

## 격자화 효소결정; 전자이동 증개체에 대한 알콜 탈수소 격자화 효소결정의 안정도

李 康 民

전북대학교 자연대학 분자생물학과  
(2000. 11. 27 접수)

### Cross-Linked Enzyme Crystal(CLEC); Stability of Horse Liver Alcohol Dehydrogenase CLEC against Electron Transfer Mediators

Kang-Min Lee

Department of Molecular Biology, Chonbuk University, Chonju 561-756, Korea  
(Received November 27, 2000)

**요 약.** 효소결정을 격자화하여 안정화한 CLEC은 생촉매제로써 뿐아니라 효소센서로 이용할 수 있다. 전자이동 증개체로 사용되고 있는 PMS는 HLADH에 대하여 가장 효율적인 전자이동 활성도를 가졌다. NQS는 PMS에 비하여 52%, phenothiazine은 37%, ferrocene aldehyde는 35%의 전자 이동 활성도를 가졌다. HLADH는 용액상태에서 PMS, NQS에 대하여 매우 불안정하였다. 반면에 HLADH-CLEC은 용액상태에서 불안정했던 PMS, NQS, ferrocene aldehyde에 대하여 매우 안정하였다.

**ABSTRACT.** Stabilized Cross-linking Enzyme Crystals(CLEC) can be used as not only biocatalysts but also as enzyme sensors. PMS(Phenylmethyl Sulfate)was shown more efficiency than any other electron mediator transfers toward HLADH(Horse Liver Alcohol Dehydrogenase)that were examined. NQS(naphtoquinonesulphonate), phenothiazine and ferrocene aldehyde had respectively just 52%, 37%, 35% electron transfer efficiency as compared to PMS. HLADH-CLEC was very stable toward electron transfer mediators such as PMS, NQS and ferrocene aldehyde in which HLADH-solution was unstable.

## 서 론

효소는 물질을 식별하고, 인식하고 반응하는데 있어서 매우 선택적이므로 효소를 사용하여 물질을 분석하려는 노력은 1940년부터 시도되어 왔다. 최근에는 혈액 중의 혈당 측정, 혈 지질 측정, 식품분석, 자동제어 센서분야에서 효소센서를 사용하고자 시도하고 있다. 효소센서는 매우 선택적으로 물질을 분별할 수는 있지만 화학센서와 비교하여 안정성이 낮다. 이러한 단점을 극복하기 위해 많은 연구가 활발하게 진행되고 있으나 아직도 어려움이 있다. 효소센서를 개발하기 위하여 효소의 안정화에 관한 연구가 절실히 필요하다. 효소를 안정화하기 위한 여러 가지 방법들이 연구되고 있으며, 현재 여러 가지 방법을 통하여 안정화된 효소를 얻는

것이 가능해졌다. 극한조건에서 서식하고 있는 미생물과 세포로부터 효소를 분리한 후, 유전공학 기술을 이용하여 분리한 안정한 효소를 합성, 변형하여 더욱 안정한 효소를 생산하고자 하는 연구가 행하여지고 있다. 효소를 안정화하는 또 다른방법은 다양한 효소 고정화방법이다. 최근에는 그 중에서 효소결정을 격자화하는 방법(CLEC: Cross-Linking Enzyme Crystals)이 주목받고 있다. 효소를 결정화하여 격자화하면 효소는 더욱 안정해지며, 높은 활성도를 유지하며, 유기용매와 단백질분해효소에 대하여 매우 안정하다는 사실이 확인되었다.<sup>1,2</sup> 효소결정이 격자화된 CLEC은 수용액상에서 녹지 않는, 안정한 생촉매제로서 생물공학분야에 이용될 수 있음이 증명되었다.

본 연구에서 우리는 이미 3차 구조를 알고 있는 말

간에서 분리한 알콜탈수소효소의 결정을 격자화하여 CLEC을 제조하고 그 특성을 조사한 후 CLEC을 새로운 효소센서로 이용하기 위한 목적으로 전자이동 중간체에 대한 CLEC의 안정도를 연구하였다. 이와같이 CLEC을 효소센서에 응용하려는 시도는 현재로서는 잘 알려지지 않은 미개척 분야이다.

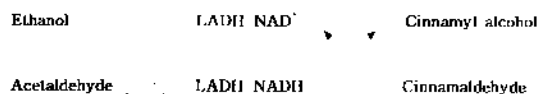
## 실 험

HLADH(horse liver alcohol dehydrogenase)는 Boehringer Mannheim으로부터 구입하였다. Glutaraldehyde, PMS(phenylmethyl sulfate), quinone, NQS(naphtoquinone-sulphonate), ferrocene aldehyde, phenothiazine, biphenol, quinazine, ferrocene, ferrocyanide, methylene blue와 같은 화합물은 Sigma(St. Louis, USA)로부터 구입하였다. 유기용매인 MPD(2-methyl-2,4-pentandiol), DMSO, acetonitrile은 HPLC용 고순도 용매를 재증류하여 사용하였다. 분석기기로는 UV-Visible 분광기기(Beckman DU-7500, USA)와 고성능 액체크로마토그래피(HPLC: Waters, USA)를 사용하였다.

**Horse liver에서 분리한 알콜탈수소효소의 결정화.** 알콜탈수소효소의 결정화는 Boehringer Mannheim으로부터 구입한 효소를 원심분리하여 침전물을 50 mM TES pH7.0 완충용액으로 만든 0.2 M sodium chloride 용액으로 녹인 뒤, 원심분리한 뒤 50 mM TES pH7.0 완충용액에 대하여 하루동안 부석하였다. 이 효소용액 1 ml을 투석막에 넣은 뒤 5 mg NADH, 0.5 ml DMSO를 포함한 50 mM TES pH7.0 완충용액 10 ml이 있는 용기에 넣고 12시간동안 평형상태를 만든 후 정제된 MPD(2-methyl-2,4-pentandiol)을 0.1 ml씩 결정이 보일 때까지 매일 넣어주었다. 효소결정이 나타나면 0.2 ml씩 25%가 될 때까지 넣어 안정화한 후 냉장고에 보관하여 사용하였다.

**효소결정의 격자화.** 효소결정을 격자화하기 위하여 25% glutaraldehyde를 사용하였다. 결정화에 사용한 부석막에 있는 외부용액에 crosslinker로서 glutaraldehyde를 넣고 일정 시간 반응시킨 후 CLEC을 부석막에서 꺼내어 50 mM TES pH7.0 완충용액에 넣어 보관하였다. 최적의 CLEC을 만들기 위하여 glutaraldehyde의 농도를 1~10%까지, 반응시간은 0.5~5시간까지 변화를 주면서 격자화한 효소결정의 활성도를 조사하였다.

**CLEC의 활성도 결정.** CLEC의 활성도 결정을



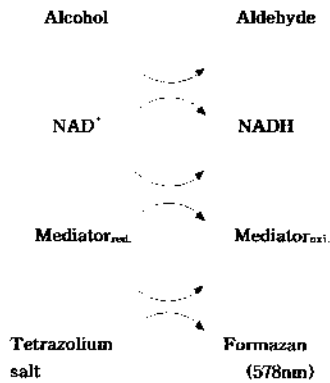
Scheme 1. Redox reaction catalysed by horse liver alcohol dehydrogenas.

ultrafiltration cell(Amicon, USA)에서 하였다. Ultrafiltration의 막은 XM-300을 사용하였다. 이 막은 분자량 300,000까지 통과시킬 수 있으므로 결정으로부터 결정화되지 않은 효소용액을 분리할 수 있다. CLEC을 cell에 넣고 반응시킨 후 질소 공기압력으로 격자화되지 않은 용액을 제거한 후, 50 mM TES pH7.0 완충용액으로 CLEC을 여러번 세척하였다. 보조효소와 효소용액과 CLEC을 완전히 분리하기위하여 여과액이 250-280 nm에서 흡광도를 갖지 않을 때까지 세척하였다. CLEC의 활성도는 Scheme 1과 같은 방법으로 결정하였다.

CLEC과 기질용액을 반응시킨다음 상층액을 분리하여 HPLC를 사용하여 cinnamaldehyde와 cinnamyl alcohol을 분리한 후에 효소의 활성도를 결정하였다. 반응 후 상층액을 cyclohexane으로 추출한 후 농축하여 C<sub>18</sub>-reverse phase 칼럼이 장착되어 있는 HPLC를 사용하여 분석하였다. 용매는 acetonitrile-water(1:1)을 사용하였으며, 유속은 1 ml/min으로, UV-detector는 260 nm에서 측정하였다.

**효소 활성도에 미치는 전자 이동 중개체의 효과.** 일반적으로 사용되는 나유과 같은 전자 이동 중개체가 알콜탈수소효소와 반응하여 전자를 이동할 수 있는가를 연구하였다. 이 연구에 사용된 전자 이동 중개체는 PMS(phenylmethyl sulfate), quinone, phenothiazine, NQS(naphtoquinone sulphonate), ferrocene aldehyde, biphenol, quinazine, ferrocene, ferrocyanide, methylene blue가 사용되었으며 반응조건은 10  $\mu$ l ethanol, 250  $\mu$ l 2 mM tetrazolium, 20  $\mu$ l 0.1 M NAD<sup>+</sup>, 100  $\mu$ l 10 mM mediator, 5  $\mu$ l HLADH 10 mg/ml에서 실험하였다. Scheme 2와 같은 couple assay에서 전자이동 중개체가 전자를 이동시키면 578 nm에서 formazan이 생성되므로 UV로 측정하였다.<sup>5</sup>

**기질물질농도 결정의 최적 전자 이동 중개체의 농도 결정.** 선택한 전자 이동 중개체가 보조효소의 농도에 비례하여 작용하는가를 연구하였다. 위의 연구를 통하여 효소에 활성도가 큰 PMS, NQS, ferrocene aldehyde



Scheme 2. Coupled redox system.

를 선택하였다. 보조효소의 농도는 0.1-1 mM이었고 전자 이동 중개체의 농도는 50 μM, tetrazolium salt의 농도는 0.25 mM 이었다.

**격자화 효소결정안정도에 미치는 전자 이동 중개체의 효과.** 전자 이동 중개체를 효소센서에 사용하기 위하여는 효소가 전자 이동 매개체에 대하여 안정해야하므로 CLIC의 안정도에 미치는 전자 이동 매개체의 영향을 연구하였다. 본 실험에서 사용한 PMS, NQS, ferrocene aldehyde, tetrazolium 전자 이동 중개체가 CLEC의 안정도에 미치는 영향을 연구하였다. 0.5 mM 전자 이동 중개체 용액에 CLEC을 단위시간(1-4시간) 놓은 후 1 mM cinnamylaldehyde과 10분동안 반응시킨 후 HPLC를 사용하여 CLIC의 활성도를 결정하였다. 효소용액과 비교하기 위해 위의 농도보다 5배 희석된 0.1mM mediator에 효소 10 μg을 넣고 단위시간(1-4시간) 방치한 후, 10 mM NAD<sup>+</sup>, 4 M ethanol을 넣고 효소용액의 활성도를 결정하였다.

### 결과 및 고찰

알콜 탈수소효소(HLADH:horse liver alcohol dehydrogenase)를 안정화하기 위하여 효소불결정화한 후 glutaraldehyde로 격자화하여 CLEC을 제조하였다. CLIC 제조과정은 두 단계로 요약된다. 그것은 효소의 결정화와 효소의 격자화이다. 효소 결정화는 일정한 형태로 만들어진다. 효소결정의 크기와 모양은 용매, 산도, 온도, 효소 농도, 혼합속도와같은 조건에 따라 달라진다. 효소 결정이 잘 성장하여 크고 안정하면 구조결정에 적절하지만, CLEC의 제조에는 세밀한 미세결정(microcrystals)이 더 적합 할 수 있다. 미세결정안에

서는 기질 물질이 더 용이하게 효소의 활성부위에 접근할 수 있기 때문이다. 효소결정의 격자화에 있어서 CLEC의 안정도와 활성도를 높게 하기 위해서는 그 격자화조건이 중요하다. Crosslinker가 효소결정을 격자화하지 못하면 결정이 불안정하고 수용액상에 쉽게 용해된다. 반대로 효소결정이 격자화가 많이되면 CLIC의 안정도는 증가하고 수용액상에서 잘 용해되지 않으나, 기질이 효소의 활성자리에 접근하지 못하게되어 활성도는 자연히 감소한다. 격자화 시약으로는 glutaraldehyde가 가장 널리 사용되고 있다. 효소결정을 효율적으로 격자화하기 위하여 glutaraldehyde의 농도(1-10%), 반응시간(0.5-5시간)을 조절하여 최적의 CLEC을 제조하였다. Glutaraldehyde의 농도가 너무 낮거나 반응시간이 너무 짧으면 효소가 제대로 격자화되지 않아서 여러번 CLEC을 세척한 후에도 CLEC으로부터 효소가 계속 용해되어 나온다. 반대로 Glutaraldehyde의 농도가 너무 높거나 반응시간이 너무 길면 효소가 너무 많이 격자화되어서 기질물질이 격자화 효소결정안으로 잘 확산되지 않아서 역시 활성도는 낮아졌다. 여러번 CLIC 효소의 활성도와 안정도를 조사한 결과 1% glutaraldehyde에서 1시간동안 반응할 때 가장 높은 활성도와 안정도를 가졌다. 효소결정이 격자화되면 단백질 사이의 상호작용이 증가하여 단백질의 안정도가 증가하였다. 즉 단백질이 결정화되고 단백질 분자 사이에서 상호작용이 증가하여 더욱 안정하게 된다. 이와 같이 효소결정을 glutaraldehyde로 격자화하면 crosslinker에의하여 단백질의 본래의 구조가 유지되어 열, 유기용매에 대해 안정하게 된다.<sup>4,6,7</sup> 제조된 CLEC은 수용액상에서 녹지 않으며, 용액효소에 비해서 효소 활성도가 낮다. CLIC의 활성도는 0.17 mmol/min.mg enzyme 이었다. 반면에 효소 용액은 0.65 mmol/min.mg enzyme 이었다. 결정 효소의 활성도가 용액상태의 효소의 활성도에 비하여 낮은 이유 중 하나는 결정상이 접촉면이 달라져서 효소의 기질과 생성물의 확산속도(diffusion effect)가 다르기 때문이다. 효소결정이 성장하는데 결정의 길이와 형태는 일정하게 자란다. 그러나 효소결정의 활성도는 결정의 길이보다 결정 입자의 두께에 의하여 결정된다. 보통 결정의 두께가 5 μm이하인 경우에는 확산속도에 영향을 주지 않지만, 그 이상에서는 확산속도에 영향을 주어 효소의 활성도가 변하게된다.<sup>8</sup> 효소의 활성도는 또한 기질물질의 크기에 의존한다. 단백질 결정은 30-65%가 용매이므로 용매

Table 1. Relative activity of various mediator on alcohol dehydrogenase from horse liver

Mediator	Relative activity
Phenazin metho sulfate	100
Naphto quinone sulphonate	52
Phenothiazine	37
Ferrocene aldehyde	35
Quinone	0.5
Biphenol	0
Quinazoline	0
Ferrocene	0
Ferricyanide	0
Methylene blue	0

로 채워진 채널(channel)을 통하여 기질과 생성물은 결정 안쪽으로 쉽게 이동한다. 채널의 크기보다 작은 기질물질은 결정 안으로 쉽게 확산되어 효소의 활성부위에서 쉽게 반응할 수 있다. 반면에 기질물질이 채널보다 크면 결정 내부로 들어갈 수 없다. 따라서 결정 표면에서만 반응이 가능하므로 효소결정의 활성도는 용액효소에서보다 훨씬 낮게 나타날 수 있다.<sup>9</sup> 효소 결정에서 활성도에 영향을 주는 또 다른 요소는 구조적 유연성이다. 같은 효소라도 결정 형태에 따라 기질물질이 활성부위에 쉽게 접근할 수도 있고 못 할 수도 있다.<sup>10</sup> CLEC의 낮은 활성도를 극복하기 위하여 새로운 방법이 연구되고 있다. 유기용매 상에서 여러가지 계면활성제 용액으로 CLEC을 세척한 후 건조하여 분말을 만들 수 있다. 계면활성제는 소수성 기질물질이 채널을 쉽게 통과하도록 하여 효소의 활성부위에 쉽게 접근하도록 한다. 여기서 계면활성제의 역할은 CLEC의 활성도를 높여 주는 것이다.

효소의 안정도에 더하여 효소전극이 극복해야하는 또 다른 문제는 전하이동 증개체이다.

효소의 활성부위에서 일어나는 전자의 변화를 전극 표면까지 전달하기 위해서 일반적으로 보통 전자 이동 증개체를 사용한다. 그러나 이 물질이 이온성이고 레니 칼을 가지고 있어서 효소를 불안정하게 한다. CLEC을 효소전극에 사용하기 위해서 전하이동 증개체에 대하여 안정해야 하며 전자를 효과적으로 이동시켜야 하므로 CLEC이 전자 이동 증개체에 대한 활성도와 안정도를 연구하였다. 일반적으로 사용되는 PMS(phenyl-methylsulfate), ferrocene aldehyde, biphenol, quinone, phenothiazine, NQS(naphtoquinone sulphonate), quinazine, ferrocene, ferrocyanide, methylene blue같은 전자 이

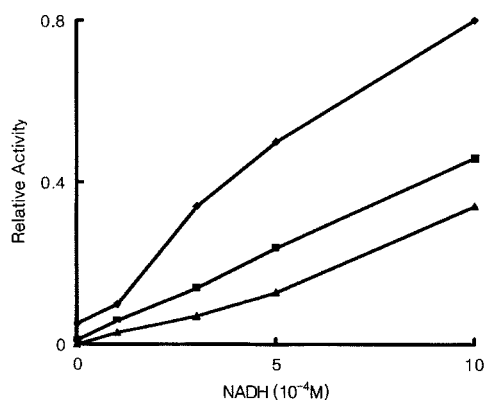


Fig. 1. Relative activity of various mediators on concentration of coenzyme (NADH) of alcohol dehydrogenase of horse liver. PMS(◆); NQS(■); Ferrocene aldehyde(▲).

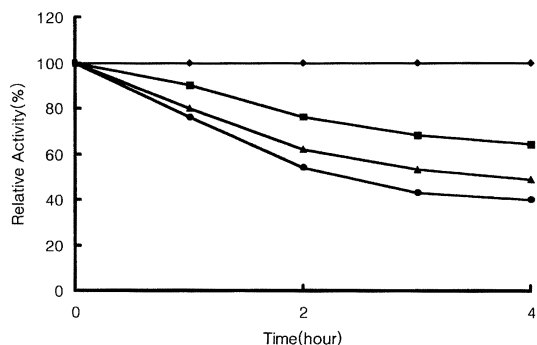


Fig. 2. Enzyme stability of HI.ADH in solution against various mediator. Tetrazolium salt(◆); Ferrocene aldehyde(■); PMS(▲); NQS(●).

동 증개체가 효소와 반응하여 전자를 이동할 수 있는가를 연구하였다.<sup>12-14</sup>

Table 1에서 보는 바와 같이 가장 효율적인 전자 이동 증개체는 PMS이었다. NQS는 PMS에 비하여 52%, phenothiazine은 37%, ferrocene aldehyde는 35%의 전자 이동 활성도를 가졌다. 그러나 biphenol, quinazoline, ferrocene, ferrocyanide, methylene blue는 이 효소에 대하여 거의 전자를 이동 시키지 못하였다.

전자 이동 증개체에 대한 효소의 안정도를 살펴 보았다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 알콜 탈수효소는 용액상태에서는 전자 이동활성도가 좋은 PMS, NQS에 대하여 매우 불안정하였다. 0.1 mM 전자 이동 증개체 용액에서 4시간 후에 활성도는 50% 이상 감소하였다. Ferrocene aldehyde에 대하여는 보다 안정하였으며, couple redox system에 필요한 tetrazolium salt에 대

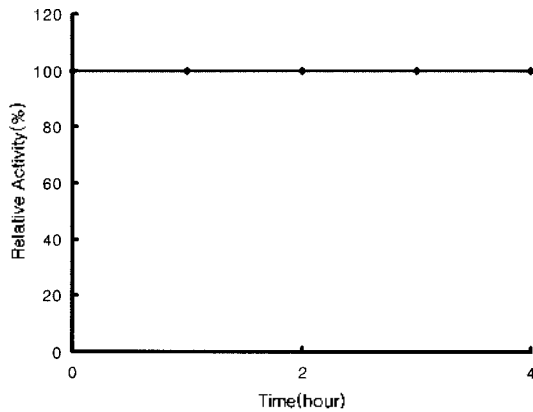


Fig. 3. Enzyme stability of HLADH in CLEC against various mediator. Tetrazolium salt; Ferrocene aldehyde; PMS; NQS(◆).

하여는 활성도가 변하지않고 유지되었다. 반면에 HLADH-CLEC은 용액상태에서 불안정했던 PMS, NQS, ferrocene aldehyde에 대하여도 매우 안정하였으며 Fig. 3에서 보여주는 바와같이 용액상태에서 불안정하였던 PMS, NQS에 대하여도 안정하였다. 이들은 농도가 5배 진한 용액에서 24시간이 경과한 후에도 거의 동일한 활성도를 유지하였다. 대부분의 전자이동 중개체는: 이온과 라디칼을 가지고 있어서 용액상태에서는 효소를 비활성화시키 불안정하지만 격자화효소결정에서는 안정하였다. 전자이동 중개체가 효소기질의 농도에 비례하여 전자이동을 중재하는가를 연구하였다. 도식 2에서 볼 수 있듯이 formazan의 생성은 보조효소의 농도는 밀접한 관련이 있다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 HLADH에 전자이동 활성도를 갖는 PMS, NQS, ferrocene aldehyde가 보조효소의 농도에 비례하여 tetrazolium salt로부터 formazan을 생성함을 알 수 있다. Table 1과 일치하게 PMS가 전자를 가장 잘 전달하며 보조효소의 농도에 따라 비례함을 알 수 있다. 이 결과로 볼 때 PMS는 HLADH에 가장 적합한 전자이동 중개체이며, PMS는 효소용액을 비활성화시키지만 CLEC에 대하여는 매우 안정함을 보여주었다. 효소결정이 효소활성도를 유지할 수 있음과 유기용매에 대하여 매우 안정하다는 사실은 알려져 있다. Carboxypeptidase A 효소결정이 효소활성도를 가지고 있음을 처음으로 밝혔다.<sup>3</sup> 그 이후로 격자화 효소결정: 유기용매에도 안정하여 실제적으로 의약품합성에 이용할 수 있게 되었지만 격자화 효소결정을 효소센서에도 이용

할 수 있음은 아직까지 알려지지 않았다. 이러한 상황에서 본 연구 결과는 CLEC을 효소센서에 응용할 수 있는 가능성을 분명히 보여준다.<sup>15,16</sup>

### 결론

효소결정화를 통하여 효소를 안정화할 수 있으며 효소결정을 격자화하여 안정화한 CLEC은 생촉매제로서 뿐만아니라 효소센서로 이용될 수 있음을 보여주었다. 본 연구는 HLADH-CLEC을 효소센서에 응용하기 위하여 전자 이동 중개체에 대한 CLEC의 안정도와 전자이동 활성도를 연구하였다. 보통 전자이동 중개체로 사용되고 있는 PMS(phenylmethyl sulfate), quinone, phenothiazine, NQS(naphtoquinonesulphonate), ferrocene aldehyde, biphenol, quinazine, ferrocene, ferrocyanide, methylene blue 중에서 PMS가 가장 효율적인 전자이동 중개체였다. 같은 농도의 PMS에 비하여 NQS는 52%, phenothiazine은 37%, ferrocene aldehyde는 35%의 전자 이동 효율성을 나타냈다. HLADH는 용액상태에서 PMS, NQS에 대하여 매우 불안정하였다. 반면에 HLADH-CLEC은 용액상태에서 불안정했던 PMS, NQS, ferrocene aldehyde에 대해서도 매우 안정하였다.

본 연구는 1998년도 한국학술진흥재단 연구비에 의한 결과이며, 이에 감사드립니다.

### 인용 문헌

- Lee, K. M.; Blaghen, M.; Samama, J. P.; Biellmann, J. F. *Bioorg. Chem.* **1986**, *14*, 202.
- Dorscher, M. S.; Richards, F. M. *J. Biol. Chem.* **1963**, *238*, 2399.
- Spilberg, C. A.; Bethune, J. L.; Vallee, B. L. *Biochemistry* **1977**, *16*, 1142.
- Clair, N. L.; Navia, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7314.
- Abdallah, M. A.; Biellmann, J. F. *Eur. J. Biochem.* **1980**, *112*, 331.
- Khalaf, N.; Govardhan, C.; Valonde, J. J.; Persichetti, R. A.; Wang, Y. F.; Margolin, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5494.
- Solvov, S. B.; Bartozko-Maik, A.; Oeschger, T. R.; Montchiano, M. M. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 7751.
- Quicho, F. A.; Richard, F. M. *Biochemistry* **1967**, *5*, 4062.

9. Perichetti, R. A.; Clair, N. L.; Griffith, J. P.; Navia, M. A.; Margolin, A. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 2732.
  10. Rubin, B. *Struc. Biol.* **1994**, *1*, 568.
  11. Broos, J.; Visser, J. W. G.; Engbersen, J. F. J.; Verboom, W.; Vanhoek, A.; Reinhoudt, D. N. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *117*, 12657.
  12. Smolander, M.; Livio, H. L.; Rasanen, L. *Biosensor and Bioelectronic* **1992**, *7*, 637.
  13. Massa, F. M.; Farias, R. N. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1982**, *104*, 1623.
  14. Person, B.; Lan, H. L.; Gorton, L.; Okamoto, Y.; Hale, P. D.; Boguslavsky, L. L.; Skotheim, T. *Biosensor & Bioelectronic* **1993**, *8*, 81.
  15. Wang Y.; Yakovlevsky, K.; Zhang, B.; Margolin, A. L. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 3488.
  16. Lalonde, J. J.; Govardhan, C.; Khalf, N.; Martinez, A. G.; Visuri, K.; Margolin, A. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 6845.
-