

## 고구마 $\beta$ -아밀라아제의 안정성에 관한 연구 (1)

안 용 근 · 이 석 건\*

충청전문대학 식품영양과, \* 충남대학교 식품공학과

### Stability of Sweet Potato $\beta$ -Amylase (I)

Yong-Geun Ann and Seuk-Keun Lee\*

Dept. of Food Nutrition, Chung Cheong Junior College,

Wolgokri 330, Kang Nae Myun, Cheong Won Kun, Chung Buk 363-890, R. O. Korea

\* Dept. of Food Science and Technology, College of Agriculture, Chungnam National University,

Gungdong 220, Yuseonggu, Thejon, 305-764, R. O. Korea

#### Abstract

$\beta$ -Amylase was purified from sweet potato by acetone fractionation, Sephadex A-50 ion exchange chromatography and Sephadex G-200 gel chromatography. The higher enzyme concentration was, the higher heat stability of enzyme became. After 1 hour 30 minute. at 60°C in pH 5, enzyme under concentration of 30  $\mu$ g/ml lost its activity completely and over the concentration of 100  $\mu$ g/ml remained 25% of activity. The enzyme was stabilized at range of pH 4~10 and pH stability was increased by glycerol. Five moles of NaCl inhibited completely of the enzyme activity. SDS of 0.05% inhibited the enzyme completely after 12 hours at 37°C in pH 5. One mole guanidine-HCl and 8M urea inhibited the entire enzyme after 13 hours at 37°C in pH 5.

Key words : sweet potato  $\beta$ -amylase, stability of sweet potato  $\beta$ -amylase

#### 서 론

$\beta$ -아밀라아제(EC 3.2.1.2,  $\alpha$ -1,4-glucan maltohydrolase)는 녹말이나 글리코겐 등  $\alpha$ -1,4-글루칸을 비환원성 말단에서부터 차례대로 가수분해하여 말토오스를 생성하는 효소이다.

말토오스는 전분공업, 제당공업, 제과공업 등의 식품공업에 필수적인 당으로 수요가 계속 증가하고 있다. 말토오스 제조에는  $\beta$ -아밀라아제가 필수적이며, 각광을 받고 있는 식혜도  $\beta$ -아밀라아제의 작용으로 만들어진 다.

$\beta$ -아밀라아제는 고구마<sup>1)</sup> 외에 콩<sup>2)</sup>, 밀<sup>3)</sup>, 보리<sup>4)</sup>, 무우<sup>5)</sup> 등 여러 식물에서 보고되어 있다. 미생물  $\beta$ -아밀라아제는 1970년대에 발견되기 시작하여 *Bacillus cereus*<sup>6)</sup>, *B. polymyxa*<sup>7)</sup>, *B. megaterium*<sup>8)</sup> 등의 세균과 *Streptomyces* sp<sup>9)</sup> 등의 방사선균 등에서 발견되었다.

그 중에서 고구마  $\beta$ -아밀라아제만 분자량 55,707<sup>10)</sup>의 동일 서브유닛 넷으로 형성된 분자량 222,828의

테트라머일뿐 나머지 다른 효소는 대부분 분자량 5만 전후의 모노머이다. 필자 등은 산화 전분을 아밀라아제에 결합시켜 활성을 갖는 모노머를 얻는데 성공하여 고구마  $\beta$ -아밀라아제의 서브유닛 구조는 촉매기능에는 관계없고 아밀라아제의 안정화 기능에만 관여한다는 사실을 밝혔다.<sup>11~15)</sup>

$\beta$ -아밀라아제는 SH 시약으로 실활되기 때문에 SH 효소<sup>16~19)</sup>로 알려져 왔으나 필수적이 아닌 것으로 밝혀졌다.<sup>20,21)</sup> 그러나, SH기의 산화나 변형으로 활성을 잃는 경우가 많기 때문에 효소의 안정화를 위해서는 SH기를 보호해야 한다. 고구마  $\beta$ -아밀라아제의 안정성에는 여러가지 인자가 관여하며, 산업에 사용하기 위해서는 내산성, 내열성이 우수해야 한다. 본 연구는 그를 위해 고구마  $\beta$ -아밀라아제에 미치는 온도의 영향, pH의 영향, NaCl의 영향, SDS의 영향, 염산구아니딘과 우레아의 영향을 분석한 결과이다.

## 재료 및 방법

### 1. 시 약

가용성 전분은 일본 國產化學, 크로마토그래피용 DEAE cellulose, Sephadex G-200 등은 Pharmacia사 제품을 사용하였다. 나머지 시약은 특급 내지 일급을 사용하였다.

### 2. 고구마 $\beta$ -아밀라아제의 정제

일본산 고구마 高系14號를 착즙하여 100℃에서 10분간 열처리하여  $\beta$ -아밀라아제에 상온의 아세톤에 대한 안정성을 부여한 다음 50% 및 45% 2회의 아세톤 침전과 DEAE-cellulose 이온교환크로마토그래피, Sephadex G-200 겔크로마토그래피, 결정화 등으로 정제하였다.<sup>12)</sup>

### 3. 활성 측정

#### 1) 기질

가용성 전분 200mg을 소량의 물에 풀어 100℃에서 3분간 가열하여 녹인 후, 0.8% Triton X-100을 함유한 1M 아세트산 완충액 (pH 4.8) 0.5ml를 가하고, 나머지를 증류수로 채워 10ml로 하였다. 이 용액은 0.05M 아세트산 완충액에 0.04% Triton X-100과 2% 가용성 전분기질을 함유한다.

#### 2) 효소용액

활성측정용  $\beta$ -아밀라아제는 0.04% Triton X-100을 함유한 0.05M 아세트산 완충액 (pH 4.8)으로 적정 농도로 희석하여 사용하였다.

#### 3) 반 응

상기에서 조제한 기질용액 0.2ml에  $\beta$ -아밀라아제 0.2ml를 가하여 37℃에서 10분간 반응시킨 다음 Somogyi-Nelson법<sup>22)</sup>으로 생성된 환원당을 정량하였다. 활성은 이 조건에서 1분간에 1 $\mu$ mol의 말토오스를 유리하는 양을 1unit로 하였다.<sup>12)</sup>

#### 4. 단백질 정량

$\epsilon_{280nm}^{1\%} = 17.1^{16)}$ 을 기준하여 280nm에서의 흡광도로 측정하였다.

#### 5. $\beta$ -아밀라아제의 농도별 경시적 열안정성

0.05M 아세트산 완충액 (pH 5.0)에 0 $\mu$ g/ml에서 100 $\mu$ g/ml까지 단계적으로 희석한  $\beta$ -아밀라아제 용액

을 15, 40, 55, 60, 65℃에서 1시간 30분 정지한 다음 0.05M 아세트산 완충액 (pH 5.0)으로 희석하여 활성을 측정하였다.

#### 6. 시간별 pH 안정성

20% 글리세롤을 함유하거나 함유하지 않은 각 pH의 0.3M Britton-Robinson 광역완충액에  $\beta$ -아밀라아제를 5 $\mu$ g/ml 농도로 가해 37℃에서 6시간 유지한 후 0.04% Triton X-100을 함유한 0.3M 아세트산 완충액 (pH 4.8)으로 희석하여 활성을 측정하였다.

#### 7. 활성에 대한 NaCl의 영향

0.04% Triton X-100을 함유한 0.05M 아세트산 완충액 (pH 4.8)에 0M에서 5M까지 NaCl을 농도별로 가한 0.2 $\mu$ g/ml의  $\beta$ -아밀라아제 용액을 37℃에서 10분간 기질과 반응시켜 활성을 측정하였다.

#### 8. SDS에 대한 안정성

0.5M 아세트산 완충액 (pH 5.0)에  $\beta$ -아밀라아제 10 $\mu$ g/ml, SDS를 농도별로 가해 37℃로 보존하면서 시간별로 채취하여 잔존 활성을 측정하였다.

#### 9. 염산구아니딘과 우레아에 대한 안정성

0.5M 아세트산 완충액 (pH 5.0)에  $\beta$ -아밀라아제 10 $\mu$ g/ml과 0M에서 8M까지의 우레아와 염산구아니딘을 단계별로 가해 37℃에서 13시간 보존한 뒤, 0.04% Triton X-100을 함유한 0.05M 아세트산완충액 (pH 4.8)으로 희석하여 활성을 측정하였다.

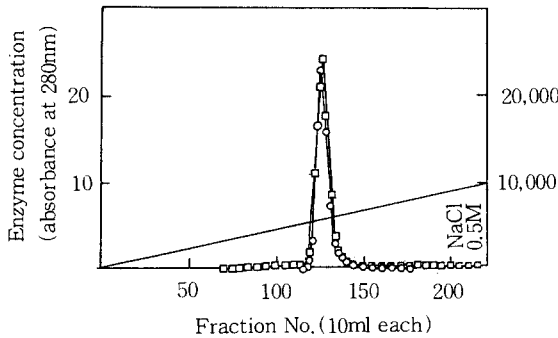
## 결과 및 고찰

### 1. 정 제

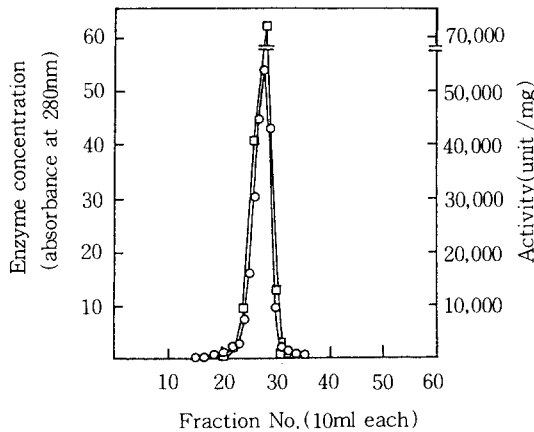
본 연구자들이 개발한 상온 아세톤 분별침전법과 크로마토그래피<sup>12)</sup>로 고구마  $\beta$ -아밀라아제를 정제하여 Fig. 1과 Fig. 2의 결과를 얻었다. Sephadex G-200으로 얻은 활성 부분은 전기영동적으로 단일하고, N-말단은 알라닌만을 나타내 균일하였다. 정제  $\beta$ -아밀라아제의 비활성은 2,500unit/mg이었다.

### 2. 열안정성

Fig. 3과 같이 고구마  $\beta$ -아밀라아제는 효소농도가 낮을수록 열안정성이 떨어졌고, 농도가 높을수록 높았다. 그래서 65℃에서 1시간 30분 뒤 효소농도 30 $\mu$ g/ml 이하에서는 실패하였지만, 100 $\mu$ g/ml에서는 25% 정도 활성이 남았다.



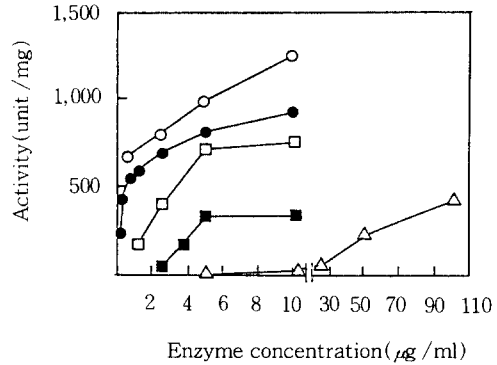
**Fig. 1. Ion exchange chromatography of sweet potato  $\beta$ -amylase on a column of DEAE Sephadex A-50.** The enzyme was eluted by linear gradient of NaCl concentration from 0 to 0.5M in 0.01M acetate buffer (pH 5.6). Column size, 4.2×48cm : ○-○, absorbance at 280nm ; □-□, activity.



**Fig. 2. Gel chromatography of sweet potato  $\beta$ -amylase on a column of Sephadex G-200.** Column size, 2.4×110cm ; buffer, 0.01M acetate buffer (pH 5.5) containing 0.2M NaCl : ○-○, absorbance at 280nm ; □-□, activity.

pH 안정성도  $\beta$ -아밀라아제 농도가 높을수록 안정성이 증가할 것이다(Fig. 3). 이같이 같은 효소라도 효소 농도에 따라 결과가 다르기 때문에 안정성은 항상 일정한 효소농도에서 측정해야 하며, 결과에 효소농도를 표시해야 한다. 그러나, 대부분 이를 등한시하기 때문에 표시하지 않고 있다.

효소 농도별로 열안정성을 측정한 결과는 Nakamura 등의 결과<sup>23)</sup> 외에는 찾아보기 힘들며, 그들도 고구마  $\beta$ -아밀라아제의 농도가 높을수록 열안정성이 높아진다고 보고하였다.



**Fig. 3. Temperature stability of sweet potato  $\beta$ -amylase according to the enzyme concentration.** The enzyme of each  $\mu$ g was incubated in 0.05M acetate buffer (pH 5.0) for 1 hour 30 min, at each temperature. ○-○, 15°C ; ●-●, 40°C ; □-□, 55°C, ■-■, 60°C ; △-△, 65°C.

고구마  $\beta$ -아밀라아제를 많이 희석하면 서브유니트로 해리하여 실활된다.<sup>24,25)</sup> 아밀라아제 농도가 낮을수록 열 안정성이 저하되는 것은 해리 작용에 의한 것으로 보인다. 그러나 모노머 효소도 농도가 낮을수록 안정성이 떨어지는 것은 마찬가지이다.

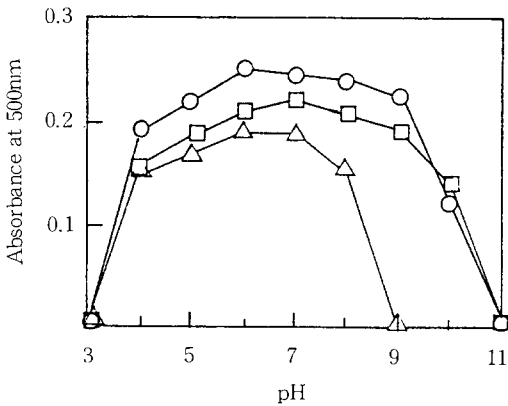
**3. pH 안정성**

각 pH에서 6시간 유지시킨 후 활성을 측정한 결과, 고구마  $\beta$ -아밀라아제는 pH 4에서 9까지 안정하였다 (Fig. 4, □). 그러나 글리세롤을 20% 가하면 pH 안정성이 증가되었다(Fig. 4, ○). 그러나, 글리세롤을 투석하여 제거하고 다시 pH를 맞추어 활성을 측정한 것은 안정범위가 pH 4에서 8까지로 줄었다. 이것은 글리세롤이 제거되면 다시 불안정하게 되는 것을 의미한다.

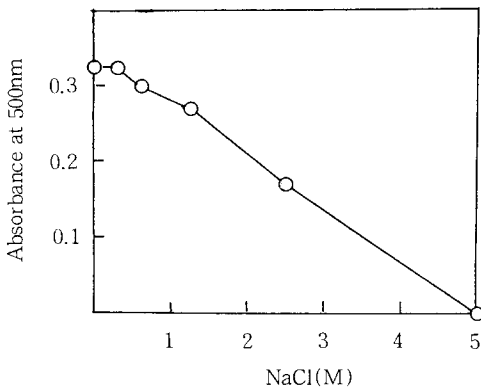
Nakamura 등<sup>23)</sup>은 완충액의 농도를 달리하였을 때의 pH 안정성을 분석하여 0.02M 아세트산 완충액(pH 5.4)을 사용하였을 경우 pH 안정성이 가장 높다고 보고하였다.

**4. NaCl의 영향**

NaCl 존재 하에 활성을 측정한 결과, 0.5M까지는 활성에 영향을 주지 않았지만 농도가 그 이상 되면 농도와 반비례하여 활성이 저하하여 5M에서는 활성을 모두 잃었다(Fig. 5). NaCl의 저해작용은  $\beta$ -아밀라아제 활성 부위의 이온화를 차단하여 촉매반응이 일어나지 못하게 하고, 서브유니트 사이의 이온결합을 해리시켜서 구조



**Fig. 4. pH stability of sweet potato  $\beta$ -amylase in the presence or absence of glycerol.** The enzyme(5 $\mu$ g/ml) was incubated in the presence or absence of glycerol in 0.3M Britton-Robinson buffer for 6 hours at 37 $^{\circ}$ C.  $\circ$ - $\circ$ , in the presence of 20% glycerol ;  $\square$ - $\square$ , in the absence of 20% glycerol, ;  $\triangle$ - $\triangle$ , in the presence of 20% glycerol, after reaction, pH was controlled.



**Fig. 5. Effect of NaCl on sweet potato  $\beta$ -amylase activity.** The enzyme(0.2 $\mu$ g/ml) was reacted with 0.1% soluble starch in 0.05M acetate buffer (pH 4.8) containing each moles of NaCl and 0.04% Triton X-100 for 30 min, at 37 $^{\circ}$ C.

에 이상을 가져오기 때문으로 보인다.

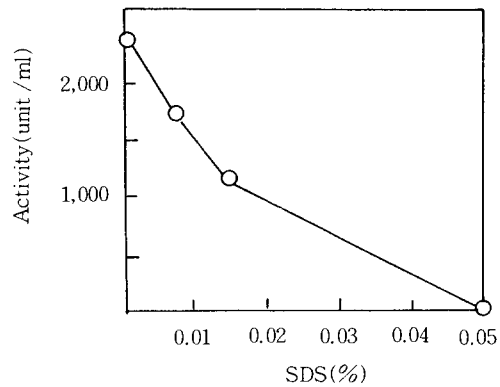
Nakamura<sup>26)</sup>는 무기염 존재 하에서의 고구마  $\beta$ -아밀라아제의 열 안정성을 연구하여 NaCl 농도가 높을 수록 실활속도가 빨라진다는 결과를 보고하였다. 그러나 NaCl이 활성에 미치는 영향은 보고된 바 없다.

**5. SDS의 영향**

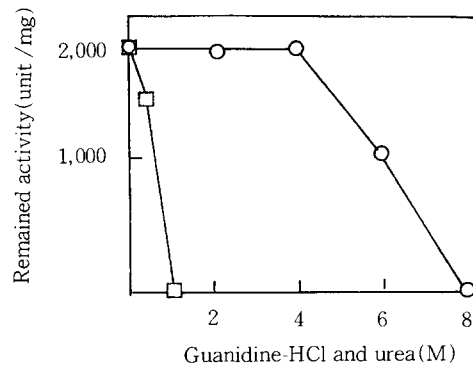
37 $^{\circ}$ C에서 12시간동안 SDS를  $\beta$ -아밀라아제와 반응시킨 결과, SDS 농도 0.015%에서는 활성의 50%가 남아있으며, 0.05%에서는 완전히 실활되었다(Fig. 6). SDS는 계면활성제로 서브유니트를 해리시키는 작용을 한다.<sup>27)</sup> 본 결과는 SDS가 서브유니트를 해리하여 구조에 이상을 가져오고, 활성부위의 이온화를 차단하기 때문으로 보인다.

**6. 염산구아니딘과 우레아의 영향**

고구마  $\beta$ -아밀라아제에 염산구아니딘과 우레아를 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 13시간 안정성을 측정 한 결과, 염산구아니딘은 1M 농도에서, 우레아는 8M 농도에서 활성을



**Fig. 6. Effect of SDS on sweet potato  $\beta$ -amylase.** The enzyme(10 $\mu$ g/ml) was reacted with SDS in 0.5M acetate buffer(pH 5.0) for 12 hours at 37 $^{\circ}$ C.



**Fig. 7. Effects of guanidine-HCl and urea on sweet potato  $\beta$ -amylase** The enzyme(10 $\mu$ g/ml) was reacted with each moles of guanidine-HCl and urea in 0.5M acetate buffer(pH 5.0) for 13 hours at 37 $^{\circ}$ C.  $\circ$ - $\circ$ , urea, ;  $\square$ - $\square$ , guanidine-HCl.

모두 잃었다. 일반적으로 효소에 대한 저해 작용은 염산 구아니딘이 훨씬 강하다. 염산구아니딘과 우레아는 효소의 수소결합을 절단한다. 그러므로 이 결과는 서브유닛 사이의 수소결합을 절단하여 해리하기 때문에 나타난 것으로 보인다.

Weintraub 등<sup>28)</sup>은 고구마  $\beta$ -아밀라아제에 대한 우레아의 저해는 낮은 농도에서는 비경쟁적, 가역적이라 하였으나 서브유닛의 해리에 대해서는 언급하지 않았다.

## 요 약

고구마  $\beta$ -아밀라아제를 아세톤 분별침전, DEAE Sephadex A-50, Sephadex G-200으로 정제하였다. 정제효소의 열안정성은 효소농도가 높을수록 높았다. pH 5, 65°C에서 1시간 반 후, 효소농도 30 $\mu$ g/ml 이하에서는 실패하였지만, 100 $\mu$ g/ml에서는 25%의 활성이 남았다. 정제효소는 pH 4~10 범위에서 안정하였고, 글리세롤은 pH 안정성을 증가시켰다. NaCl은 pH 4.8, 0.5M 농도에서 효소활성을 100% 저해하였다. SDS는 pH 5, 37°C에서 12시간 반응시킨 결과 0.05% 농도에서 효소활성을 완전히 저해하였다. 염산구아니딘은 pH 5, 37°C에서 13시간 반응시킨 결과 1M 농도에서, 우레아는 8M 농도에서 효소활성을 완전히 저해하였다.

## 참고문헌

- Balls, A. K., Walden, M. K. and Thompson, R. R. : A crystalline  $\beta$ -amylase from sweet potato, *J. Biol. Chem.*, 173, 9~19(1948).
- Gertler, A. and Birk, Y. : The role of sulphhydryl groups in soybean  $\beta$ -amylase, *Biochim. Biophys. Acta*, 118, 98~105(1966).
- Kneen, E. and Sandstedt, R. M. : Beta-amylase activity and its determination in germinated and ungerminated cereals, *Cereal Chem.*, 18, 237~252(1941).
- Weill, C. E. and Caldwell, M. L. : A study of the essential groups of  $\beta$ -amylase I~II, *J. Am. Chem. Soc.*, 67, 212~217(1945).
- 相原茂夫, 森田雄平 : 다이콘および다이즈  $\beta$ -아미라아제, 植物酵素蛋白質研究法, 共立出版, 434~437(1976).
- Takasaki, Y. : Purification and enzymatic properties of  $\beta$ -amylase and pullanase from *Bacillus cereus* var. *mycoides*, *Agric. Biol. Chem.*, 40(8), 1523~1530(1976).
- Robyt, J. and French, D. : Purification and action of an amylase from *Bacillus polymyxa*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 104, 338~345(1964).
- Higashihara, M., Okada, S. : Studies on  $\beta$ -amylase of *Bacillus megaterium* strain No. 32, *Agric. Biol. Chem.*, 38(5), 1023~1029(1974).
- Shinke, R., Nishira, H. and Mugibayashi, N. : Isolation of  $\beta$ -amylase producing microorganism, *Agric. Biol. Chem.*, 38(3) 665~666(1974).
- Toda, H., Nitta, Y., Asanami, S., Kim, J. P. and Sakiyama, F. : Sweet potato  $\beta$ -amylase, primary structure and identification of the active-site glutamyl residue, *Eur. J. Biochem.*, 216, 25~38(1993).
- Ann, Y. G., Iizuka, M., Minamiura, N. and Yamamoto, T. : Evidence for the existence of an active monomer of sweet potato  $\beta$ -amylase, *Agric. Biol. Chem.*, 53(11), 3109~3110(1989).
- Ann, Y. G., Iizuka, M., Minamiura, N. and Yamamoto, T. : Preparation and some properties of active monomer of sweet potato  $\beta$ -amylase, *Agric. Biol. Chem.*, 53(4), 769~774(1990).
- Ann, Y. G., Iizuka, M., Yamamoto, T. and Minamiura, N. : Active monomer of sweet potato  $\beta$ -amylase : Stabilization and an improved preparation method using  $\alpha$ -cyclodextrin, *J. Ferment. Bioeng.*, 70(2), 75~79(1990).
- Minamiura, N., Ann, Y. G., Adachi, T., Ito, K., Iizuka, M., and Yamamoto, T. : Function of subunit structure of sweet potato tetrameric  $\beta$ -amylase, *Mic. Util. Res. Res.*, 7, 18~24(1990).
- Minamiura, N., Ann, Y. G., Iizuka, M., Ito, K., and Yamamoto, T. : Preparation of an active monomer from sweet potato tetrameric  $\beta$ -amylase in the presence of  $\alpha$ -cyclodextrin, *Denpun Kagaku*, 38(2), 153~157(1991).
- Englard, S., Sorof, S. and Singer, T. P. : Intramolecular nature of the oxidative inactivation of crystalline  $\beta$ -amylase, *J. Biol. Chem.*, 189, 217~226(1951).
- Ito, M. and Yoshida, S. : Sulphydryl groups in crystalline sweet potato  $\beta$ -amylase, *Bull. Agr. Soc. Japan*, 22(5) 287~293(1958).
- Thoma, J. A., Koshland, D. E., Jr., Shinke, R. and Ruscia J. : Influence of sulphhydryl groups on the activity of sweet potato  $\beta$ -amylase, *Biochem.*, 4(4), 714~722(1965).
- Spradlin, J. and Thoma, J. A. :  $\beta$ -Amylase thiol groups, *J. Biol. Chem.*, 245(1) 117~127(1970).
- 竹田青史, 會作進, サツマイモ  $\beta$ -アミラ아제, 植物酵素蛋白質研究法, 共立出版, 438~443(1976).
- 三上文三, 野村啓一, 馬島肇一, 森田雄平, 다이즈  $\beta$ -아미라아제의構造とSH基의反應性, 澱粉科學, 36(2), 67~72(1989).
- Nelson, N. : A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose, *J. Biol. Chem.*, 153, 375~379(1944).
- Nakamura, S. and Kono, Y. : Studies on the denaturation of enzymes, I. Effects of concentration on the rate of heat-inactivation of enzymes, *J. Biochem.*, 44(1) 25~31(1957).
- Bernfeld, P., Berkeley, B. J. and Bieber, R. E. : Reversible dissociation at high dilutions and their inhibition by polyanions, *Arch. Biochem. Biophys.*, 111, 31~38(1965).
- Cooks, R. A. and Koshland, D. E., Jr. : Specificity in the assembly of multisubunit proteins, *Proc. Natl.*

- Acad. Sci. USA*, **64**, 247~254(1969).
26. Nakamura, S. : Studies on the denaturation of enzymes, III. Effects of anions on heat inactivation of sweet potato  $\beta$ -amylase, *J. Biochem.*, **49**(4), 328~332(1961).
27. 安龍根, 甘藷-アマミラ-ゼに関する研究, 大阪市立大學博士學位論文, 1989.
28. Weintraub, B. D., Hamilton, G. A. and Chase, A. M. : An analysis of the inhibition of  $\beta$ -amylase by urea, *Arch. Biochem. Biochys.*, **107**, 224~238 (1964).
- 
- (1996년 8월 10일 접수)