

번데기동충하초 균사 중의 Branched-Chain Amino Acid Aminotransferase의 분리정제 및 그 특성에 관한 연구

동국대학교 일산불교병원 진단검사의학과¹ · 서울보건대학 임상병리과²

김성태¹ · 박정오²

A Study on the Purification and Characteristics of Branched-Chain Amino Acid Aminotransferase in Cultural Mycelia of *Cordyceps militaris*

Sung-Tae Kim¹, and Chung-Oh Park²

Department of Laboratory Medicine, Dongguk University Ilsan Bulkyo Hospital, Ilsan 410-773, Korea¹

Department of Biomedical Laboratory Science, Seoul Health College, Sunghnam 461-713, Korea²

The optimum conditions of *Cordyceps militaris* mycelial growth, purification and characteristics of branched-chain amino acid aminotransferase [BCAT(EC 2.6.1.42)] in this mycelium were studied. Optimum pH, temperature and medium of culture of mycelia were 5.5, 22.5°C and Hamada medium (HM), respectively. BCAT in homogenate of this mycelia was precipitated by 20-40% saturated solution of ammonium sulfate and then purified by DEAE (diethylaminoethyl)-Sephadex A-50 column chromatography with linear concentration gradient and Sephadex G-200 gel filtration. A single band of purified enzyme was detected on SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis). Optimum pH and temperature of BCAT were found to be 7.8 and 29°C, respectively. It showed activity toward L-leucine, L-isoleucine and L-valine as a substrate. The Km values of this enzyme for L-leucine were determined to be 5.88 mM for L-leucine.

Key Words : *Cordyceps militaris*, Branched-chain amino acid aminotransferase, Purification, Cultural mycelia

I. 서 론

동충하초(*Cordyceps* sp.)는 곤충기생성 약용버섯으로서 그 이름은, 겨울철에 곤충의 몸에 기생하다가 여름에 자실체가 풀처럼 돋아나오는 모습에서 연유되었다. 즉, 동충하초의 포자나 균사가 곤충들의 활발한 활동시기인 봄, 여름, 가을에 살아있는 곤충의 호흡기, 소화기 및 관절 등의 부드러운 부분에 붙어서 발아하고, 벌레의 체내 영양분을 섭취하여 결국 곤충을 죽게 한다.

교신저자 : 박정오, (우)461-713 경기도 성남시 수정구 양지동 212, 서울보건대학 임상병리과

Tel : 031-740-7268

E-mail : chungoh@shjc.ac.kr

한편, 생체 내에서 수많은 물질 대사가 이루어지고 있으며, 그 중 아미노산은 그 대사과정을 거쳐 분해, 합성 또는 다른 에너지원으로 이용되고 있다. 아미노산 대사의 첫 번째 단계인 아미노기 전이과정에 관여하는 아미노기 전이효소는 조효소인 pyridoxal-5'-phosphate의 존재 하에 아미노산의 아미노기를 α -ketoglutarate(α -KG)로 전이하는 효소이다(Hayashi 등, 1990). 특히 분지형 아미노산인 leucine, isoleucine 및 valine 등의 경우에는 분지형 아미노산 아미노기전이효소[branched-chain amino acid aminotransferase: BCAT(EC 2.6.1.42)]에 의해 아미노기 전이과정이 촉매된다(Voet 등, 1995).

본 연구에서는 배양된 번데기 동충하초 균사체 중의

BCAT를 분리정제하여 그 순도를 확인한 후, 이 효소의 최적 pH, 최적 온도, 기질의 특이성 및 Km 값 등의 효소적 특성을 연구하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

(1) 균주

본 실험에서는 농촌진흥청으로부터 분양받은 번데기동충하초(*Cordyceps militaris*)의 균주를 사용하였다.

(2) 배지

번데기동충하초 균사의 배양에는 HM(Hamada medium) 배지를 사용하였다.

2. 방법

(1) BCAT의 분리정제

효소단백질의 분리정제는 Min(1992)의 방법을 인용 변형하여 다음과 같이 시행하였다. HM 배지 9 L에서 최적 pH 5.5, 최적온도 22.5°C하에서 13일 동안 배양한 균사체를 거르로 걸러준 다음, 증류수 3 L로 3회 세척하여 배양액이 완전히 제거된 균사체 180 g을 얻었다. 균사체 중의 BCAT의 추출은 5 mM 인산염 완충용액(pH 7.8)을 소량씩 가하여 초음파 파쇄기로 30초 간격으로 3회 파쇄한다음, 모래를 첨가한 유발접시를 이용하여 이를 완전히 파쇄하였다. 이 과정을 3회 반복한 후, 10,000 G에서 10분 동안 원심분리하여 침전물을 얻은 다음, 다시 상층액에 황산암모늄을 가하여 40%로 포화시킨 다음, 원심분리하여 단백질 침전물을 얻었다. 각 분획을 5 mM 2-mercaptoethanol(2-ME) 및 1 mM EDTA를 함유한 5 mM 인산염 완충용액(pH 7.8)으로 투석하여 냉동 농축하였다. 각 분획별로 활성도를 측정하여 BCAT 분획을 얻었다.

효소활성을 가지는 20%-40% 분획을 DEAE-Sephadex A-50 음이온 교환수지 column(1.5 x 35 cm)에 loading하여 5 mM 2-ME 및 1 mM EDTA를 함유한 5 mM 인산염 완충용액(pH 7.8) 및 300 mM 인산염 완충용액(pH 7.8)으로 선형 농도 기울기법에 따라 크로마토그래피하여 활성 분획을 얻었다. 이를 냉동 농축한 다음, Sephadex G-200 gel filtration column(1.5 x 50 cm)에서 5 mM 2-ME 및 1

mM EDTA를 함유한 5 mM 인산염 완충용액(pH 7.8)으로 겔 여과하여 이 효소를 정제하였다.

정제 확인은 Laemmli(1970) 법을 인용하여 4.5%의 치쌍임 겔(stacking gel)과 7.5%의 분리 겔(separating gel)로 이루어진 SDS-PAGE를 이용하여 5°C에서 겔판 당 4 mA로 4시간 동안 전기영동을 하였다. 겔은 0.1% Coomassie brilliant blue R-250 용액으로 6시간 동안 염색한 다음, 30% 메탄올과 10% 아세트산이 포함된 용액으로 탈색하여 정제를 확인하였다.

(2) BCAT의 활성도 측정

BCAT의 활성도 측정은 Min 등(1992)의 방법을 인용하여 다음과 같이 측정하였다. 50 μ mol의 인산염 완충용액(pH 7.2), 10 μ mol의 L-Leu, 0.1 μ mol의 P-5'-P 및 효소용액 0.3 mL를 포함한 반응혼합물을 25°C에서 5분 동안 열평형시켰다. 이 반응혼합물에 10 μ mol의 α -KG를 가하여 최종부피를 1.5 mL로 한 다음, 같은 온도에서 10분 동안 반응시킨 다음, 10% TCA 수용액 1.5 mL를 가하여 효소 반응을 정지시키고, 2,400 rpm에서 1분 동안 원심분리하여 효소단백질 침전물을 제거하였다. 그 상층액 2 mL에 0.5% DNPH용액 2 mL를 가하고 25°C에서 5분 동안 반응시킨 다음, 톨루엔 4 mL를 가하여 2분간 진탕한 후, 톨루엔층 3 mL를 취하여 다른 시험관에 옮기고 0.5 M HCl 3 mL를 가하여 1분 동안 강하게 교반하여 톨루엔층에 있는 α -KG의 히드라존을 제거하였다. 톨루엔층 2 mL를 취하여 다른 시험관에 옮기고, 10% 탄산나트륨 용액 2 mL를 가하여 5분 후에 440 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(3) 단백질 정량

단백질 정량은 Lowry 등(1951)의 방법을 이용하여 효소단백질 용액 0.5 mL에 2% Na_2CO_3 를 함유하는 0.1 M NaOH 수용액과 0.5% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 를 포함하는 1% 주석산 나트륨갈륨 수용액을 50:1(V/V)로 혼합한 용액 2.5 mL를 가하고 25°C에서 10분 동안 반응시킨 다음 1M Folin-Ciocalteu 페놀시약 0.25 mL를 가하여 30분 동안 발색시킨 다음, 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 단백질양은 BSA 표준 검량곡선에 의하여 산출하였다.

(4) BCAT의 최적 pH 측정

최적 pH는 0.125 M 인산염 완충용액의 pH를 7.0에서 8.5까지 0.1 간격으로 변화시켜 25°C에서 위와 같은 방법

으로 이 효소의 활성도를 측정하여 결정하였다.

(5) BCAT의 최적 온도 측정

최적 온도는 최적 pH에서 반응온도를 15℃에서 40℃까지 변화시켜 위와 같은 방법으로 효소의 활성도를 측정하여 결정하였다.

(6) BCAT의 기질 특이성

효소의 기질 특이성은 최적 조건하에서 기질로서 분지형 지방족 아미노산인 L-leucine, L-isoleucine 및 L-valine 가지가 없는 아미노산으로서, 지방족아미노산인 L-alanine, 방향족 아미노산인 L-phenylalanine 및 인돌계 아미노산인 L-tryptophan을 사용하여 기질의 변화에 따른 효소의 활성도를 위와 같은 방법으로 측정하였다.

(7) BCAT의 Km값 측정

이 효소의 최적 pH 및 최적 온도하에서 L-leucine 농도를 2.5 mM에서 20 mM까지 각각 변화시켜 위와 같은 방법으로 활성도를 측정한 다음, Lineweaver-Burk double reciprocal plot하여 측정하였다.

단계인 균질용액의 비활성도는 0.8 단위이었으나, 정제의 최종 단계인 Sephadex G-200 겔을 여과하여 얻은 효소단백질의 비활성도는 27.3 단위로서, 최종 단계에서 34.9배 정제되었음을 알 수 있었다. 변태기동충하초 균사 중의 단백질을 인산염 완충용액(pH 7.8)의 농도를 5 mM에서 300 mM까지 선형 농도 기울기법으로 DEAE-Sephadex A-50 column(1.5 x 35 cm) 크로마토그래피한 결과는 Fig. 1과 같으며 인산염 완충용액의 농도 40 mM 부근에서 용출되는 활성분획인 효소단백질을 얻었다. 분리된 효소단백질을 더욱 정제하기 위하여 Sephadex G-200 column (1.5 x 50 cm) 겔로 여과한 결과와 SDS-PAGE에 의한 정제 확인 결과는 Fig. 2와 같으며, 단일 단백질 분획과 단일 활성분획을 보여 이 효소가 정제되었음을 확인하였다.

2. 최적 pH

pH 변화에 따른 BCAT의 활성도 변화를 측정한 결과는 Fig. 3과 같으며 최적 pH는 7.8이었다. 이는 표고버섯 중의 BCAT의 경우 BCAT I은 pH 8.1(Min 등, 1992), BCAT II는 pH 8.2라는 보고(Min 등, 1992)와도 상이하였다.

3. 최적온도

온도 변화에 따른 이 효소의 활성도 변화를 측정한 결과는 Fig. 4와 같다. 이 그림에서와 같이 이 효소의 최적 온도는 29℃이었다. 이는 느타리버섯의 BCAT의 최적 온도인 35℃(Lee 등, 1984)와 상이하하였다.

III. 결과 및 고찰

1. BCAT의 분리정제

효소의 분리정제 및 그 확인은 정제과정에 따른 BCAT의 활성도 변화를 측정하여 효소의 정제도를 확인하였고, 그 결과는 Table 1과 같다. 이 표에서와 같이 정제 초기

Table 1. Purification of branched-chain amino acid aminotransferase in *C. militaris* mycelia

Purification step	Total volume(mL)	Total activity (Unit *)	Total protein (mg)	Specific activity (Unit/mg/10min)	Purification fold
Homogenate	8000.0	944.6	1208.0	0.8	1.0
(NH ₄) ₂ SO ₄ 20-40% saturate	61.5	12.8	6.0	2.1	2.7
DEAE-Sephadex A-50 Column	98.5	69.7	3.0	23.6	30.1
Sephadex G-200 Column	44.9	57.5	2.1	27.3	34.9

* One unit of activity was defined as amount of enzyme that released 1 μmol of α-KG per 10 min at 25℃, pH 7.2

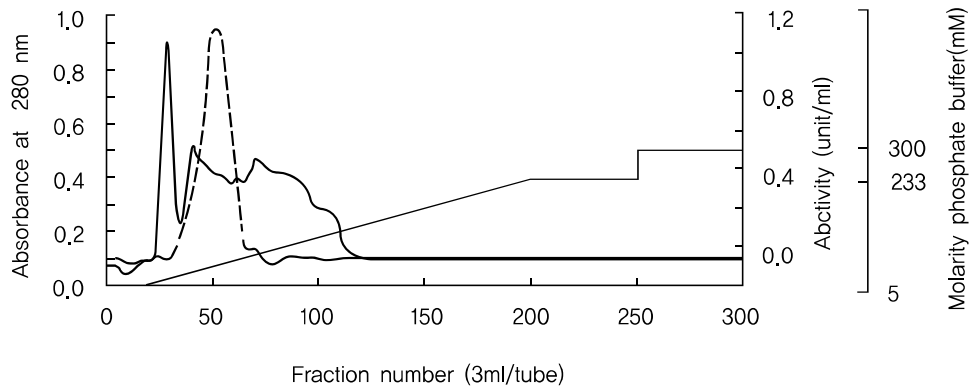


Fig. 1. DEAE-Sephadex A-50 column (1.5 x 35 cm) chromatography of branched-chain amino acid aminotransferase in *C. militaris* with linear concentration gradient. Elution buffer: 5-300 mM phosphate buffer (pH 7.8) containing 1 mM EDTA and 5 mM 2-ME.
 ———, protein
 - - - - - , enzyme activity
 ———, molarity of phosphate buffer(mM)

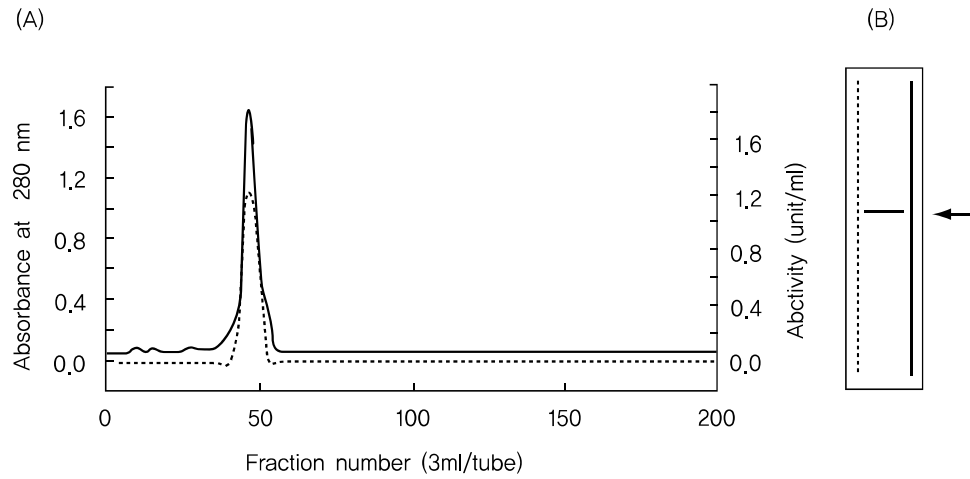


Fig. 2. (A) Sephadex G-200 column (1.5 × 50 cm) gel filtration chromatography of branched-chain amino acid aminotransferase in *C. militaris*.
 Elution buffer : 50 mM phosphate buffer (pH 7.8) containing 1 mM EDTA and 5 mM 2-ME.
 ———, protein
 - - - - - , enzyme activity
 (B) SDS-polyacrylamide gel electrophoretic pattern of branched-chain amino acid aminotransferase. Electrophoresis was carried out using 4.5% stacking gel and 7.5% separating gel at 4 mA per gel for 4 hours at 5°C. Protein pattern was stained with 0.1% Coomassie brilliant blue R-250 and then destained with 30% methanol, 10% acetic acid.

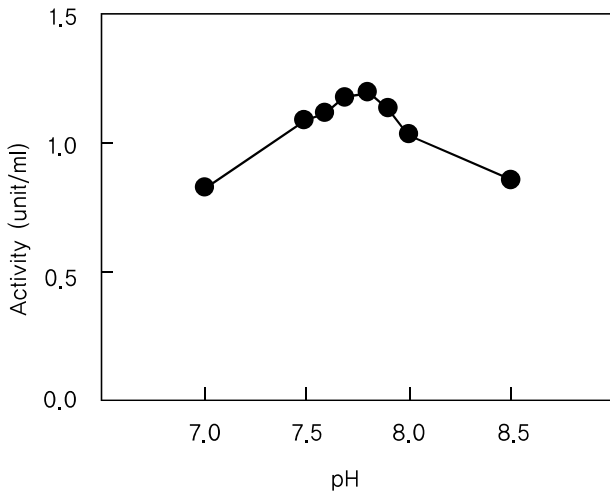


Fig. 3. Optimum pH of branched-chain amino acid aminotransferase.

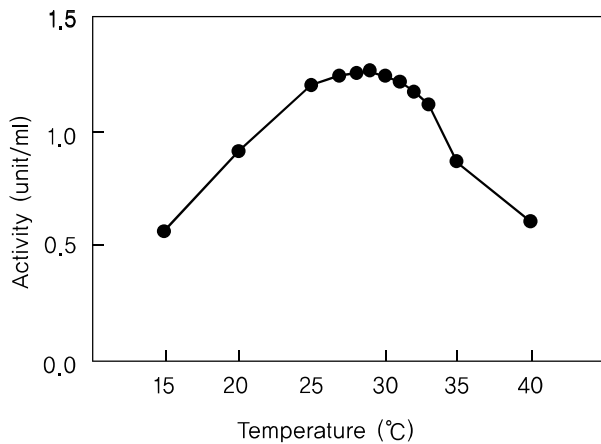


Fig. 4. Optimum temperature of branched-chain amino acid aminotransferase.

4. 기질의 특이성

이 효소의 기질의 변화에 따른 활성도의 변화는 Fig. 5와 같다. 이 그림에서와 같이 기질 L-leucine의 활성도는 0.95 단위였다. L-leucine에 대한 활성도를 100%로 하였을 때 L-isoleucine의 활성도는 68%, L-valine은 37%인 반면, L-alanine은 1%, L-phenylalanine은 19% 그리고 L-tryptophan은 7%이었다. 이 결과는 분지형 아미노산인 L-leucine, L-isoleucine 및 L-valine에 대해서 큰 활성을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과에서 보는 바와 같이 이 효소는 지방족 아미노산인 L-alanine이나 방향족 아미노산인 L-phenylalanine, 인돌계 아미노산인 L-tryptophan 등에 비하여 가지달린 아미노산인 L-leucine,

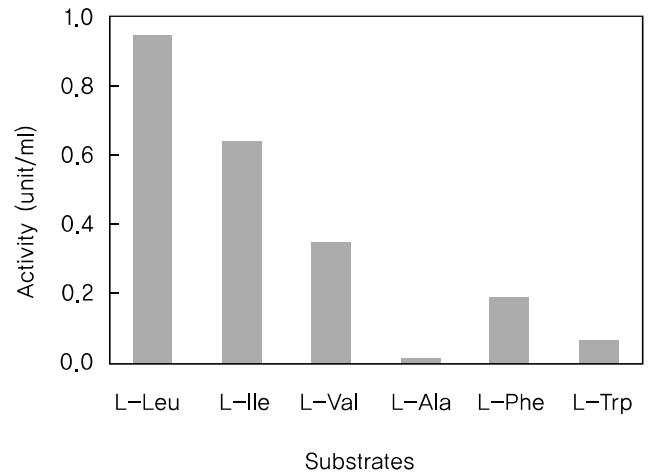


Fig. 5. Substrate specificity of branched-chain amino acid aminotransferase.

L-isoleucine 및 L-valine이 월등히 큰 효소활성을 나타내어 BCAT임을 확인할 수 있었다.

5. Km값

이 효소의 최적 pH 7.8과 최적 온도 29°C하에서 L-leucine 용액의 농도 변화에 따른 효소의 활성도 변화를 Lineweaver-Burk double reciprocal plot하여 얻은 결과는 Fig. 6과 같으며, 그 Km값은 5.88 mM이었다.

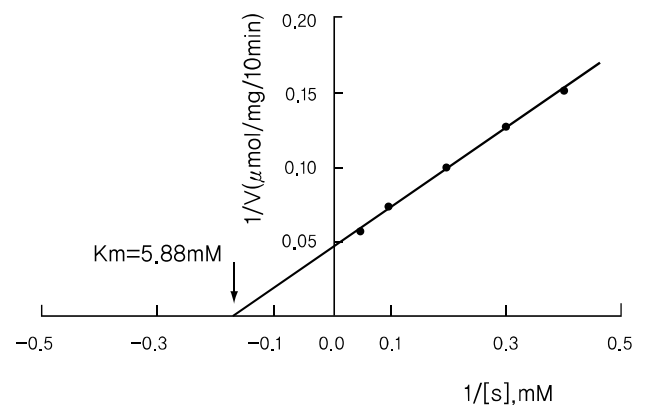
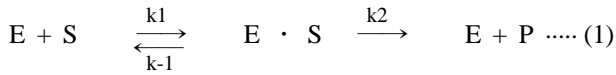


Fig. 6. Lineweaver-Burk double reciprocal plot of effect of L-leucine concentration on the reaction velocities of branched-chain amino acid aminotransferase.

Michaelis-Menten은 효소반응을 다음 (1)식과 같이 가정하였고, 그 반응속도식은 다음 (2)식과 같이 표시하였

다(Voet 등, 1995).



$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{[S] + K_m} \dots (2)$$

여기서 E와 S는 효소와 기질을 의미하며, E·S는 효소와 기질의 복합체를 의미한다. 또한 V0는 반응속도이며, Vmax는 반응최대속도, [S]는 기질의 농도이다. Km값은 효소와 기질간의 결합 친화성의 척도로서, 이 값이 작으면 효소와 기질간의 친화력이 크고, 이 값이 크면 친화력이 작은 것이다. 이 값은 효소의 종류에 따라 그 값이 다르며 같은 효소라도 기질의 변화에 따라 달라진다. 그러나 이 값은 효소와 기질간의 결합 친화성의 척도로서 특정 상수로 나타낸다.

IV. 결 론

번데기둥충하초 균사배양의 최적 조건과 이 조건에서 배양한 균사 중 분지형 아미노산 아미노기전이효소 (branched-chain amino acid aminotransferase, BCAT)를 분리 정제하였으며, 이 효소의 특성에 관하여 연구하였다. 배양된 균사로부터 BCAT를 최초의 균질용액의 활성도 보다 34.9배 정제하여 사용하였고, 이 효소의 최적 pH는 7.8, 최적 온도는 29℃이었다.

이 효소는, 분지형 아미노산인 L-leucine에 대한 활성을 100%로 하였을 때, L-isoleucine 및 L-valine에 대한 활성은 각각 68% 및 37%이었으나, 비분지형 아미노산인 L-alanine, L-phenylalanine 및 L-tryptophan에 대해서는 각각 1%, 19% 및 7%의 활성을 보였다. 그러므로 이 효소는 BCAT인 것으로 확인되었다. BCAT의 L-leucine에 대한 Km값은 5.88 mM이었다.

본 연구에서 수행한 BCAT의 분리정제법과 그 특성을 구하는 기법은 진단효소학에서 특정 임상효소의 성질을

파악하고 이해하는 데 기초 자료가 될 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Bixel MG, Hutson SM, Hamprecht B. Cellular distribution of branched-chain amino acid aminotransferase isoenzymes among rat brain glial cells in culture. *J Histochem Cytochem* 45:685-694, 1997.
2. Hayashi H, Wada H, Yoshimura T, Esaki N, Soda, K. Recent topics in pyridoxal 5'-phosphate enzyme studies. *J Annu Rev Biochem* 59:87-110, 1990.
3. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *J Nature* 227:680-685, 1970.
4. Lee MS, Nam CW. Studies on the branched chain amino acid aminotransferase from oyster mushroom (*Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Sing). *J Korea Biochem* 17:219-231, 1984.
5. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275, 1951.
6. Min TJ, Bae KG. Purification and characterization of branched chain amino acid aminotransferase (enzyme I) in *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. *J Korean Biochem* 25:511-519, 1992.
7. Min T J, Bae K G. Purification and characterization of branched chain amino acid aminotransferase (enzyme II) in *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. *J Korean Biochem* 25:520-528, 1992.
8. Voet D, Voet JG. Biochemistry. 2nd ed, p727-742, John Wiley & Sons, Somerset, UK, 1995.
9. Voet D, Voet JG. Biochemistry. 2nd ed, p345-367, John Wiley & Sons, Somerset, UK, 1995.
10. 성재모, 유영복, 차동열. 버섯학. p556-588, 교학사, 서울, 1998.