	4.8	12.82	4.1	14.02	20.0	54.05	5.0	13.30	20.3	53.76

R.A.(Relative activity %) : specific activity on tested substrate/specific activity on methanol Km(mM)

Table 3. Oxidation of substrates by various forms of alcohol-oxidase produced by *Pichia pastoris* CBS 2612

Substrates	Cellules		Enzyme				Cellule			
	Extracts		Purified		Immobilized		Libre		Immobilized	
	R.A.	Km	R.A.	Km	R.A.	Km	R.A.	Km	R.A.	Km
Methanol	100	1.92	100	1.87	100	8.85	100	2.07	100	14.76
Ethanol	32.2	7.04	35.3	6.82	57.5	15.63	31.0	7.92	60.0	23.33
Propanol	14.5	11.11	16.3	9.57	25.3	30.32	13.2	13.21	26.9	43.31
Butanol	11.8	19.23	10.7	18.21	20.6	43.49	10.6	21.28	20.1	63.18
Pentanol	6.5		4.8		7.8		4.3		8.1	
Hexanol	0.9		0.7		1.2		0.5		1.7	
Heptanol	0.2		0.1		0.6		0.1		0.8	
Octanol	-		-		0.4		-		0.6	
Nonanol	-		-		-		-		-	
Decanol	-		-		-		-		-	
Allyl alcohol	30.4	9.09	28.7	10.32	30.7	34.71	27.6	11.52	29.7	41.62
Crotyl alcohol	20.6	12.14	21.5	12.7	26.7	39.5	21.9	13.96	25.5	45.52

Refer to the footnote in Table 2

Table 4. Oxidation of substrates by various forms of alcohol-oxidase produced by *Candida boidinii* CBS 8106

Substrates	Cellules		Enzyme				Cellule			
	Extracts		Purified		Immobilized		Libre		Immobilized	
	R.A.	Km	R.A.	Km	R.A.	Km	R.A.	Km	R.A.	Km
Methanol	100	1.96	100	1.78	100	11.62	100	2.34	100	12.04
Ethanol	70.5	3.33	69.3	2.92	78.1	20.42	68.7	4.76	71.0	22.22
Propanol	20.1	10.01	22.1	9.50	27.9	60.61	18.2	13.52	22.8	66.60
Butanol	13.7	19.20	12.5	18.21	15.4	122.58	10.6	24.35	11.8	129.92
Pentanol	7.3		3.6		8.1		4.1		7.9	
Hexanol	1.7		0.3		4.5		0.8		4.1	
Heptanol	0.13		-		2.7		-		1.3	
Octanol	-		-		1.2		-		0.6	
Nonanol	-		-		-		-		-	
Decanol	-		-		-		-		-	
Allyl alcohol	59.6	3.71	47.6	4.90	43.8	70.42	42.3	5.62	45.0	66.70
Crotyl alcohol	37.7	5.88	35.3	7.62	38.4	105.38	31.5	8.70	36.3	130.51

Refer to the footnote in Table 2

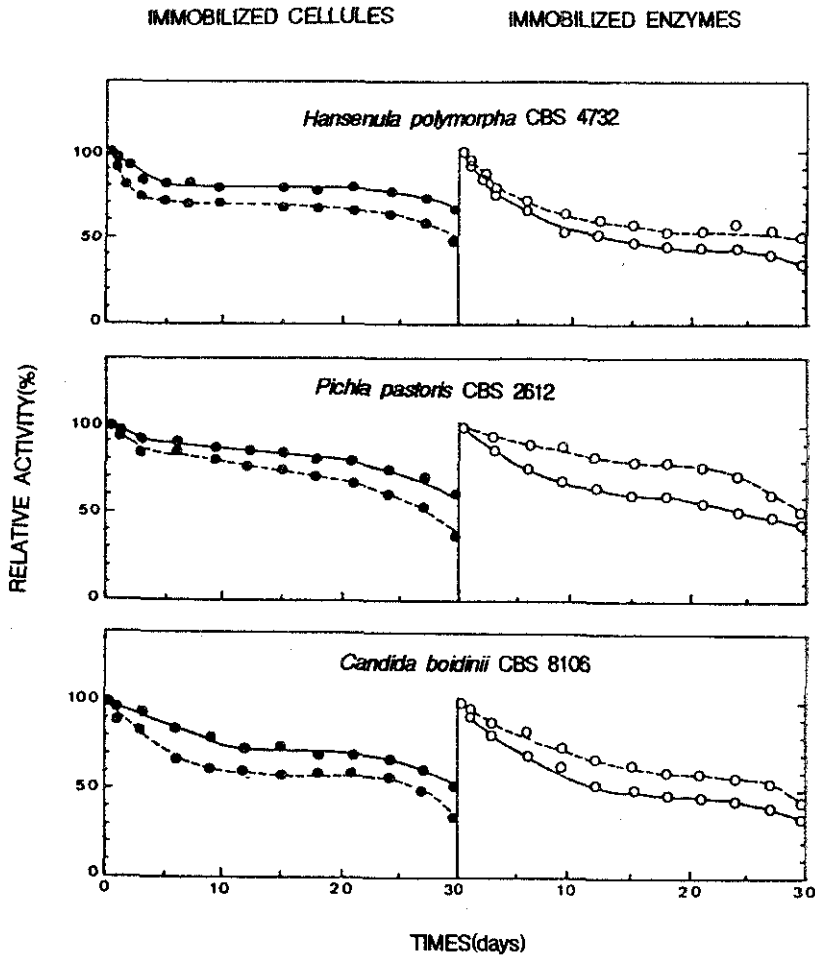


Fig. 3. Variation of the immobilized alcohol-oxidase activity in the phosphate buffer (10mM, pH 7.5 or 8.0, —) and sucrose-phosphate buffer (0.65M-10mM, pH 7.5 or 8.0, - - -) at 4° C.

한 효소는 생성균주에 관계없이 기질 친화도가 약간 증가 하였는데 이는 효소는 고정화에 의해 microenvironment와 구조의 변화가 일어나 효소의 활성화 에너지, 활성제와 저해제에 대한 성질, 그리고 기질 활성도 달라지는 데서 기인되는 현상^{17,18)}으로 추정되어진다.

Alcohol-oxidase의 안정성

이상의 결과에 의하면 고정화한 효소의 반응조건이 대체로 온화하고 기질이용성도 좋은 것으로 나타났다. 따라서 alcohol-oxidase를 산업적으로 이용하려면, 효소 생산방법도 간단한 장점과 위의 잇점으로 미루어 고정화 효소를 이용하는 것이 유리할 것으로 추정되어진다. 따라서 본 항목에서는 고정화한 효소의 안정성을 검토하였다. 이를 위해서 인산완충액(10mM, pH 7.

5 or 8.0)과 sucrose-인산완충액(0.65M-10mM)에 효소를 침지시켜 4° C에 일정기간 보관하면서 효소의 상대 활성을 비교하여 Fig. 3에 나타내었다.

고정화 균체의 효소활성은 인산완충액에서, 고정화한 효소는 sucrose-인산완충액에서 더 안정하였다. 일반적으로 sucrose는 효소의 비극성기와 소수성 결합을 하므로 안정성이 증가된다고 알려져 있으나 본 실험 결과, 고정화 효소의 안정성은 위의 이론에 적합하지만 고정화 균체의 경우는 반대의 결과를 나타내었는데 이는 sucrose가 균체중의 비극성기와 결합하지 못한 데 기인한다고¹⁹⁾ 추정되어진다.

요 약

Hansenula polymorpha CBS 4732, *Pichia pastoris* CBS 2612 그리고 *Candida boidinii* CBS 8106이 생성한 alcohol-oxidase의 여러가지 형태(purified and immobilized enzyme, libres and immobilized cellules)에 따른 효소 촉매기능을 비교하였다. 반응최적온도는 균주에 관계없이 고정화한 효소가 약간 낮아 고정화 균체와 고정화 하지 않은 균체의 경우 *H. polymorpha*는 각각 35°C와 40°C, *P. pastoris*는 모두 30°C, 그리고 *C. boidinii*는 각각 25°C와 30°C이었다. 반응최적 pH는 효소의 형태에 관계없이 균주에 따라 약간의 차이가 났다 (*H. polymorpha* CBS 4732와 *P. pastoris* CBS 2612 : pH 7.5, *C. boidinii* CBS 8106 : pH 8.0). 고정화한 효소를 4°C에 보관한 경우 그의 안정성은 균주에 따라 약간의 차이가 있었으나 약 20일 동안은 60~80%의 상대활성을 나타내었다. 효소형태와 생성균주에 따른 기질이용성도 약간의 차이가 났으며, 대체로 고정화한 효소가 기질이용율이 좋았다. 어떠한 형태의 효소도 기질 alcohols의 탄소쇄가 길어질수록 상대활성은 감소하였고 Km치는 증가하였다.

문 헌

- Janssen, F. W., Kerwin, R. M. and Ruelius, H. W. : Alcohol-oxidase, a novel enzyme from a Basidiomycete. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **20**, 630(1965)
- Sahm, H. and Wagner, F. : Microbial assimilation of methanol ; The ethanol and methanol oxidizing enzymes of the yeast *Candida boidinii*. *Eur. J. Biochem.*, **36**, 250(1973)
- Kato, N., Omori, Y., Tani, Y. and Ogata, K. : Alcohol-oxidase of *Kloeckera* sp. and *Hansenula polymorpha* : Catalytic properties and subunit structures. *Eur. J. Biochem.*, **64**, 341(1976)
- 이명숙, 장동석, 최위경 : 여러가지 탄소원에 의한 *Hansenula polymorpha*의 alcohol-oxidase 합성. 산업미생물학회지, **17**, 461(1989)
- 이명숙, 허성호 : 여러가지 탄소원에 의한 *Pichia pastoris*의 alcohol-oxidase 생성. 한국영양식량학회지, **18**, 435(1989)
- 이명숙, 김미은, 고병호, 김상현 : *Candida boidinii*에 의한 alcohol-oxidase의 생성. 한국영양식량학회지, **22**, 792(1993)
- Couderc, R. and Baratti, T. : Oxidation of methanol by the yeast *Pichia pastoris* ; Purification and properties of the alcohol-oxidase. *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 2279(1980)
- Jara, P., Allais, J. J. and Baratti, J. : Isolation and characterization of a methanol utilizing yeast with high cell yield. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **17**, 19(1983)
- Kato, N., Tani, Y. and Ogata, K. : Enzyme system for methanol oxidation in yeasts. *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 675(1974)
- Chibata, I. : *Immobilized microbial cells. Application.* Collogue Soc. Fr. Microbiol., Compiigne, p.7(1979)
- Gianfred, L., Parascand, P. and Scardi, V. : A New method of whole microbial cell immobilization. *E. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **11**, 6(1980)
- Lebesque, Y. and Dubreuil, P. : Cellules immobilisées. *Bio-Sciences*, **2**, 107(1983)
- Thomas, D. : Enzymes immobilisées : Etudes biochimiques, physico-chimiques et applications. *Bio-Sciences*, **2**, 167(1983)
- Brodellius, P. and Vandamme, E. J. : Immobilized cell systems. *Biotechnology*, VCH, **7a**, 407(1987)
- Tani, Y., Miya, Y., Nishikawa, H. and Ogata, K. : The microbial metabolism of methanol ; Part 1. Formation and crystallization of methanol oxidizing enzyme in a methanol utilizing yeast *Kloeckera* sp. N° 2201. *Agric. Biol. Chem.*, **36**, 68(1972)
- Tanaka, A., Yasuhara, S., Gelf, G., Osumi, M. and Fukui, S. : Immobilization of yeast microbodies and the properties of immobilized microbody enzymes. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **5**, 17(1978)
- Couderc, R. and Baratti, J. : Immobilized yeast cells with methanol-oxidase activity ; Preparation and enzymatic properties. *Biotech. Bioeng.*, **22**, 1155(1980)
- Engasser, J. M. and Horvath, C. : Diffusion and kinetics with immobilized enzymes. *Appl. Biochem. Bioeng.*, **1**, 167(1976)
- Kilbanov, A. M. : Stabilization of enzymes against thermal inactivation. *Advances in Applied Microbiology*, **29**, 15(1983)

(1993년 9월 5일 접수)