

## 과요오드산 산화당에 의한 효소의 안정성

금 종 화

대전보건대학 식품영양과

### Stabilization of *Bacillus licheniformis* $\alpha$ -Amylase by Modification with IO<sub>4</sub>-Oxidized Soluble Starch

Jong-Hwa Keum

Dept. of Food and Nutrition, Daejeon Health Science, College,  
Gayangdong 77-3, Donggu, Daejeon 300-092, Korea

#### Abstract

NaIO<sub>4</sub>-oxidized soluble starch was added to *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amylase by Schiff base reaction to make glycoprotein. Thermal stability at 100°C, in 10 minutes, proved high in the order of enzyme modified at pH 9.7, enzyme modified at pH 8.0 and native enzyme, respectively. But when  $\alpha$ -cyclodextrin ( $\alpha$ -CD) was used to modification and stabilization, the result showed no big difference. Modified enzyme under  $\alpha$ -CD at pH 8.0 shows highest stability in pH 8~11, while low in the pH 5~7, compared to the other enzyme. Native enzyme at pH 9.7 gradually increased up to pH 13 from pH 5, enzyme under  $\alpha$ -CD at pH 9.7 increased from pH 5 to 7 and little by little decreased up to pH 13. Native enzyme under  $\alpha$ -CD peaked pH 7 and pH 10, and lowered sharply after pH 12. As molecular weight became larger than native enzyme, HPLC retention time of modified enzyme quickened. The molecular weight proved large in the order of modified enzyme at 9.7, enzyme modified at pH 8.0, and native enzyme.

Key words : stabilization of *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amylase, modification of *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amylase, periodate-oxidized soluble starch.

#### 서 론

당은 전세기 초부터 우수한 연구 결과가 얻어져 있었으나 영양원 이외의 생물학적 의의를 발견하지 못하여 오랫동안 중심적 과제가 되지 못하였다. 그러나 근래 당의 중요성이 발견되고 있다.

당단백질은 구조단백질, 운반체 단백질, 면역계 단백질, 호르몬, 인터페론, 효소 등 생체의 주요 구성성분이다. 당단백질은 세포 사이, 분자 사이, 분자와 세포 사이의 인식마커와 정보전달자로서 여러 생명현상에 관여하여 생체 대사와 활성발현을 조절한다. 이것

은 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 조제하기 위해 노력하고 있다. 이를 탄수화물공학이라 하며, 유전자공학과 단백질공학에 이어 제3의 바이오테크놀러지로 주목받고 있다.<sup>1~4)</sup>

† Corresponding author :Jong-Hwa Keum

안<sup>5-6)</sup>은 싼 재료를 사용하여 쉽고, 간단한 방법으로 무해하고 유용한 기능성 당단백질을 조제하고자 NaIO<sub>4</sub>-산화 전분 및 말토올리고당을 단백질과 반응시켜 당단백질을 만드는 방법을 개발하였다. 분자 표면에 리신의 ε-NH<sub>2</sub>기가 존재하는 효소와 단백질은 이 방법으로 당단백질로 조제할 수 있으며, 안은 이 방법<sup>7-11)</sup>으로 고구마 β-아밀라아제에 산화당을 부가하여 고구마 β-아밀라아제의 서브유니트 구조와 기능을 해석한 바 있고, 여러 아밀라아제의 안정성을 증가시키는 결과를 확인한 바 있다.

본 과제는 효소를 인공당단백질로 만들어서 안정성이 증가된 효소를 생산할 수 있는가 확인하는데 목적이 있다. 그래서 값싼 재료를 사용하여 쉽고, 간단한 방법으로 무해하고 유용한 기능성 당단백질을 조제하고자 NaIO<sub>4</sub>-산화 전분을 *Bacillus licheniformis*의 α-아밀라아제와 반응시켜서 시프염기로 공유결합시켜서 안정성을 확인한 결과이다.

## 실험 재료 및 방법

### 1. 재료

효소는 네덜란드 노보사에서 생산되는 *Bacillus licheniformis*의 내열성 α-아밀라아제(상품명 Teramyl)를 사용하였다. 과요오드산과 가용성 전분은 일본 國產化學 제품을 사용하였다.

### 2. 환원당 정량

Somogy-Nelson법<sup>11)</sup>을 사용하였다. 즉, 시료액 0.4 ml에 Somogyi-Nelson A시약 1ml를 가하여 100°C에서 10분간 가열한 다음 B시약 1ml를 가하여 나머지를 물로 채워 25ml로 하였다. 이 반응액을 분광광도계를 사용하여 500nm에서 글루코오스를 표준으로 비색정량하였다.

### 3. 총당 정량

페놀-황산법<sup>12)</sup>을 사용하였다. 즉, 당시료 1ml에 5% 페놀 1ml를 가하고 황산 5ml를 가하여 발색시킨 다음 490nm에서 글루코오스를 표준물질로 비색정량하였다.

### 4. α-아밀라아제 활성 측정

0.1M 아세트산 완충액(pH 4.8) 중에서 끓여 녹인 0.2% 가용성 전분 0.2ml와 효소액 0.2ml를 37°C에서 10분간 반응시킨 다음 Somogyi-Nelson A 시약 1ml를 가하여 반응을 중지시키고, 100°C에서 10분간 가열하였다. 식힌 다음 Somogyi-Nelson B시약 1ml를 가하고 증

류수로 채워 25ml로 하여 분광광도계로 말토오스를 표준으로 500nm에서 비색정량하였다. 1 Unit는 1분간에 말토오스 1 μmol을 유리하는 효소량으로 하였다.

### 5. NaIO<sub>4</sub>에 의한 가용성 전분의 산화

가용성 전분 2g을 100ml의 0.2M NaIO<sub>4</sub> 용액에 현탁하여 4°C에서 40분간 교반하여 반응시킨 다음 에틸렌글리콜 10ml를 가해 미반응의 NaIO<sub>4</sub>를 소모 제거시킨 다음, 증류수에 투석하여 동결건조하였다.

### 6. pH 8.0에서의 당 부가

pH 8.0의 0.5M Tris-HCl 완충액에 효소 0.2ml와 pH 9.7의 0.1M 붕산완충액 2.5ml에 산화전분 30mg을 녹인 용액 0.2ml를 37°C에서 10분간 반응시켜서 사용 직전에 조제한 1M NaBH<sub>4</sub>-HCl 용액(pH 7.5) 0.4ml를 가한 후 0.1M 아세트산 완충액(pH 5.5) 7.2ml를 가해 100°C에서 열처리하여 잔존활성을 측정하였다. 대조 효소는 산화전분만 가하지 않은 점만 제외하면 상기와 동일하다.

### 7. pH 9.7에서의 당부가

증류수에 녹인 효소 0.2ml와 pH 9.7의 0.1M 붕산완충액 2.5ml에 산화전분 30mg을 녹인 용액 0.2ml를 37°C에서 10분간 반응시킨 것 외에는 상기 6과 동일하였다.

### 8. α-Cyclodextrin(α-CD) 존재시와 비존재시의 열안정성

pH 9.7의 변형조건에서 당부가시와 활성 측정시 α-CD를 2% 가한 것과 가하지 않은 것을 비교하였다.

### 9. 열안정성 측정

상기 6 및 7과 같이 40배 희석한 효소액을 60°C에서 0분, 5분, 10분, 20분, 30분 간격으로 0.2ml씩 취해 0.1M 아세트산완충액(pH 5.5) 9.8ml에 가하여 최종적으로 2,000배 희석하고 그중 0.5ml를 기질(2% 가용성 전분/0.1M 아세트산완충액, pH 5.5) 0.5ml에 가해 37°C에서 10분간 반응시켜서 Somogyi-Nelson법으로 비색정량하여 잔존활성을 측정하였다.

### 10. pH 안정성 측정

효소액 50 μl를 pH 2에서 pH 12까지의 0.1M Britton-Robinson의 광역완충액 0.95 ml에 가하여 37°C에서 2시간 항온한 후 0.1M 아세트산완충액으로 100배 희석하여 그중 0.5ml를 기질(2% 가용성 전분/

0.1M 아세트산 완충액, pH 5.5) 0.5 ml에 가하여 10분 간 반응시킨 다음 Somogyi-Nelson법으로 비색정량하여 잔존활성을 측정하였다.

11. 효소의 HPLC

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

결 과

1. 열안정성

*Bacillus licheniformis*의  $\alpha$ -아밀라아제(상품명 Terymyl)는 강한 내열성을 갖기 때문에 100°C에서 열안정성을 측정하였다. pH 8.0 및 pH 9.7에서 변형한 효소, 비변형 효소의 열안정성을 측정한 결과 안정성은 Fig. 1과 같이 10분 뒤부터 pH 9.7에서 변형한 효소 > pH 8.0에서 변형한 효소 > 비변형 효소의 순으로 높았다(Fig. 1).

이같이 pH 9.7에서 변형한 효소의 안정성이 높기 때문에 다시 pH 9.7에서  $\alpha$ -cyclodextrin( $\alpha$ -CD) 존재

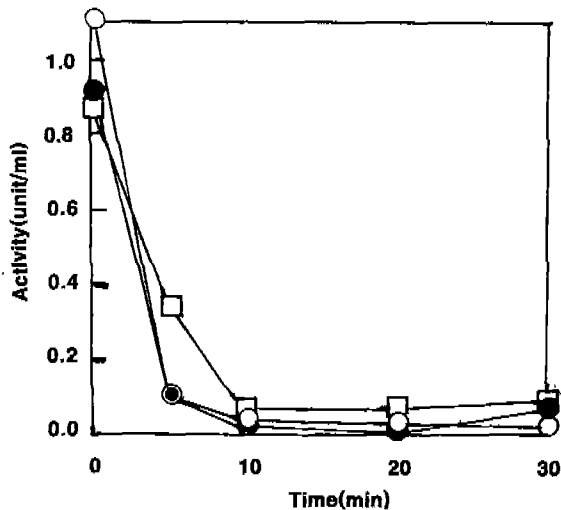


Fig. 1. Thermal stability of *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amylase modified with  $\text{IO}_4$ -oxidized soluble starch. Enzyme : ●. Native in 0.1M Britton-Robinson buffer(pH 8.0); ○. modified in 0.1M borate buffer(pH 8.0); □. modified in 0.1M borate buffer(pH 9.7).

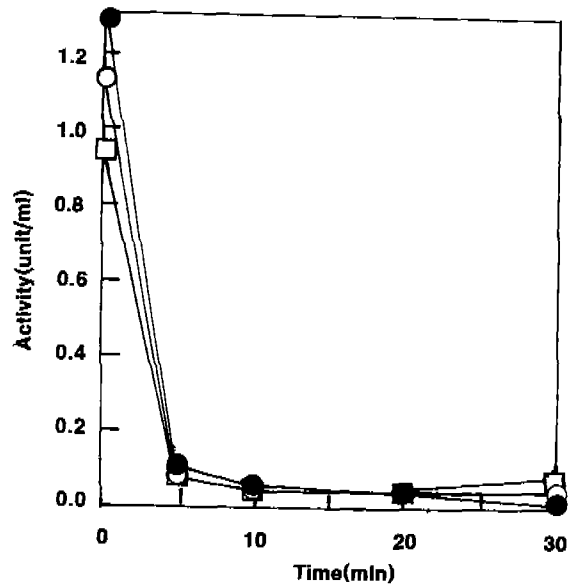


Fig. 2. Thermal stability of *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amylase modified with  $\text{IO}_4$ -oxidized soluble starch. Enzyme : ●. Native in 0.1M Britton-Robinson buffer(pH 9.7); ○. modified in 0.1M borate buffer(pH 9.7) containing 2% of  $\alpha$ -CD; □. modified and activity assayed in 2%  $\alpha$ -CD and 0.1M borate buffer(pH 9.7).

및 비존재시의 안정성을 분석하여 Fig. 2의 결과를 얻었다. 안<sup>5-9)</sup>은  $\alpha$ -CD가 아밀라아제의 안정성을 증가시킨다는 사실을 밝혔기 때문이다. 그래서 pH 9.7에서 변형한 것, pH 9.7  $\alpha$ -CD 존재 하에서 안정성을 측정한 것,  $\alpha$ -CD 존재하 pH 9.7에서 변형한 후  $\alpha$ -CD 존재 하에 잔존활성을 측정한 것은 Fig. 2와 같이 큰 차이는 나지 않았으나 30분 뒤에는  $\alpha$ -CD 존재 하에서 변형한 후  $\alpha$ -CD 존재하에서 안정성을 측정한 것 >  $\alpha$ -CD 존재하에서 변형한 것 > 비변형 효소의 순으로 안정성을 나타냈다(Fig. 2).

2. pH 안정성

pH 안정성은 Fig. 3과 같이 pH 8.0에서  $\alpha$ -CD 존재 하에 변형한 효소는 pH 8~11의 알칼리 쪽에서 가장 높은 안정성을 나타냈으나 pH 5~7 사이에서는 다른 효소보다 낮았다. pH 9.7에서 변형하지 않은 효소는 pH 5부터 pH 13까지 서서히 증가하였고 pH 9.7에서  $\alpha$ -CD 존재 하의 효소는 pH 5부터 7까지 증가하다가 그 후 pH 13까지 서서히 감소하였다.  $\alpha$ -CD 존재 하의 비변형 효소는 pH 7과 10에서 피크를 나타낸 다음 pH 12 이후에는 급격히 낮아졌다.

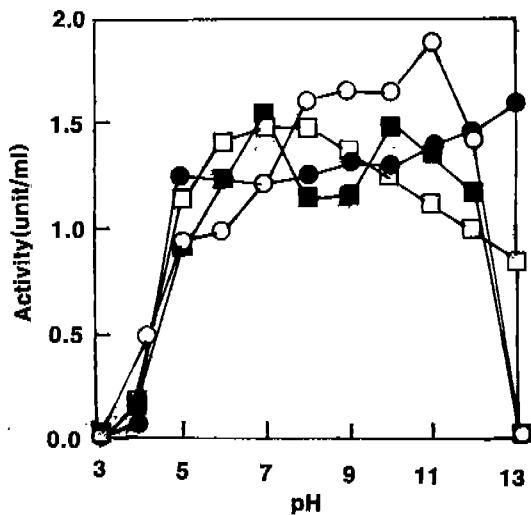


Fig. 3. pH stability of *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amylase modified with  $\text{IO}_4$ -oxidized soluble starch. Enzyme : ●, Native in 0.1M Britton-Robinson buffer (pH 9.7); □, 2%  $\alpha$ -CD in 0.1 M borate buffer (pH 9.7); □, modified in 2%  $\alpha$ -CD and 0.1M borate buffer (pH 9.7); ○, modified in 2%  $\alpha$ -CD and 0.1M borate buffer (pH 8.0).

이상과 같이  $\alpha$ -CD 존재하 pH 8.0에서 변형한 것만 pH 9~11 사이에서 안정성이 증가되었다. 그리고, 변형으로 모두 pH 안정 범위가 변동되고 있다.

### 3. 분자량 변화

HPLC로 변형한 효소와 변형하지 않은 효소의 분자량 차이를 살펴 본 결과, 비변형 효소는 유출시간 19.3분을 나타낸 데 반해 pH 9.7에서 변형한 효소는 17.3분으로 빨리 유출되어 분자량이 커진 것으로 나타났다. pH 8.0에서 변형한 효소는 19.0분을 나타내 pH 9.7에서 변형한 효소보다는 작지만 비변형 효소보다는 큰 것으로 나타났다(Fig. 4).

## 고 찰

당단백질을 얻는 방법은 천연 당단백질을 분리하는 방법, 효소를 이용하여 합성하는 방법, 화학적으로 결합시키는 방법, 물리적으로 결합시키는 방법 등이 있다.<sup>17)</sup> 천연 당단백질을 분리 조제하는 것은 정제기술과 경비 때문에 한계가 있고, 효소에 의한 합성은 해당 효소나 기질을 생산, 정제하기가 어려워 구입할 수 없거나, 물리적 방법은 결합이 불안정한 경우가 많다. 화

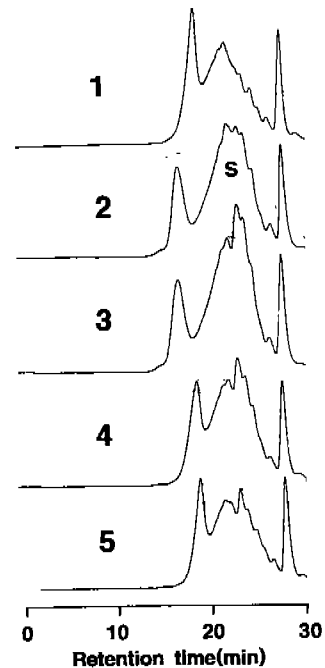


Fig. 4. HPLC of *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amylase modified with  $\text{IO}_4$ -oxidized soluble starch. Enzyme: 1. Native; 2. modified in 0.1M borate buffer (pH 9.7); 3. modified in 2%  $\alpha$ -CD and 0.1M borate buffer (pH 9.7); 4. modified in Tris-HCl buffer (pH 8.0); 5. native in 0.1M borate buffer (pH 9.7). E. enzyme; S, oxidized soluble starch.

학적 방법은 식품에 허용된 첨가물질이 아니면 사용할 수 없고, 반응으로 단백질이 변성되는 등 제약이 많다.

그러나 본방법은 다른 시약에 비하여 싸고, 안전한 식품인 전분을 재료로 사용하며, 산화와 당단백질 조제 방법이 간단하여 중성 pH, 상온에서 10분 정도의 반응으로 당단백질을 만들 수 있고, 단백질 변성이 거의 일어나지 않는다.<sup>5-9)</sup> 그러므로, 과요오드산 산화당은 효소와 단백질의 안정성, 점성, 유화성, 용해성, 방부성 등을 향상시키기 위한 당단백질 조제에 사용할 수 있다.

인<sup>5-9)</sup>은 고구마  $\beta$ -아밀라아제를 산화 가용성 전분과 산화말토덱사오스로 변형시켜서 크로마토그래피와 HPLC로 서브유니트 구조를 밝혔고, 이들 산화당으로 고구마  $\beta$ -아밀라아제를 비롯한 여러 단백질을 변형시켜서 당단백질을 만들어서 당이 결합된 것으로 보고하였다. 그 결과, 단백질의 염색밴드는 당의 PAS 염색 밴드와 일치하여 당이 결합된 것으로 나타났다.

그러나, 안의 방법으로 제조된 인공당단백질에 결합되는 당은 고리가 열려서 알데히드가 생긴 다음

환원되어 당알콜로 된 것이기 때문에 천연 당이 아니다. 그래서 식품단백질에 결합한 당은  $\alpha$ -1,4-글루칸과 구조가 달라져서 아밀라아제가 가수분해하지 못한다. 그리고, 당 결합량이 많으면 단백질의 펩티드 결합에도 단백질 가수분해효소가 작용하기 힘들어서 소화성이 떨어지게 된다. 그러나 이 성질을 거꾸로 이용하여 다이어트 식품의 개발이나, 식물섬유로서 이용할 수 있을 것이다. 효소가 작용하기 힘들다는 것은 부패하기 힘들다는 것을 의미하므로 방부제를 사용하지 않고도 화장품의 물성화제로 사용할 수도 있을 것이다.

본 결과에서 HPLC 분석 결과, 변형한 효소는 분자량이 커져서 효소에 당이 결합한 것으로 확인된다. 그러므로 앞으로, 본방법으로 만든 당단백질 효소와 식품 당단백질의 기능과 물성을 분석하여 바람직한 면을 찾아 내는 연구가 이어져야 할 것이다.

### 요 약

$\text{NaIO}_4$ -산화 전분당을 *Bacillus licheniformis*의  $\alpha$ -아밀라아제와 반응시켜서 시프염기 형성으로 당단백질로 변형시켜서 안정성을 확인하였다. 100°C에서의 열안정성은 10분 뒤에, pH 9.7에서 변형한 효소 > pH 8.0에서 변형한 효소 > 비변형 효소의 순으로 높았다. 그러나 변형 및 안정성에  $\alpha$ -cyclodextrin ( $\alpha$ -CD)을 사용한 결과 큰 차이는 나지 않았다.

pH 8.0에서  $\alpha$ -CD 존재 하에 변형한 효소는 pH 8~11의 알칼리 쪽에서 가장 높은 안정성을 나타냈으나 pH 5~7 사이에서는 다른 효소보다 낮았다. pH 9.7에서 변형하지 않은 효소는 pH 5부터 pH 13까지 서서히 증가하였고 pH 9.7에서  $\alpha$ -CD 존재 하의 효소는 pH 5부터 7까지 증가하다가 그후 pH 13까지 서서히 감소하였다.  $\alpha$ -CD 존재 하의 비변형 효소는 pH 7과 10에서 피크를 나타낸 다음 pH 12 이후에는 급격히 낮아졌다. 변형한 효소는 HPLC의 유출시간이 빨라져서 변형하지 않은 효소보다 분자량이 큰 것으로 나타났다. 분자량 크기는 비변형 효소 < pH 8.0에서 변형한 효소 < pH 9.7에서 변형한 효소의 순으로 컸다.

### 감사의 글

본과제는 2000년도 대전보건대학 교내 학술연구비 지원으로 이루어졌다.

### 참고문헌

1. Seiichi, H. : Glycoproteins (in Japanese), *Bioindustry*, 3, 2~4 (1991).
2. Sharon, N. : Glycoproteins (in Japanese). In *Complex Carbohydrates*, Addison-Wesley Publish Co. Inc., Mass., p.19~27 (1975).
3. Sharon, N. : Function of sugar. In *Complex Carbohydrates*, Addison-Wesley Publish Co. Inc., Mass., p.109~130 (1975).
4. Association of Kinki Bioindustry : Technics of complex carbohydrate by the ministry of international trade and industry (in Japanese). *Bioindustry*, 3, 5~6 (1991).
5. Ann, Y. G. : Studies on sweet potato  $\beta$ -amylase. Ph. D. Thesis, Osaka City Univ., Japan (1989).
6. Ann, Y. G., Iizuka, M., Yamamoto, T. and Minamiura, N. : Evidence for existence of an active monomer of sweet potato  $\beta$ -amylase (in Japanese), *Agric. Biol. Chem.*, 53, 3109~3110 (1989).
7. Ann, Y. G., Iizuka, M., Yamamoto, T. and Minamiura, N. : Preparation and some properties of active monomer of sweet potato  $\beta$ -amylase, *Agric. Biol. Chem.*, 54, 769~774 (1990).
8. 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, 75~79 (1990).
9. 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 Kakaku*, 38, 153~157 (1991).
10. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. : Coloric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.*, 28, 350~356 (1956).
11. Nelson, N. : A photometric adaption of the Somogyi method for the determination of glucose, *J. Biol. Chem.*, 153, 375~380 (1944).
12. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. : Coloric metric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.*, 28, 350~356 (1956).
13. Zacharius, R. M., Zell, T. E., Morrison, J. H. and Woodlock, J. J. : Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels, *Anal. Biochem.*, 30, 148~152 (1969).
14. Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 222, 680~685 (1970).
15. Matsudaira, P. T. and Burgess, D. R. : SDS-Microslab linear gradient polyacrylamide gel electrophoresis, *Anal.*

- Biochem.*, 87, 386~396 (1978).
16. Iizuka, M. : Studies on *Candida utilis*의 invertase (in Japanese). Ph. D. thesis, Osaka city univ., Japan (1979).
17. Sharon, N. : Biosynthesis of glycoprotein. In Complex

Carbohydrates, Addison-Wesley Publish Co. Inc.,  
Mass., p73~86 (1975).

---

(2001년 6월 1일 접수)