

전기자극에 의한 알콜 산화효소의 활성도와 안정도연구

이강민* · 김경숙 · 박충웅
전북대학교 자연과학대학 분자생물학과
(2003. 12. 22 접수)

Activity and Stability of Alcohol Oxidase from *Hansenula* sp. by Electrostimulation

Kang-Min Lee*, Kyung-Suk Kim, and Chung-Ung Park

Department of Molecular Biology, College of Natural Science, Chonbuk University, Chonju 561-756, Korea
(Received December 22, 2003)

요 약. 전기자극에서 알콜 산화효소의 활성도와 안정도를 연구하였다. 알콜 산화효소의 활성도와 안정도는 전기 출력전압, 자극시간, 자극기간, 자극간격에 따라 달라진다. 전기자극에 의하여 비활성화 효소 활성도는 당, 중합체, 히드로겔과 같은 안정화 첨가제에 의하여 회복되었다. 이 효소에 전기자극을 40 V, 10분 주었을 때 완충용액에서는 활성도가 전혀 없었지만 10% 트레할로스 용액에서는 52%의 활성도를 유지하였다. 전기자극하에서 효소를 안정화시킬 수 있음은 효소를 생물공학과 의료공학에 널리 이용할 수 있는 가능성을 보여준다.

주제어: 전기자극, 알콜 산화효소, 안정도

ABSTRACT. We investigated the activity and stability of alcohol oxidase from *Hansenula* sp. under the electric stimulation. The activity and stability of alcohol oxidase depended on electric output voltage, stimulation time, pulse duration and pulse interval. This inactivation of the enzyme under electric stimulation could be recovered by stabilizing additives such as sugars, polymers and hydrogels. The enzyme activity retained about 52% in 10% trehalose solution under electric stimulation with 40 V and 10 min. The stabilizing of enzymes against electric stimulation showed a great potential use of enzymes in biotechnology and medical engineering fields.

Keywords: Electrostimulation, Alcohol Oxidase, Stability

서 론

전기자극은 생명현상에 많은 영향을 준다. 전기자극은 세포수준에서 세포내의 단백질합성, 핵산의 변형, 효소의 활성화, 호르몬분비, 세포의 막 투과성, 골모 세포의 활성화에 많은 영향을 주며 조직수준에서 골격근 수축, 평활근 수축, 피부 조직 재생에 효과가 있음이 밝혀졌다.¹⁻⁵ 최근 생물공학에서 효모와 같이 세포벽이 두꺼운 세포에 유전자를 주입한다든지 세포의 증식을 가속화하는데 전기자극이 이용되고 있으며 의료공학에서 근육 마비환자의 재활치료나 신경마비환자의 신경치료에

전기자극을 널리 응용하고자 시도하고 있다. 그러나 이들 전기자극이 생체물질에 어떠한 영향을 주며, 어떠한 기작에 의해서 작용되는지 구체적인 연구는 거의 진행되어 있지 않다.

본 연구는 전기자극이 생체 단백질인 효소의 활성도와 안정도에 어떠한 영향을 주는가를 연구하고 비활성 효소를 여러 가지 안정화 첨가제를 사용하여 안정화시키는 방법을 연구하였다. 본 연구에 사용한 효소는 최근 바이오센서에 널리 사용하고 있는 알콜 산화효소이다. 알콜 산화효소는 보조 인자가 필요 없이 자체적으로 FAD를 가지고 있는 octamer이다.^{6,7}

실 험

Hansenula sp.로부터 분리한 알콜 산화 효소, peroxidase는 Sigma(St. Louis, USA)에서 구입하였다. 완충용액은 50 mM Potassium phosphate(pH 7.0) 완충용액을 사용하였다. 효소안정화에 필요한 CMC(carboxymethylchitosan), agarose, carbopol, trehalose, mannose, maltose, sucrose, fructose, inisitol, Dulcitol, BSA(bovine serum albumin), TritonX-100, Tween-80은 Sigma에서 구입하여 사용하였다. 전기자극기는 BDS-301 Digital Stimulator (Biotron, 한국) 모델을 사용하였다.

전기자극기. 국내 바이오트론에서 제작한 BDS-301 Digital Stimulator 모델을 사용하였다. 이 실험기구는 생리학, 생분학, 임상연구에 사용하는 것으로 출력전압은 0.01 V~100 V, 자극의 강도, 양상, 시간을 조절하여 연구하였다.

알콜 산화효소 활성도 결정. 알콜 산화 효소 활성도는 couple assay 방법으로 측정하였다. 알콜 산화효소는 산소 존재 하에 알콜을 산화시키고 과산화수소를 만든다. 과산화 수소는 peroxidase 존재 하에 ABTS(2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt)와 반응하여 생성되는 물질을 UV-visible 분광기를 사용하여 420 nm에서 활성도를 측정하였다.

전기자극하에서 알콜 산화효소 활성도 결정. 전기자극 실험은 완충용액의 최종농도가 5 µg 알콜 산화효소, 250 mM methanol, 25 µg peroxidase, 50 µM ABTS 조건에서 효소 활성도를 결정하였다. 효소 안정도실험은 1 ml 반응조에 완충용액, 1 mg 효소를 넣은 후 전기자극기를 사용하여 출력 전압, 강도와 시간을 조절하면서 자극을 주었다. 자극 후 효소용액을 5 µl 취하여 위와 같은 조건에서 효소 활성도를 측정하였다.

전기자극하에서 히드로젤에 의한 알콜 산화효소 안정화. 전기자극을 받으면 효소는 비 활성화 된다. 비 활성화된 효소가 여러 가지 히드로젤에 의하여 안정화되는 연구를 하였다. 히드로젤은 CMC, agarose, carbopol을 사용하였다. 히드로젤은 농도가 증가할수록 점성도가 증가해서 어느 농도 이상에서는 효소 활성도를 측정할 수 없기 때문에 1% 농도에서 실험하였다. 1% 히드로젤 용액에 효소를 넣고 자극을 준 후 기질물질을 넣고 위와 같은 효소 활성도 실험 조건에서 반응시켜 생성되는 물질을 UV-visible 분광기를 사용하여 420 nm에서 활성도를 측정하였다. 히드로젤을 넣지 않고 전기

자극을 가한 효소 활성과 비교하였다. 전기자극하에서 당에 의한 알콜 산화효소 안정화, 여러 가지 당을 사용하여 효소 안정화를 연구하였다. 사용한 당으로 trehalose, mannose, maltose, sucrose, fructose, inisitol, dulcitol을 사용하였다. 20% 당 용액에 효소를 넣고 자극을 준 후 기질물질을 넣고 위와 같은 효소 활성도 실험 조건에서 반응시켜 UV-visible 분광기를 사용하여 420 nm에서 효소 활성도를 측정하였다.

전기자극하에서 계면활성제에 의한 알콜 산화효소 안정화. 효소 안정화 물질로 BSA, TritonX-100, Tween-80과 같은 계면활성제를 사용하였다. 효소 활성도는 위와 같은 방법으로 결정하였다. 1% 계면활성제용액에 효소를 넣고 자극을 준 후 기질물질을 넣고 반응시켜 위와 동일한 실험조건에서 효소 활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

전기자극의 출력전압, 자극지속시간, 자극지속간격을 다양하게 변화시켜가며 알콜 산화효소의 활성도를 확인하였다. 먼저 자극시간과 자극의 지속간격을 동일하게 설정하고, 출력전압을 변화시켜가며 그 효과를 확인하였다. Fig. 1에서 보는바와 같이 출력 전압이 0.5 V 이하에서 80분 이상 전기자극을 주어도 알콜 산화효소의 활성도는 변하지 않았다. 그러나 전기자극의 전압이 1 V 이상 가해지면 알콜 산화효소의 활성도는 감소하기 시작하였다(Fig. 1) 전압을 1 V에서는 40분 자극을

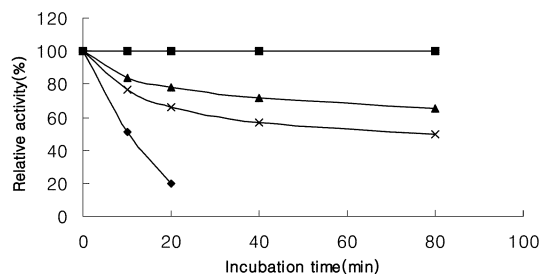


Fig. 1. Stability of alcohol oxidase from *Hansenula* sp. as variation of output voltage and incubation times. Electropulse is a single pulse repeating type and both pulse interval and pulse duration are 1 sec. Final concentrations of enzyme reaction mixture were 5 µg alcohol oxidase, 250 mM methanol, 25 µg peroxidase, 50 µM ABTS in 50 mM phosphate buffer (pH 7.0). 1mg/ml enzymes were stimulated at 0.5volt(■), 1volt(▲), 5volt(x), 20volt(◆). The activity was determined at 420 nm.

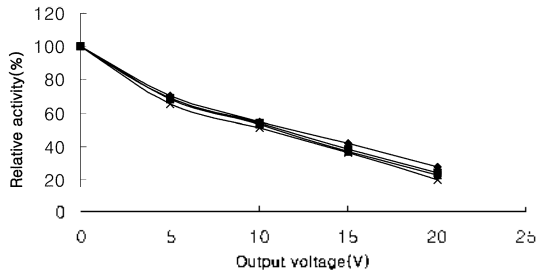


Fig. 2. Stability of alcohol oxidase from *Hansenula sp.* as variation of pulse duration(PD), pulse interval(PI) and output voltage. Electropulse is a single pulse repeating type and maintains for 10 min. Final concentrations of enzyme reaction mixture were 5 μ g alcohol oxidase, 250 mM methanol, 25 μ g peroxidase, 50 μ M ABTS in 50 mM phosphate buffer(pH 7.0). 1mg/ml enzymes were stimulated for 10min from 10 to 40V with PD and PI were equally each PD=PI=0.01 msec(x), PD=PI=0.1 msec (▲), PD=PI=1 msec(■), PD=PI=1 sec(◆). The activity was determined at 420 nm.

주면 30%이상의 활성도가 감소하였다. 20 V로 자극을 주면 10분 만에 50% 이상의 활성도가 감소하였다. 전기 자극의 전압이 증가할수록 효소는 비활성화 됨을 알 수 있었다. 전기 자극에 의한 효소의 비활성도가 전해질 속의 효소에 전기가 전해짐에 따라 발생할 수 있는 열에 의해 활성이 억제될 수 있다는 가능성도 배제할 수 없을 것이다. 알콜 산화효소는 출력전압 10 V, 자극 지속시간 80분, 자극지속간격 1초의 동일한 실험조건 조건하 에서 전해질의 온도는 거의 변하지 않았다. 그러므로 효소의 비활성화 전기자극의 전압에 의존함을 알 수 있었다. 효소의 활성도가 전기자극의 형태에 의존하는가를 알기 위하여 10분 동안 자극유지시간(PD) 과 자극간격시간(PI)를 동일하게 0.01 msec⁻¹ sec까지 변화 시켜 가면서 출력전압의 증가에 따른 알콜 산화효소의 활성을 측정하였다(Fig. 2) Fig. 2에서 보는 바와 같이 자극유지시간과 자극간격시간이 작을수록 알콜 산화 효소 활성은 더욱 저하되어 전기 자극의 효과가 미세하게 증가함을 확인할 수 있었다. 자극지속시간과 간격의 변화에 따른 알콜 산화효소 활성은 그 차이가 미세하여 경향을 명확하게 규정하기는 어려우나, 자극유지시간과 자극간격시간이 작을수록 알콜 산화효소에 전기 자극이 더욱 지속적으로 가해지기 때문에 전기자극의 전달이 효과적일 수 있다.

전기자극에 의하여 비활성화된 효소를 안정화하기 위하여 히드로젤을 사용하였다.* Fig. 3에서 보는바와

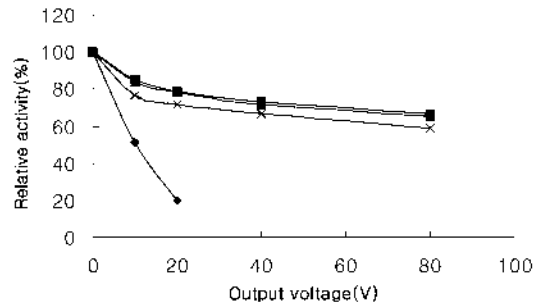


Fig. 3. Stability of alcohol oxidase *Hansenula sp.* from in 1% hydrogel solution. Electropulse is a single pulse repeating type and maintains for 10 min. Final concentrations of enzyme reaction mixture were 5 μ g alcohol oxidase, 250 mM methanol, 25 μ g peroxidase, 50 μ M ABTS in 50 mM phosphate buffer(pH 7.0). 1 mg/ml enzyme were stimulated in 1% hydrogels. CMC (■), agarose (▲), carbopol(x), without hydrogel(◆) from 10 to 80 V. The activity was determined at 420 nm.

같이 비활성화 된 효소는 1% CMC, agarose, carbopol 용액에서 거의 같은 비율로 안정화 되었다(Fig. 3) 효소를 20 V에서 10분 전기자극을 주었을 때 활성도는 거의 80%를 상실했지만 1% CMC, agarose, carbopol용액에서는 25-30% 밖에 상실되지 않았다. 이와 같이 히드로젤은 효소를 안정화 할 수 있다. 리파제와 혈청알부민(BSA) 같은 단백질도 히드로젤에 의하여 구조적으로 안정화됨이 보고되었다.*¹⁰

전기자극에 의하여 비활성화 된 효소를 당을 사용하여 안정화하는 방법을 연구하였다. Table 1에서 보는바와 같이 trehalose, mannose, maltose, sucrose, fructose, inisitol, dulcitol과 같은 여러 가지 당을 사용하여 안정

Table 1. Relative activity of alcohol oxidase from *Hansenula sp.* in 10% sugar solutions. Final concentrations of enzyme reaction mixture were 5 μ g alcohol oxidase, 250 mM methanol, 25 μ g peroxidase, 50 μ M ABTS in 50 mM phosphate buffer(pH 7.0)

Mediator	Relative acuity
No sugar	51
Trehalose	78
Mannose	72
Maltose	62
Sucrose	60
Fructose	58
Inisitol	57
Dulcitol	55

화 효과를 살펴보았다. Table 1에서 보는바와 같이 10% 당 용액에서 10분 동안 전기 자극을 준 다음 측정된 효소 활성도는 당이 없는 용액에서 보다 증가하였다. 효소는 안정화 되었다. 당에 의한 효소의 안정화는 많은 연구가 진행되고 있다. Chitosan, sucrose, raffinase, sorbitol, mannitol, glycerol이 invertase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, xylanase 효소를 안정화함이 알려져 있다.¹¹⁻¹⁴ 이 효소는 10% trehalose 용액에서 10분간 전기 자극을 주면 자극을 없는 상태에서 보다 78%의 효소 활성도를 갖는다. 그러나 이것은 10% trehalose 용액에서 당이 없는 상태에서 보다 효소활성도가 53% 증가되었음을 의미한다. 이와 같이 당은 효소를 전기 자극으로부터 안정화한다. 당에 의한 효소의 안정화는: trehalose, mannose, maltose, sucrose, fructose, inisitol, dulcitol 순서대로 효과 있었다. 이중 제일 효과 있는 trehalose, mannose, maltose를 선택하여 20% 당 용액에서 전기적 압을 80 V까지 증가시키면서 효소의 활성도를 측정하였다(Fig. 4). Fig. 4에서 보는 바와 같이 trehalose 용액에서 효소는 제일 안정화 되었다. 20% trehalose 용액에서는 수용액에서 활성도가 전혀 없는 40 V 전기자극 조건에서도 75%의 활성도를 유지하였다. 알콜 산화효소의 안정화 효과가 가장 우수한 trehalose을 선택하여 동일한 전기자극 조건에서 각 당의 농도에 따른 안정화 효과를 살펴보았다. 출력전압을 20 V, 자극지속시간은 10분, 자극지속간격을 1초의 조건으로 전기자극을 가했을 때, trehalose의 농도가 증가함에 따라, 전기자극에

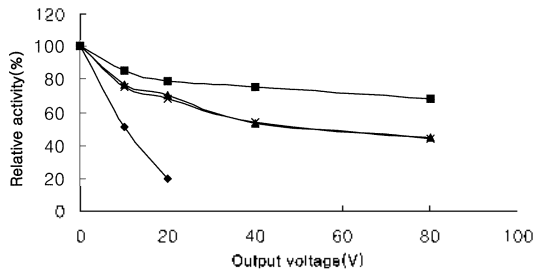


Fig. 4. Effect of 20% sugars on alcohol oxidase from *Hansenula sp.* under electric stimulation. Electropulse is a single pulse repeating type and maintains for 10 min. Final concentrations of enzyme reaction mixture were 5 μ g alcohol oxidase, 250 mM methanol, 25 μ g peroxidase, 50 μ M ABTS in 50mM phosphate buffer(pH 7.0). 1mg/ml enzyme were stimulated in the presence of 20% of trehalose(■), mannose(▲), maltose(x), without sugar(◆) from 10 to 80volt. The activity was determined at 420 nm.

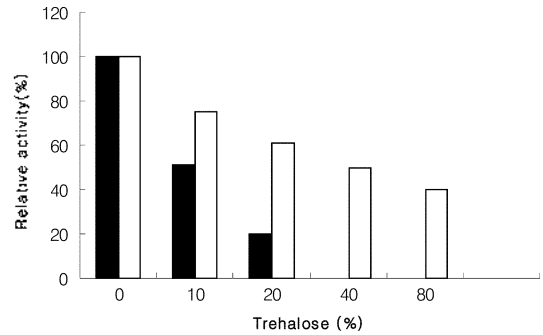


Fig. 5. Effect of trehalose on the stability of alcohol oxidase from *Hansenula sp.* under electric stimulation. Electropulse is a single pulse repeating type and maintains for 10 min. Final concentrations of enzyme reaction mixture were 5 μ g alcohol oxidase, 250 mM methanol, 25 μ g peroxidase, 50 μ M ABTS in 50 mM phosphate buffer(pH 7.0). 1 mg/ml enzymes were stimulated in the presence of 10% of trehalose (□) and no trehalose (■) from 10 to 80 volt. The activity was determined at 420 nm.

대하여 효소를 안정화함을 확인할 수 있었다(Fig. 5). trehalose의 농도가 10%인 상태의 알콜 산화효소에 자극지속시간을 10분, 자극지속간격을 1초로 고정하고 출력전압을 10 V, 20 V, 40 V, 80 V로 증가시키며 전기자극을 가했을 때 40 V에서는 주어진 조건의 전기자극이 알콜 산화효소활성 거의 없지만 10% trehalose가 존재 하던 알콜 산화효소 활성도는 52%이상 유지하였다. 이와 같이 trehalose는 단일당체, subtilisin와 같은 단백질질을 구조적으로 안정화 할 수 있다.^{15,16} 계면활성제는 효소를 안정화 시킬 수 있다(Fig. 6). 당뿐만 아니라 계면활성제 역시 단백질을 안정화 할 수 있으므로 SDS, CTAB, BSA, TritonX-100, Tween80와 같은 여러 가지 1% 계면활성제를 함유하는 용액에서 효소 안정도를 보았다. CTAB, SDS와 같은 이온계면활성제에서는 효소는 불안정하였다. 그러나 Fig. 6에서 보는바와 같이 1% BSA, TritonX-100, Tween 80 용액에서 거의 비슷하게 효소는 안정 하였다. 1% BSA용액에서 다른 비이온 계면활성제에서 보다 약 20%이상 안정하였다. 이와같이 BSA, TritonX-100, Tween 80와 같은 비이온 계면활성제는 다른 효소들도 안정화 하였다.^{17,18}

생체물질에 미치는 전기자극의 영향은 세포생물학과 생물공학에서 기본적인 기작연구 외에도 그의 응용 면에서 매우 관심 있는 분야이다. 최근 전기자극이 세포 분열, 효소반응, 효소합성, 막 이동이 변화할 수 있음이

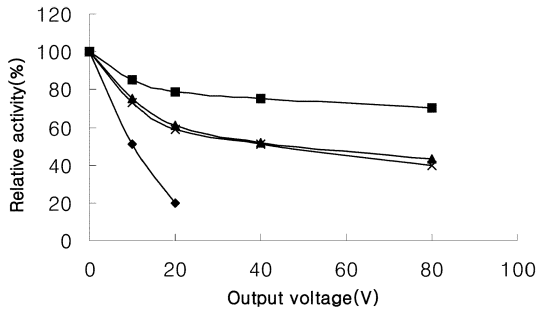


Fig. 6. Stability of alcohol oxidase from *Hansenula sp.* in 1% surfactants solutions. Electropulse is a single pulse repeating type and maintains for 10min. Final concentrations of enzyme reaction mixture were 5 μ g alcohol oxidase, 250 mM methanol, 25 μ g peroxidase, 50 μ M ABTS in 50 mM phosphate buffer (pH 7.0). 1 mg/ml enzymes were stimulated in 1% surfactants, BSA(■), TritonX-100(▲), Tween 80(x), without surfactant(◆) from 10 volt to 80 V. The activity was determined at 420 nm.

알려져 있다. 이러한 생명체와 전기자극에 대한연구는 아직 시작단계이며 Berg교수에 의하여 처음 연구되었다.¹⁹ Berg교수는 glutamic acid를 생산하기 위하여 발효에서 많이 사용되는 세균인 *Corynebacterium glutamicum* 은 전기자극하 glutamic acid를 생산하는데 많은 영향을 받는다는 사실을 발표하였다.^{19,20} 또한 전기자극에 의하여 면역도 증가 될 수 있다. 전기자극은 식물세포에서 면역에 관련되어 있는 막에 부착되어 있는 NADPH 산화효소를 활성화하여 면역을 증가시킨다.²¹ 전기자극에서 세포분화속도도 달라 질 수 있다. 인간 AMA 세포와 섬유조직은 50 Hz, 0.8 mT 전기장에서, 30분에서 노출 되었을 때 분화속도가 180% 증가하였다. 비슷하게 생체물질이 자기장에도 영향 받을 수 있는데 예를 들면 인간 lymphocyte도 PEMP(Pulsed electromagnetic field)에서 3일 동안 배양했을 때 분화속도가 증가 하였다. 이러한 효과는 젊은 사람의 lymphocyte 보다 나이가 든 사람의 경우에 더 확실하였다.^{22,23}

이와 같이 전기자극이 생체물질에 주는 영향은 연구가 되고 있으나 아직 효소 단백질에 미치는 전기자극의 효과는 연구되고 있지 않다. 전기자극과 생체물질의 연구는 산업적으로 매우 광범위하게 이용될 수 있다. 특히 제약 및 의료산업에 있어서 그 파급효과는 막대한 것이다. 효소반응에 전기자극을 사용하는 연구결과는 의약품 합성하는 반응조건에서부터 발효, 의약품산업에 이르기까지 광범위하게 이용될 수 있다.

결 론

효소 반응은 환경과 조건에 따라 상이한 활성도를 나타내며, 이러한 조건에서 효소들의 연구는 효소의 활성을 인위적으로 조절할 수 있게 되었다. 전기 자극에 의하여 효소는 비활성화 되었다. 비활성화 정도는 전압의 세기 전기자극의 형태 즉 PI, PD에 의존적이었다. 전기 자극에 의하여 비 활성화된 효소는 당, 히드록젠, 계면 활성제에 의하여 안정화되었다. 전기자극하에서 효소의 안정화에 대한연구는 생물공학, 단백질공학, 의약품학 분야에 널리 이용될 수 있으리라 사료된다.

이 논문은 2001년도 전북대학교의 지원 연구비에 의하여 연구되었음.

인 용 문 헌

- Hood, D. A.; Zak, R.; Pette, D. *Eur. J. Biochem.* **1989**, *179*, 275.
- Stebbins, C. L.; Brown, B.; Levin, D.; Longhurst, J.C. *J. Appl. Physiology.* **1988**, *65*, 1539.
- Rowley, B. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1972**, *139*, 929.
- Beg, H. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1995**, *38*, 153.
- Gumaley, I.; Augsten, K.; Berg, H. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1995**, *38*, 415.
- Boteva, R.; Visser, A.; Filippi, B.; Vriend, G.; Veenhuis, M.; Klei, I.J. *Biochemistry* **1999**, *38*, 5034.
- Salomons, F.A.; Kiel, J.; Faber, K.; Veenhuis, M.; Klei, I.J. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 12603.
- Demers, N.; Agostinelli, E.; Averill-Bates, D.A.; Fortier, G. *Biotech. and Appl. Biochem.* **2001**, *33*, 201.
- Basri, M.; Samsudin, S.; Bin, Ahmad M.; Razak, C.; Salleh, A.B. *Applied Biochem. and Biotech.* **1999**, *81*, 205.
- Akiyoshi, K.; Sasaki, Y.; Sunamoto, J. *Bioconjugate Chemistry* **1999**, *10*, 321.
- Zhang, L.; Li, L.; An, L.; Hoffman, R.M.; Hofmann, G.A. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1997**, *42*, 283.
- Gomez, L.; Ramirez, H.; Villalonga, R. *Biotechnology Letters* **2000**, *22*, 347.
- Davidson, P.; Sun, W.Q. *Pharmaceutical Research*, **2001**, *18*, 474.
- George, S.P.; Ahmad, A.; Rao, M.B. *Bioresource Technology*, **2001**, *78*, 221.
- Draber, P.; Drabrova, E.; Novakova, M. *Journal of Immunological Methods*, **1995**, *181*, 1.
- DePaz, R.A.; Dale, D.A.; Barnett, C.; Carpenter, J.F.;

- Guertner, A.; Randolph, T. *Enzyme and Microbial Technology*, **2002**, *31*, 765.
17. Chang, B.S.; Mahoney, R.R. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **1995**, *22*, 203.
18. Jene, Q.; Pearson, J.C.; Lowe, C.R. *Enzyme and Microbial Technology* **1997**, *20*, 69.
19. Beg, H. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1995**, *38*, 153.
20. Lei, C.; Berg, H. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1998**, *45*, 261.
21. Gamaley, I.; Augsten, K.; Berg, H. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1995**, *38*, 415.
22. Kwee, S.; Rastma, P. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1995**, *36*, 109.
23. Cossarizza, A.; Monti, D.; Bersani, F.; Cadossi, R.; Sacchi, A.; Franceschi, C. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1989**, *160*, 692.
-