

콩 β -아밀라아제의 정제에 관한 연구

안 용 근

충청전문대학 식품영양과

Purification of Soybean β -Amylase

Yong-Geun Ann

Department of Food and Nutrition, Chungcheong College, Cheongwongun, Chungbuk 363-890, Korea

Abstract

Soybean β -amylase was purified by DEAE-cellulose ion exchange chromatography, Sephadex G-100 gel chromatography, CM Sephadex C-50 ion exchange chromatography and CM Sephadex C-50 ion exchange rechromatography. The purified enzyme showed 1,020 unit / mg of specific activity. The purified enzyme was identified as homogenous by disc PAGE and analysis of reaction product.

Key words : Soybean β -amylase, enzyme purification

서 론

β -아밀라아제(EC 3.2.1.2, α -1,4-glucan maltohydrolase)는 녹말이나 글리코겐 등 α -1,4-글루칸의 비환원성 말단에서부터 차례대로 가수분해하여 말토오스를 생성하는 효소이다.

말토오스는 전분공업, 제당공업, 제과공업 등의 식품공업에 필수적인 당으로 날로 수요가 증가하고 있다. 말토오스 제조에는 β -아밀라아제가 필수적이다. 현재 말토오스 제조에 가장 많이 사용되고 있는 효소는 콩 β -아밀라아제이다.

β -아밀라아제는 식물에만 존재하는 것으로 알려져 왔으나 미생물도 β -아밀라아제를 생산하는 것으로 밝혀졌다. 그중에서 고구마 β -아밀라아제만 분자량 55,707¹⁾의 동일 서브유닛으로 넷으로 형성된 분자량 222,828의 테트라머일 뿐 나머지 다른 효소는 대부분 분자량 5만 전후의 모노머이다. Ann 등²⁾은 산화 전분을 효소에 결합시켜 활성인 모노머를 얻는 데 성공하여 고구마 β -아밀라아제의 서브유닛 구조는 촉매기능에는 관계 없고 효소의 안정화기능에만 관여한다는 사실을 밝혔다.

대부분의 β -아밀라아제는 SH 시약으로 실활되기 때문에 SH 효소^{3~8)}로 알려져 왔으나 콩 β -아밀라아제를 통한 자세한 연구로 필수적이 아닌 것으로 밝혀졌다.

가장 먼저 알려진 것은 고구마 β -아밀라아제⁹⁾이며, 그 외에 콩,¹⁰⁾ 밀,¹¹⁾ 보리,^{12,13)} 무¹⁴⁾ 등 여러 식물에서 보고되어 있다. 미생물 β -아밀라아제는 1970년대에 발견되기 시작하여 *Bacillus cereus*, *B. polymixa*, *B. megaterium* 등의 세균^{15~24)}과 *Streptomyces* sp.²⁵⁾ 등의 방선균 등에서 발견되었다.

산업적으로 가장 많이 이용되고 있는 것은 콩 β -아밀라아제이지만 국내에서는 생산되지 않고 수입에 의존하고 있다. 본 연구에서는 콩 β -아밀라아제를 국내 생산하여 수입의존도를 줄이고, 경제적으로 생산할 수 있는 조건을 검토하고자 연구한 결과를 보고한다.

재료 및 방법

1. 시약

조효소 콩 β -아밀라아제는 일본 다이와카세이의 시판품을 구입하여 사용하였다. 크로마토그래피용 DEAE Cellulose, Sephadex G-100, CM Sephadex C-50은 Pharmacia사 제품을 사용하였다. 나머지 시약은 특급 내지 일급을 사용하였다.

2. 효소의 정제

1) DEAE-Cellulose 크로마토그래피

다이하카세이의 콩 β -아밀라아제 조효소 제품을 5mM 2-mercaptoethanol을 함유한 0.01M K-인산 완충액(pH 6.8)에 투석, 평형화시켜 불순물을 제거하고, 생성된 침전물은 원심분리하여 제거하였다. 상정 효소액은 같은 완충액으로 평형화한 3.8×40cm의 DEAE-cellulose 컬럼에 가하여 흡착시킨 다음 같은 완충액으로 충분히 세정하였다. 다음, 같은 완충액 중에서 0M(650ml)에서 0.5M(650ml)까지 NaCl의 직선 농도상승 기울기로 효소를 용출시켰다. 활성과 단백질 피크가 일치하는 부분을 합쳐 Sephadex G-100의 겔 크로마토그래피에 적용하였다.

2) Sephadex G-100 겔 크로마토그래피

상기 DEAE Cellulose 이온교환크로마토그래피에서 얻어진 활성 부분을 0.1M NaCl과 5mM 2-mercaptoethanol이 함유된 0.01M acetate 완충액(pH 5.6)으로 평형화한 Sephadex G-100 컬럼(3×95cm)에 걸어 유출시켰다.

3) CM Sephadex C-50 이온교환 크로마토그래피

Sephadex G-100에서 얻은 활성피크를 5mM 2-mercaptoethanol을 함유한 0.05M 아세트산 완충액(pH 5.0)에 투석하여 평형화한 다음 같은 완충액으로 평형화시킨 2.3×44cm의 CM-Sephadex C-50 컬럼에 가하여 흡착시킨 후 같은 완충액으로 세정하였다. 다음, 같은 물의 완충액을 사용하여 pH 5.0(500ml)에서 7.0(400ml)까지 pH 상승기울기로 효소를 용출시켰다.

4) CM Sephadex C-50 이온교환 재크로마토그래피

위에서 얻은 활성피크를 5mM 2-mercaptoethanol을 함유한 0.01M 아세트산 완충액(pH 5.0)에 투석하여 평형화한 다음 같은 완충액으로 평형화시킨 0.9×34cm의 CM-Sephadex C-50 컬럼에 가하여 흡착시킨 후 같은 완충액 300ml로 세정하였다. 다음, 같은 물의 완충액을 사용하여 pH 5.0(400ml)에서 6.0(400ml)까지 pH 상승기울기로 효소를 용출시켰다.

이상의 정제 과정은 Fig. 1과 같다.

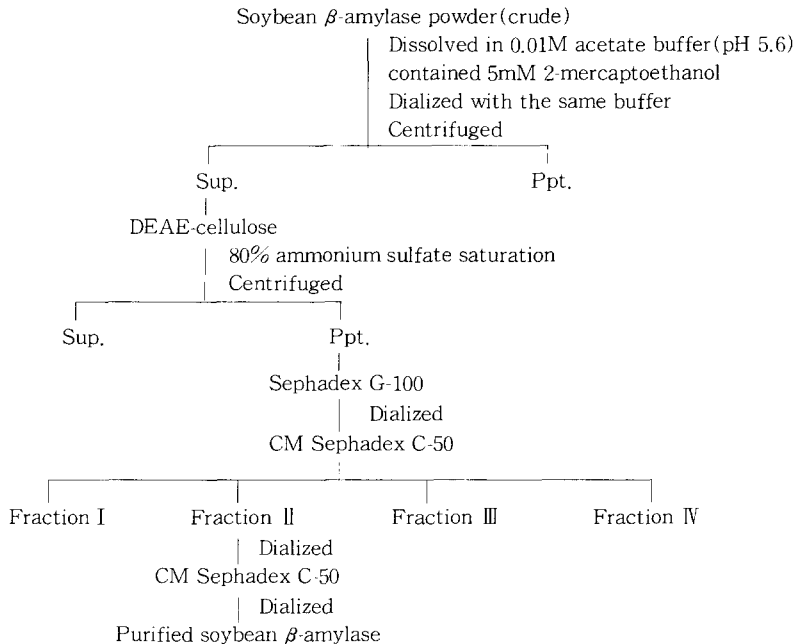


Fig. 1. Purification procedure of soybean β -amylase.

3. 활성 측정

1) 기 질

가용성 전분 200mg을 소량의 물에 풀어 100℃에서 3분간 가열하여 녹인 후 1M acetate buffer(pH 5.0) 0.5ml를 가하고, 나머지를 증류수로 채워 10ml로 하였다. 이 용액은 0.05M 아세트산 완충액 속에 2% 가용성 전분기질을 함유한다.

2) 효소용액

활성 측정 효소액은 0.05M 아세트산 완충액(pH 5.0)으로 적정 농도로 희석하여 사용하였다.

3) 반응

상기와 같이 조제한 기질용액 0.5ml에 효소용액 0.5ml를 가하여 37℃에서 10분간 반응시킨 다음 Somogyi-Nelson법²⁸⁾으로 정량하였다. 활성은 이 조건에서 1분간에 1 mol의 말토오스를 유리하는 효소력을 1 unit로 하였다.

4. 단백질 정량

Lowry-Folin법²⁹⁾으로 정량하였다. 그러나 크로마토그래피의 분석은 280nm에서의 흡광도로 측정하였다.

5. 반응산물 분석

0.05M 아세트산 완충액(pH 5.0) 중의 2% 가용성 전분 용액에 효소를 100 μ g/ml의 농도로 가하여 37℃에서 15시간 반응시킨 다음 Chromatopak 컬럼을 장착한 Shimadzu HPLC로 반응산물을 분석하였다.

결과 및 고찰

조효소제품을 투석하여 가용성 부분만 DEAE-cellulose 이온교환 크로마토그래피한 결과 Fig. 2와 같은 모습을 나타냈다. 이 중에서 활성과 단백질 피크가 일치하는 부분만을 취해 황산암모늄으로 농축한 효

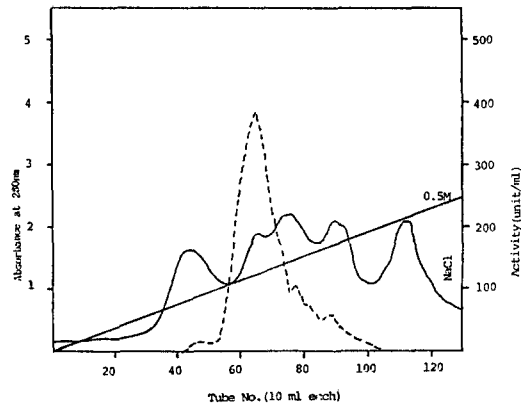


Fig. 2. Ion exchange chromatography of soybean β -amylase on DEAE-cellulose.

Column size, 3.8 \times 40cm; Buffer, 0.01M K-phosphate buffer(pH 6.8) contained 5mM 2-mercaptoethanol; —, absorbance at 280nm; ---, activity. The enzyme was eluted by linear gradient of NaCl concentration from 0(650ml) to 0.5M(650ml) in 0.01M K-phosphate buffer(pH 6.8)

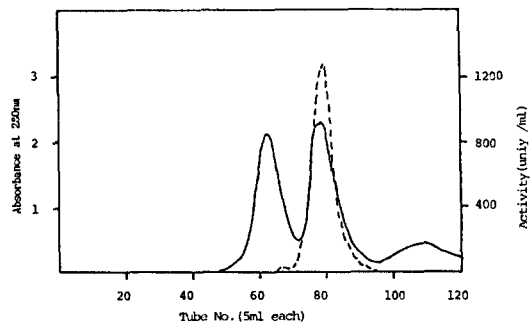


Fig. 3. Gel chromatography of soybean β -amylase on a column of sephadex G-100.

Column size, 3 \times 95cm; Buffer, 0.01M acetate buffer(pH 5.6) contained 5mM 2-mercaptoethanol; —absorbance at 280nm; ---, activity

소를 Sephadex G-100으로 겔크로마토그래피하였다. 그 결과, Fig. 3과 같이 세 개의 단백질 피크로 나누어졌으나 활성은 가운데 피크에서만 나타났다. 그래서

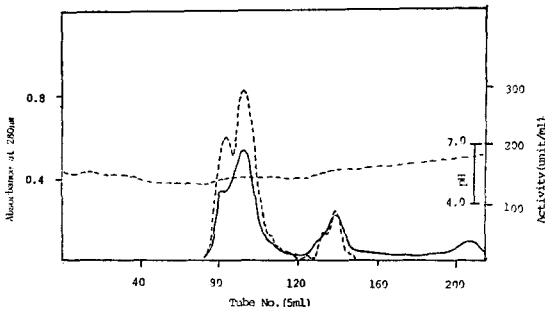


Fig. 4. Ion exchange chromatography of soybean β -amylase on CM-sephadex C-50.

Column size, 2.3×44cm; Buffer, 0.05M acetate buffer contained 5mM 2-mercaptoethanol (pH 5.0); —, absorbance at 280nm; ---, activity. The enzyme was eluted by linear gradient of pH from 5.0(500ml) to 7.0(500ml)

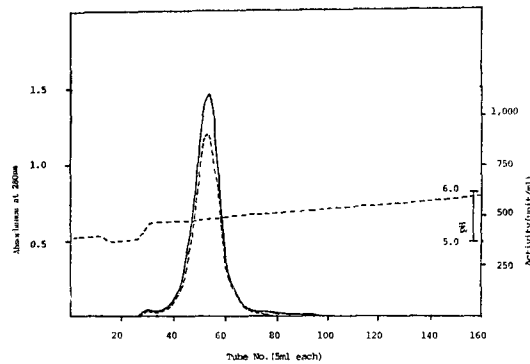


Fig. 5. Rechromatography of soybean β -amylase on CM-cellulose.

Column size, 0.9×34cm; Buffer, 0.03M acetate buffer (pH 5.0) contained 5mM 2-mercaptoethanol; —, absorbance at 280nm; ---, activity. The enzyme was eluted by linear gradient of pH from 5.0(400ml) to 6.0(400ml) in 0.01M acetate buffer (pH 5.0)

Retention time(min.) Refractive Index Enzyme + Soluble starch Soluble starch Marker Glucose Maltose Limit dextrin

활성과 단백질 피크가 일치하는 가운데 피크를 모아 CM-cellulose 이온크로마토그래피하여 Fig. 4의 결과

를 얻었다. 이 결과에서는 활성을 나타내는 피크가 넷으로 나누어져 isozyme이 존재하는 것으로 나타났다. 이중에서 양이 가장 많은 Fraction II를 모아 투석한 다음 CM Sephadex C-50로 다시 이온교환 크로마토그래피한 결과 Fig. 5와 같이 균일한 피크를 나타냈다. 정제 효소는 폴리아크릴아미드겔 전기이동 결과, 균일한 밴드를 나타냈다. 따라서 정제효소는 전기이동적으로 순수한 것으로 판단된다.

이상의 정제 결과를 Table 1에 제시하였으며, 표에서 알 수 있듯이 효소는 23배 정제되어 7.7%의 회수율을 나타냈다. 그러나 CM-Sephadex로 재크로마토그래피하여 아이소자임을 나누기 전의 상태에서는 21.5배 정제되어 21.2%의 회수율을 보이고 있다.

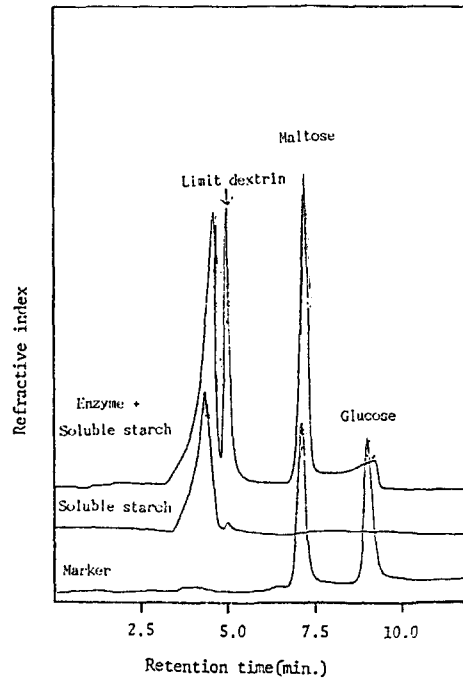


Fig. 6. High performance liquid chromatography of reaction products of soluble starch by soybean β -amylase.

The enzyme(0.1mg/ml) was reacted with 1% soluble starch in 0.05M acetate buffer(pH 5.0) at 37°C for 30min.

Table 1. Purification procedure of soybean β -amylase

Purification step	Specific activity (u/E 280nm)	Total activity (units)	Total protein (E 280nm)	Activity recovery (%)
Extracts	44.06	91,000	2,000.0	100.0
Dialized	60.14	76,440	1,274.0	84.0
DEAE-cellulose	122.8	44,100	357.0	48.5
Sephadex G-100	557.8	37,350	67.5	41.0
CM-Sephadex C-50	944.0	19,240	19.5	21.1
CM-Sephadex C-50	1,020.0	7,012	6.8	7.7

효소를 가용성 전분 기질과 15시간 반응시킨 다음 HPLC로 반응산물을 분석한 결과 Fig. 6과 같이 생성물로서는 말토오스만 생겼다. 따라서, 정제된 효소는 β -아밀라아제이며, 효소적으로 다른 아밀라아제의 활성은 함유하지 않는 순수한 것으로 판단되었다.

요 약

야마토카세이의 콩 β -아밀라아제를 DEAE-cellulose 이온교환 크로마토그래피, Sephadex G-100 겔 크로마토그래피, CM Sephadex G-50 이온교환 크로마토그래피로 정제하였다. 정제 효소는 1020 unit/mg의 비활성을 나타냈고, 폴리아크릴아미드 전기이동으로 순수하였다. 반응산물은 말토오스만을 유리해 다른 아밀라아제의 활성은 나타내지 않아 효소적으로 순수하였다.

참고문헌

1. 戸田弘子: 澱粉科學: 36, 87(1989).
2. Ann, Y. G., Iizuka, M., Yamamoto, T. and Minamiura, N.: *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 769 (1989).
3. Englard, S., Sorof, S. and Singer, T. D.: *J. Biol. Chem.*, **189**, 217(1951).
4. Ioto, M. and Yoshida, S.: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **22**, 287(1958).
5. Riem, J. P.: Doctor Dissertation, Michigan State University(1961).
6. 竹田 靖史, 會作進: 蛋白質酵素研究法, 蛋白質核酸別冊, 共立出版 東京, 438 (1976).
7. Spradlin, J. and Thoma, J. A.: *J. Biol. Chem.*, **245**, 117(1970).
8. 三上文上, 野村啓一, 馬島けい, 森田雄平: 澱粉科學, **36**, 67(1989).
9. Balls, A. K., Walden, M. K. and Thompson, R. R.: *J. Biol. Chem.*, **173**, 9(1948).
10. Mikami, B., Aibara, S. and Morita, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 943(1982).
11. Tkachuk, R. and Tipples, K. H.: *Cereal Chem.*, **43**, 62(1986).
12. Cooper, A. H. and Pollock, J. R. A.: *J. Inst. Brew.*, **63**, 24(1957).
13. Visuri, K. and Nummi, M.: *Eur. J. Biochem.*, **28**, 555(1972).
14. 三上文上, 和田野晃: アミラ-ゼシンポジウム, **7**, 79(1972).
15. 東原昌孝, 岡田茂孝: アミラ-ゼシンポジウム, **6**, 39(1971).
16. Takasaki, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 1523 (1976).
17. Takasaki, Y.: *Report Ferment. Res. Inst.* **50**, 29(1978).
18. 新家龍: 醱酵工學, **57**, 102(1979).
19. Murao, S., Ohyama, K. and Arai, M.: *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 719(1979).
20. Nanmori, T., Shinke, R., Aoki, K. and Nishira, H.: *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 941(1983).

21. Nanmori, T., Shinke, R., Nakano, Y., Kitaoka, S. and Nisira, H. : *Appl. Microbial Biotechnol.*, 21, 383(1985).
22. 東原昌孝, 三吉新介, 岡田茂孝: 科學と工業, 60 (3), 91(1986).
23. Kawazu, T., Nakanishi, Y., Uozumi, N., Sasaki, T., Yamagata, H., Tsukagoshi, N., and Udaka, S. : *J. Bacteriol.*, 169, 1564 (1987).
24. Shinke, R., Kunimi, Y. and Nishira, H. : *J. Ferment. Technol.*, 53, 698(1975).
25. Obi, S. K. C. and Odibo, F. J. C. : *Appl. Environ. Microbial.*, 47, 571(1984)
26. Davis, J. : *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121, 321 (1964).
27. Orstein, L. : *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121, 404(1964).
28. Somogyi, M. : *J. Biol. Chem.*, 195, 19(1952).
29. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951).

(1994년 3월 5일 수리)