

IO₄-산화전분 변형에 의한 보리 β-Amylase의 안정성 증가

안 용 근

충청대학 식품영양과

Stabilization of Barley β-Amylase by Modification with IO₄-Oxidized Starch

Yong-Geun Ann

Dept. of Food and Nutrition, Chungcheong College, Gangnae, Cheongwon, Chungbuk 363-792, Korea

Abstract

The stabilization of barley β-amylase(Biozyme ML, Amano) was attained by modification with periodate-oxidized soluble starch. The specific activities of modified enzyme at pH 9.7 and pH 8.0 were 42% and 92%, respectively, compared with that of native enzyme. The pH stability of modified enzyme was increased at pH 2~5 and 7~12 in the presence of α-cyclodextrin(α-CD) compared with that of native enzyme. Thermal stability of the modified enzyme was increased. After treatment at 60°C for 10min, the activity remained 8% for the enzyme modified at pH 8.0 in the presence of α-CD, 4.5% for the native enzyme. The native enzyme and modified enzyme showed two peak in HPLC. The molecular weight of the modified enzyme was slightly increased in HPLC analysis.

Key words : stabilization of barley β-amylase, modification of barley β-amylase, periodate-oxidized soluble starch.

서 론

당단백질은 구조단백질, 운반체 단백질, 면역계 단백질 호르몬, 인터페론, 효소 등 생체의 주요 구성 성분이다. 이것은 당단백질이 세포 사이, 분자 사이, 분자와 세포 사이의 인식마커와 정보전달자로서 여러 생명현상에 관여하여 생체 대사와 활성발현을 조절하기 때문으로, 이것은 당단백질이 점성과 용해성, 유화성, 방부 효과 및 항산화 효과 등 많은 기능성을 갖기 때문이다. 그래서 이들 기능성을 이용하여 당단백질을 방부제, 선도유지제, 신미각물질, 장내세균 제어제, 충치 예방제, 기능성 단백질, 바이오리액터, 분리정제용 재료, 인공장기 재료, 바이오센서, 화장품 재료, 진단약 등으로 사용하려는 시도가 계속되고 있다.

이를 위해 여러 분야에서 인공적으로 당단백질을 조절하기 위해 노력하고 있다. 이를 탄수화물공학이라 하며, 유전자공학과 단백질공학에 이어 제3의 바

이오테크놀러지로 주목받고 있다^{1~4)}.

그래서 본 연구자는 싼 재료를 사용하여 쉽고, 간단한 방법으로 무해하고 유용한 기능성 당단백질을 조제하고자 NaIO₄-산화 전분 및 말토올리고당을 단백질과 반응시켜 당단백질을 만드는 방법을 개발하였다^{5,6)}. 분자 표면에 리신의 ε-NH₂기가 존재하는 효소와 단백질은 이 방법으로 모두 당단백질로 조제할 수 있으며, 본 연구자는 이 방법으로 고구마 β-아밀라아제에 산화당을 부가하여 고구마 β-아밀라아제의 서브유닛 구조와 기능을 해석한 바 있고, 아밀라아제의 안정성을 증가시키는 결과를 확인한 바 있다^{7~11)}. 그리고, 여러 효소에 이 방법을 적용시켜서 인공당단백질로 만들어서 안정성이 증가되는 결과를 확인하였다^{12~13)}.

그러나, 전체 효소를 대상으로 하지 못하였기 때문에 다른 효소에도 마찬가지로 작용하는지에 대해서는 증거가 부족하다. 본 연구는 산업적으로 말토오스,

* Corresponding author : Yong-Geun Ann

물엿, 맥주, 식혜 제조 등에 필수적인 보리 β-amylase에 적용하여 안정성이 증가한 것을 밝힌 결과이다.

실험 재료 및 방법

1. 재 료

효소는 일본 아마노제약(天野製藥)의 보리 β-amylase(상품명 Biozyme ML)를 제공받아 사용하였다. 이 제품은 β-amylase 활성 6,810 unit/ml, α-amylase 활성 1,360 unit, 최적 pH 5.0, 최적온도 58°C이다. 사용시는 10배 희석하여 모액으로 사용하였다. 시약은 일급 및 특급을 사용하였다. 가용성 전분은 일본 國產化學 제품을 사용하였다.

2. 총당 정량

페놀-황산법¹⁴⁾을 사용하였다. 즉, 당시료 1 ml에 5% 페놀 1 ml를 가하고 황산 5 ml를 가하여 발색시킨 다음 490 nm에서 글루코오스를 표준물질로 비색정량하였다.

3. 환원당 정량

Somogy-Nelson법¹⁵⁾을 사용하였다. 즉, 시료액 0.4 ml에 Somogyi-Nelson 시약 A용액 1 ml를 가하여 100°C에서 10분간 가열한 다음 B용액 1 ml를 가하여 나머지를 물로 채워 25 ml로 하였다. 이 반응액을 분광광도계를 사용하여 500 nm에서 글루코오스를 표준으로 비색정량하였다.

4. β-아밀라아제 활성 측정

전보의 방법⁷⁾에 따랐다. 즉, 0.1M 아세트산 완충액(pH 4.8) 중에서 끓여 녹인 0.2% 가용성 전분 0.2 ml와 효소액 0.2 ml를 37°C에서 10분간 반응시킨 다음 Somogyi-Nelson A 시약 1 ml를 가하여 반응을 중지시키고, 100°C에서 10분간 가열하였다. 식힌 다음 Somogyi-Nelson B시약 1 ml를 가하고 증류수로 채워 25 ml로 하여 분광광도계로 말토오스를 표준으로 500 nm에서 비색정량하였다. 1 Unit는 1분간에 말토오스 1 μmol을 유리하는 효소량으로 하였다.

5. NaIO₄에 의한 가용성 전분의 산화

가용성 전분 2g을 100ml의 0.2M NaIO₄ 용액에 현탁하여 4°C에서 40분간 교반하여 반응시킨 다음 에틸렌글리콜 10 ml를 가해 미반응의 NaIO₄를 소모 제거시켰다. 다음, 증류수에 투석하여 동결건조하였다.

6. 당 부가 조건의 검토 (HPLC분석)

0.1M Tris-HCl 완충액(pH 8.0과 9.7) 속에서 효소 358 unit, 산화 가용성 전분 6 mg을 37°C에서 15분간 반응시켜서 HPLC로 효소 분자량의 변화를 조사하고, 잔존 활성을 체크하였다. 여기서 반응 조건은 1, 비처리 효소, 2, 0.1M 붕산완충액(pH 9.7)에서 산화전분과 반응시킨 효소, 3, 2% α-시클로덱스트린 존재시 0.1M 붕산완충액(pH 9.7)에서 산화전분과 반응시킨 효소, 4, 2% α-시클로덱스트린 존재시 0.1M 붕산완충액(pH 9.7)에서 대조 반응시킨 비처리 효소, 5, 0.1M 붕산완충액(pH 9.7)에서 대조반응시킨 비처리 효소, 6, 0.1M Tris-HCl 완충액(pH 8.0)에서 반응시킨 효소 6가지였다.

7. 안정성 측정용 시료

1) 비변형 효소

증류수 중의 효소액 0.2 ml를 0.1M 아세트산완충액(pH 5.5)에 희석하여 안정성을 조사하였다. 활성 측정시의 아세트산완충액은 0.1M(pH 5.5)이었다.

2) 비변형 효소의 α-CD 존재시의 열안정성

반응액에 α-CD를 2% 함유한 것 외에는 (1)과 조건이 같았다.

3) pH 8에서 당을 부가시킨 효소의 열안정성

(1)과 조건이 같았다.

4) pH 8에서 당을 부가시킨 효소의 α-CD 존재시의 열안정성

(2)와 조건이 같았다.

8. pH 안정성 측정

상기 7의 시료를 pH 2에서 12까지의 0.1M Britton-Robinson 광역 완충액에 40배 희석하였다. α-CD 존재시의 pH 안정성은 α-CD를 2% 농도로 하여 측정하였다. 이들 시료용액을 37°C에서 2시간 항온한 다음 0.5 ml를 취하여 0.2% 가용성 전분기질 0.5 ml를 가하여 37°C에서 10분간 반응시킨 다음 Somogyi-Nelson법¹⁵⁾으로 비색정량하여 잔존활성을 측정하였다.

9. 열안정성 측정

40배 희석한 효소액을 60°C에서 0분, 5분, 10분, 20분, 30분 간격으로 0.2 ml씩 취해 0.1M 아세트산완충

액(pH 5.5) 9.8 ml에 가하여 최종적으로 2,000배 희석하고 그 중 0.5 ml를 기질(2% 가용성 전분/0.1M 아세트산완충액, pH 5.5) 0.5 ml에 가해 37°C에서 10분간 반응시켜서 Somogyi-Nelson법¹⁵⁾으로 비색정량하여 잔존활성을 측정하였다.

10. 효소의 HPLC

펌프는 Shimadzu LC-6A, 적산기는 Shimadzu Chromatopak G-R3A, 검출기는 UV 검출기로 파장 280 nm에서 검출하고, 컬럼은 SynChropak GPC 100 (1×30 cm)을 사용하여 유속 0.5 ml/min에서 0.2M NaCl을 함유한 0.1M K-인산완충액으로 0.7 ml/min의 유속으로 유출시켰다.

결 과

1. 비활성

보리 β -아밀라아제(Biozyme ML)를 pH 8.0에서 변형시킨 것은 잔존활성이 92%, pH 9.7에서 변형시킨 것은 42% 남았다. 이것은 알칼리에 약하기 때문에 나타난 결과이다. 그래서 변형은 pH 8.0에서 하는 것이 효소의 안정성 면에서 효과적인 것으로 나타났다. 그러나, 산화 가용성 전분은 pH 9.7이 아니면 잘 녹지 않기 때문에 변형 자체의 효과는 pH 9.7이 효과적이다.

2. 변형시의 안정화 조건

Fig. 1은 HPLC로 변형 효율과 분자량 변화를 살핀 결과로, 변형시키지 않은 효소(1)에는 불순물이 약간 존재한다. 그러나 주피크 뒤의 피크는 대부분 비단백질성이다. 주피크도 두 가지 단백질로 형성되어 있는데 불순 단백질인지, 아이소자임인지는 확인되지 않았다. 2는 pH 9.7의 0.1M 붕산완충액 속에서 반응시킨 것으로 주피크 앞부분의 분자량이 큰 부분이 많이 떨어져 나갔다. S는 산화 가용성 전분이다. 3은 pH 9.7에서 β -아밀라아제의 경쟁적 저해제인 α -시클로덱스트린(α -CD)을 2% 가하여 효소를 안정화시킨 상태에서 변형시킨 결과이다. 4는 α -CD 존재하에서 pH 9.7에서 변형시키지 않은 효소이다. 5는 0.1M pH 9.7의 붕산완충액에서 공시험한 효소이고, 6은 0.1M Tris-HCl 완충액(pH 8.0)에서 변형한 효소이다.

이 결과로 보면 pH 9.7에서는 α -CD가 존재하던 안 하던 주피크가 낮아졌다. 이것은 알칼리 pH에 변성되어 침전된 양이 많기 때문이며 그래서 비활성도 42%만 남았다. 그리고, α -CD가 존재하면(3) 존재하지 않을 때(5)보다 주피크의 높이가 높았다. 이것은 α -CD

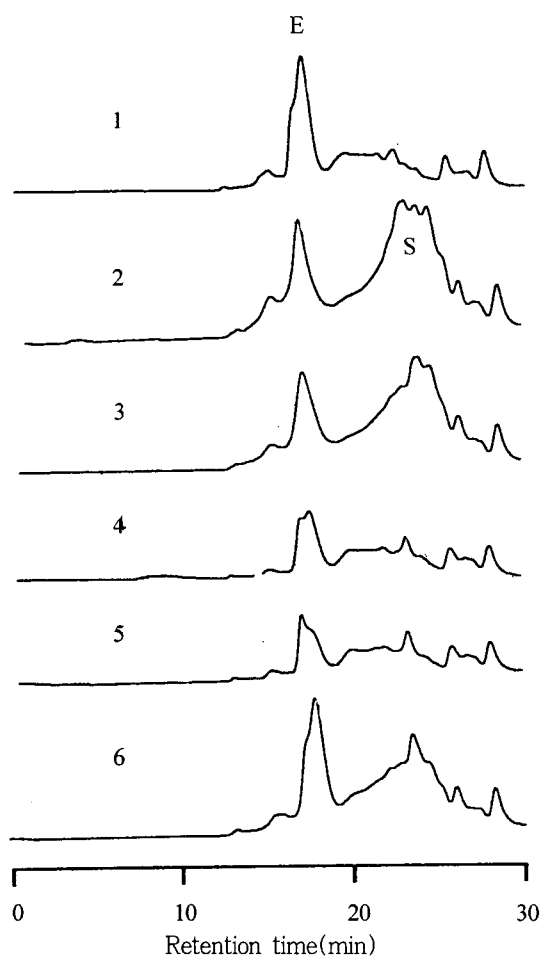


Fig. 1. HPLC patterns of barley β -amylase modified with IO_4^- -oxidized soluble starch. The enzyme (358 unit/ml) reacted with oxidized soluble starch (6 mg/ml) in 0.1M Tris-HCl buffer (pH 8.0) or 0.1M borate buffer (pH 9.7) at 37°C for 15 min. 1, native enzyme ; 2, modified enzyme in 0.1M borate buffer (pH 9.7) ; 3, modified enzyme in 2% α -CD and 0.1M borate buffer (pH 9.7) ; 4, native enzyme in 2% α -CD and 0.1M borate buffer (pH 9.7) ; 5, native enzyme in 0.1M borate buffer (pH 9.7) ; 6, modified enzyme in Tris-HCl buffer (pH 8.0) ; E, enzyme ; S, oxidized soluble starch ; column, SynChropak GPC 100 (1×30 cm) ; elute, 0.1M K-phosphate buffer (pH 6.8) containing 0.2M NaCl ; flow rate, 0.7 ml/min ; detect, 280 nm.

가 효소의 안정제로 작용하였기 때문이다.

변형시킨 효소의 유출시간은 16.919분인데 반해 변형시키지 않은 효소의 유출시간은 17.635을 나타냈다.

유출시간이 약간 빨라진 것은 변형으로 효소에 당이 부가되어 분자량이 커졌기 때문이다.

3. 열안정성

60°C에 대한 열안정성은 pH 9.7에서 변형시킨 효소의 경우는 α -CD를 가하여 변형시켰거나 가하지 않고 변형시켰거나 별 차이 없이 매우 낮았다. pH 8.0에서 α -CD 존재 하에서 변형시킨 효소와 변형시키지 않은 효소를 비교한 결과 60°C에서 5분부터 15분 정도까지는 변형시킨 효소의 안정성이 증가하였으나 15분 후부터는 차이가 없어져서 20분 후부터는 활성이 거의 없어졌다. 안정성 증가 폭은 변형효소는 10분 뒤에 비활성의 8%가 남은 반면 비변형 효소는 4.5%만 남았다(Fig. 2).

4. pH 안정성

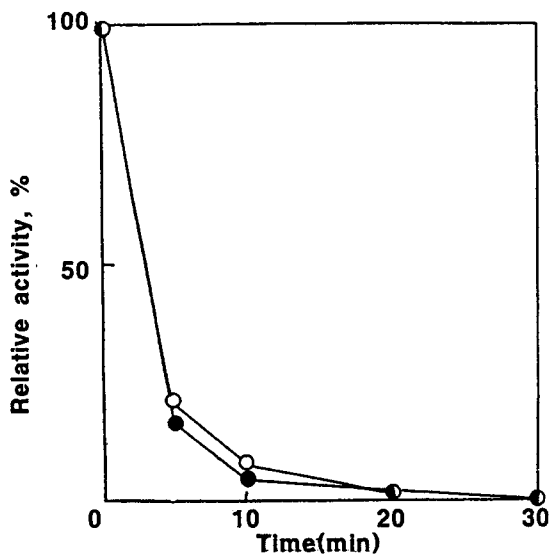


Fig. 2. Thermal stability of barley β -amylase modified with IO₄-oxidized soluble starch. The enzyme (300 unit) was reacted with 2.4 mg of oxidized soluble starch in 0.4 ml of 0.25M Tris-HCl buffer (pH 8.0) at 37°C for 10 min and diluted with 0.1M acetate buffer (pH 5.5) to 10 folds. Then, 200 μ l of the mixture was incubated at 60°C for each time and diluted with 0.1M acetate buffer (pH 5.5) and its activity was assayed. The native enzyme was treated in the same conditions in the absence of oxidized soluble starch. ●, native enzyme ; ○, modified enzyme in the presence of α -CD, and analyzed thermal stability in the presence of α -cyclodextrin.

변형시킨 효소는 안정성이 증가하였고, α -CD는 안정성을 더 증가시켰다. 그리고 pH 9.7보다는 8.0에서 변형시킨 효소의 안정성이 훨씬 높았다. pH 8에서 변형한 효소의 안정성은 α -CD 존재 하에서 변형시킨 후 α -CD 존재하에서 pH 안정성을 측정한 효소 > 변형만 한 효소 > α -CD 존재시의 비변형 효소 > 비변형 효소의 순으로 낮아졌다. Fig. 3은 α -CD 존재 하에서 변형시킨 후 α -CD 존재하에서 pH 안정성을 측정한 효소와 변형시키지 않은 효소의 결과로, 변형 효소나 비변형 효소는 모두 pH 7과 8에서는 안정성이 같았으나 변형효소는 pH 2와 6, pH 7과 12 사이에서 안정성이 매우 증가되었다. 이중 가장 안정성이 증가한 것은 α -CD 존재 하에서 변형시킨 후 α -CD 존재 하에서 pH 안정성을 측정한 효소이다. 그래서 pH 3에서의 잔존활성은 변형하지 않은 효소는 3%를 나타내는데 불과하지만 변형효소는 55%, α -CD 존재시에 변

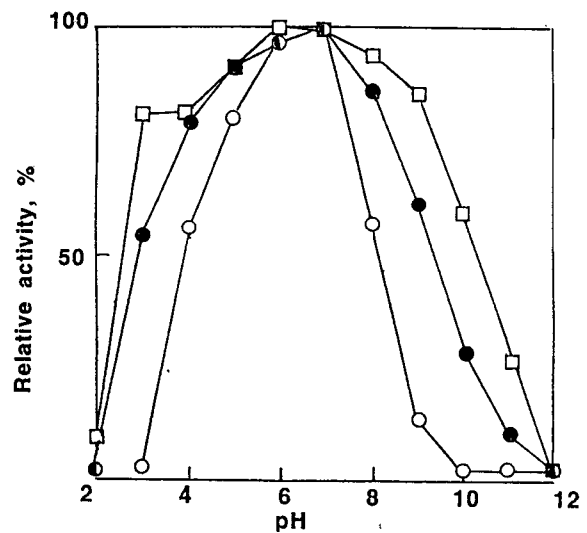


Fig. 3. pH stability of barley β -amylase modified with IO₄-oxidized soluble starch. The enzyme (300 unit) was reacted with 2.4 mg of oxidized soluble starch in 0.4 ml of 0.25M Tris-HCl (pH 8.0) at 37°C for 10 min. Then, 50 μ l of the mixture was added on 0.95 ml of 0.1M Britton-Robinson buffer (each pH) and incubated at 37°C for 2 hour and the mixture diluted with 0.1M acetate buffer (pH 5.5) to 100 folds and its activity was assayed. The native enzyme was treated in the same conditions in the absence of oxidized soluble starch. ○, native enzyme ; ●, modified enzyme ; □, modified enzyme in the presence of α -cyclodextrin, and analyzed pH thermal stability in the presence of α -cyclodextrin.

형한 효소는 80%를 나타냈고, pH 9에서의 잔존활성은 변형하지 않은 효소는 15%에 불과하였지만 변형 효소는 60%, α -CD 존재시에 변형한 효소는 80%를 나타냈다(Fig. 3).

고 찰

당단백질에서 당부분을 제거하면 안정성이 떨어지는 경우가 많다. 이것은 거꾸로 안정성이 약한 단백질에 당을 입히면 안정성이 증가할 수 있다는 것을 의미한다. 그래서 본 연구자는 인공적으로 당단백질을 만드는 방법을 개발하여 효소의 안정성이 증가한다는 사실을 밝혔다^{5,6)}.

당단백질을 얻는 방법은 천연 당단백질을 분리하는 방법, 효소를 이용하여 합성하는 방법, 화학적으로 결합시키는 방법, 물리적으로 결합시키는 방법 등이 있다.

다른 화학 물질에 의한 변형은 독성 때문에 또, 반응이 복잡하여 식품산업이나 의약품 산업에 사용하기 힘들지만 염가이며, 식품인 당을 상온에서 단시간에 간단히 부가시킬 수 있기 때문에 본 방법은 식품산업과 의약품산업에 폭넓게 사용할 수 있다.

본 방법은 단백질 분자 표면의 리신의 ϵ -NH₂기와 산화당의 CHO기와의 Schiff염기 형성에 의하고 있으므로 이를 이용하여 염가인 전분 등의 당류와 유기자원 중 가장 막대하며 저렴한 cellulose를 산화시켜 간단한 직접반응으로 효소 및 미생물을 고정화시킬 수 있다.

그래서 전보를 통하여 여러 효소에 대한 안정화 작용을 확인하였다.

본 연구에서는 아밀라아제의 경쟁적 저해제인 α -CD 역시 보리 β -아밀라아제에 대해서도 안정성을 증가시킨다는 사실도 확인하였다.

요 약

과요오드산-산화전분으로 보리 β -amylase(Biozyme ML, 일본 아마노제약)를 변형시켜서 인공당단백질을 만들었다. pH 8.0에서 변형한 효소는 비변형 효소의 92%, pH 9.7에서 변형한 효소는 42%의 활성이 남았다. 60°C에서의 열안정성은 α -cyclodextrin (α -CD) 존재 시에 변형하여 α -CD 존재시 분석한 효소는 10분 뒤에 비활성의 8%가 남은 반면 변형하지 않은 효소는 4.5% 밖에 남지 않았다. pH 안정성은 변형시켜서 α -CD 존재 하에 분석한 효소가 가장 높아서

pH 2~5와 7~12에서 안정성이 매우 증가하였다. HPLC 분석 결과 효소는 두 개의 피크를 나타냈으며 변형시킨 것은 당결합으로 분자량이 커져서 유출시간이 약간 빨라졌다.

참고문헌

1. 楠本正一 : インタビュー, バイオインダストリ, 3, 2~4 (1991).
2. N. シャロン著/大澤利昭譯 : 糖蛋白質. 複合糖質. 學會出版センター, p19~27 (1986).
3. N. シャロン著/大澤利昭譯 : 糖の機能. 複合糖質. 學會出版センター, p109~130 (1986).
4. 近畿バイオインダストリ振興會議 : 通産省は次世代で『複合糖質生産利用技術』の開発. バイオインダストリ, 3, 5~6 (1991).
5. 안용근 : 과요오드산 산화당에 의한 인공 당단백질의 조제, 한국식품과학회지, 31, 62~67 (1999).
6. 안용근 : 과요오드산 산화당에 의한 인공 당단백질의 조제 메카니즘, 한국식품과학회지, 31, 482~487 (1999).
7. 安龍根 : 甘著 β -アミラーゼに関する研究. 大阪市立大學博士學位論文 (1989).
8. Ann, Y. G., Iizuka, M., Yamamoto, T. and Minamiura, N. : Evidence for existence of an active monomer of sweet potato β -amylase, *Agric. Biol. Chem.*, 53, 3109~3110 (1989).
9. Ann, Y. G., Iizuka, M., Yamamoto, T. and Minamiura, N. : Preparation and some properties of active monomer of sweet potato β -amylase, *Agric. Biol. Chem.*, 54, 769~774 (1990).
10. Ann, Y. G., Iizuka, M., Yamamoto, T. and Minamiura, N. : Active monomer of sweet potato β -amylase: Stabilization and an improved preparation method using α -cyclodextrin, *J. Ferment. Bioeng.*, 70, 75~79 (1990).
11. Minamiura, N., Ann, Y. G., Iizuka, M., Ito, K. and Yamamoto, T. : Preparation of an active monomer from sweet potato tetrameric β -amylase in the presence of α -cyclodextrin, *Denpun Kakaku*, 38, 153~157 (1991).
12. 安龍根, 南浦能至 : IO₄-산화전분 변형 β -아밀라아제의 안정성 및 α -cyclodextrin의 영향, 한국식품영양학회지, 11, 159~164 (1998).
13. Ann, Y. G., Anindyawati, T., Ito, K., Iizuka M. and Minamiura N. : Stabilization of amylolytic enzymes by modification with periodate-oxidized soluble starch, 한국식품영양학회지, 11, 561~564 (1998).
14. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. : Coloric metric method for determ-

ination of sugars and related substances, *Anal. Chem.*,
28, 350~356 (1956).

Chem., 153, 375~380 (1944).

15. Nelson N. : A photometric adaption of the Somogyi
method for the determination of glucose, *J. Biol.*

(2000년 8월 10일 접수)