

## IO<sub>4</sub>-산화 가용성 전분에 의한 파파인의 변형

†안 용 근

충청대학 식품영양학부

### Modification of Papain with IO<sub>4</sub>-Oxidized Soluble Starch

†Yong-Geun Ann

Dept. of Food and Nutrition, Chungcheong College, Gangnae, Cheongwon, Chungbuk 363-890, Korea

#### Abstract

Periodate-oxidized soluble starch was reacted with papain at pH 4.0, pH 7.0, and pH 9.7, and an oxidized soluble starch-papain conjugate was produced. When compared with native papain, the specific activity decreased to 60%, in both the modified papain reacted with 0.4% NaBH<sub>4</sub> and in the modified papain not reacted with NaBH<sub>4</sub>. The specific activity decreased to 70% in the modified papains reacted with 1.5% NaBH<sub>4</sub> and 4.0% NaBH<sub>4</sub>, respectively. The reduction by NaBH<sub>4</sub> did not have an effect in the thermal stability of either the modified or nonmodified papain. An activity of 54.7% remained in the papain modified at pH 4.0, which was incubated at 80°C for 40 min. The papains modified at pH 7.0 and pH 9.7 and incubated for 40 min at two different temperatures, respectively, were stable to 60°C, and at 80°C their activities at 56.3% and 44.1%, respectively. The modified papain's thermal stability pattern was similar to that of native papain, with no increase in its stability. In the range of pH 2.0~13.0, the stability of the papain modified at pH 4.0 decreased greatly between pH 3.0~5.0, but it was similar to the native papain at other pH values. The stability of the papain modified at pH 7.0 showed a similar pattern to the native papain at pH 2.0~6.0, while its stability increased when moving into the alkali pH range. The papain modified at pH 9.7 also had increased stability, when moving into the alkali range. The results of Hammerstein milk casein, which was reacted with the papains modified at pH 4.0, pH 7.0, and pH 9.7, respectively, and analyzed by FPLC, showed different peaks according to the different modification pHs, and the greatest peak differences were observed with the modification at pH 9.7.

Key words: stabilization, papain, modification, periodate, oxidized soluble starch.

#### 서 론

당은 전세기 말부터 우수한 연구 결과가 얻어져 있었으나, 영양원 이외의 생물학적 의의를 발견하지 못하여 오랫동안 주목받지 못하다가 근래 들어 당의 중요성이 발견되고 있다<sup>1)</sup>.

당단백질은 구조 단백질, 운반체 단백질, 면역계 단백질 호르몬, 인터페론, 효소 등 생체의 주요 구성 성분이다. 당단백질이 세포 사이, 분자 사이, 분자와 세포 사이의 상호인식과 정보 전달 역할을 하고, 생체 대사와 활성 발현을 조절하

기 때문에, 점성과 용해성, 유화성, 방부 효과 및 항산화 효과 등 많은 기능성을 갖기 때문이다. 그래서 이들 기능성을 이용하여 당단백질을 방부제, 선도 유지제, 신미각 물질, 장내 세균 제어제, 충치 예방제, 기능성 단백질, 바이오리액터, 분리정제용 재료, 인공 장기 재료, 바이오센서, 화장품 재료, 진단약 등으로 사용하려는 시도가 계속되고 있다<sup>1)</sup>.

이를 위해 여러 분야에서 인공적으로 당단백질을 조제하기 위해 노력하고 있다. 이를 탄수화물공학이라 하며, 새로운 바이오테크놀러지로 주목받고 있다.

† Corresponding author: Yong-Geun Ann, Dept. of Food and Nutrition, Chungcheong College, Gangnae, Cheongwon, Chungbuk 363-890, Korea.

Tel: +82-43-230-2193, Fax: +82-43-230-2196, E-mail: annygn@hanmail.net

그래서 전보<sup>2,3)</sup>에서 쓴 재료를 사용하여 쉽고, 간단한 방법으로 무해하고 유용한 기능성 당단백질을 조제하고자  $\text{NaIO}_4$ -산화 전분 및 말토올리고당을 단백질과 반응시켜 당단백질을 만드는 방법을 개발하였다. 분자 표면에 리신의  $\epsilon$ - $\text{NH}_2$ 기가 존재하는 효소와 단백질은 이 방법으로 모두 당단백질로 조제할 수 있으며, 이 방법으로 고구마  $\beta$ -아밀라아제에 산화당을 부가하여 고구마  $\beta$ -아밀라아제의 서브유닛 구조와 기능을 해석하고<sup>4-8)</sup>, 고구마  $\beta$ -아밀라아제<sup>9)</sup>를 비롯한 6가지 아밀라아제<sup>10)</sup>,  $\alpha$ -아밀라아제<sup>11)</sup>, 밀  $\beta$ -아밀라아제<sup>12)</sup>,  $\alpha$ -글루코시다아제<sup>13)</sup>의 안정성을 증가시키는 결과를 확인한 바 있다.

본 연구는 단백질 가수분해효소인 파파인에 이 방법을 적용시켜서 생성된 당단백질 파파인의 성질과 안정성을 비교 분석한 결과이다.

## 실험 재료 및 방법

### 1. 재료

파파인(*Carica papaya*에서 정제),  $\text{NaIO}_4$ ,  $\text{NaBH}_4$ 는 시그마 제품을 사용하였고, 가용성 전분은 일본 國産化學 제품, Hammerstein milk casein 및 기타 시약은 일급 및 특급을 사용하였다.

### 2. 단백질 가수분해효소 활성

1% Hammerstein milk casein(0.1 M 인산완충액, pH 7.0)용액 2.5 ml에 파파인 용액 0.5 ml를 가하여 37°C에서 10분간 반응시킨 다음 5% trichloroacetic acid(TCA) 5 ml를 가하여 10분 후 Toyo 여과지 No 6로 여과하여 여과액을 200  $\mu\text{l}$  취해 0.5 M citric acid 완충액(pH 5.0) 0.6 ml를 가하고 Ninhydrin 시약 0.6 ml를 가하여 100°C에서 15분 발색시킨 다음 Shimadzu UV-1601 분광광도계로 570 nm에서 비색정량하였다<sup>14)</sup>.

### 3. FPLC

Shimadzu HPLC 시스템(LC-10A 펌프, SPD-10A 분광광도검출기, CTO-10A 컬럼오븐, 크로마토펙 C-R5A 적산기)와 Superose 12분 자체 컬럼(1×30 cm)을 사용하여 실온에서 0.2 M NaCl을 함유한 0.1 M K-인산완충액(pH 6.8)을 이동상으로 유속 0.5 ml/min로 유출시켜서 280 nm에서 검출하였다.

### 4. $\text{NaIO}_4$ 에 의한 가용성 전분의 산화

가용성 전분 2 g을 100 ml의 0.2 M  $\text{NaIO}_4$  용액에 현탁하여 4°C에서 48시간 교반하여 반응시킨 다음 ethyleneglycol 10 ml를 가해 미반응의  $\text{NaIO}_4$ 를 소모시켰다. 다음, 증류수에 투석하여 동결 건조하였다<sup>2)</sup>.

### 5. $\text{NaBH}_4$ 환원에 따른 열안정성

$\text{IO}_4$ -산화 가용성 전분 10%를 함유한 0.05 M 붕산 완충액(pH 9.7) 125  $\mu\text{l}$ 와 0.5 M Britton-Robinson 완충액(pH 4.0) 75  $\mu\text{l}$ , 파파인(60 mg/ml) 용액 50  $\mu\text{l}$ 를 혼합하여 40°C에서 15분간 반응시킨 다음,  $\text{NaBH}_4$ 를 0.0%, 0.5%, 1.5%, 4% 농도로 각각 가하여 40°C에서 10분간 환원시켰다. 여기에 0.1 M 인산 완충액(pH 7.0) 2.25 ml를 가하고, 그 중 200  $\mu\text{l}$ 를 취하여 온도별로 20분간 항온한 다음 TCA 침전법과 닐히드린법으로 잔존 활성을 측정하였다<sup>14)</sup>.

### 6. 열안정성

pH 4.0, pH 7.0, pH 9.7 세 pH에서 변형하여 열안정성을 측정하였다. 즉, 산화 가용성 전분 10%를 함유한 0.05 M Britton-Robinson(pH 9.7) 완충액 125  $\mu\text{l}$  짜리 세 개에 pH 4.0, pH 7.0, pH 9.7의 0.5 M Britton-Robinson 완충액 75  $\mu\text{l}$ 와 파파인(60 mg/ml) 용액 50  $\mu\text{l}$ 를 각각 혼합하여 40°C에서 15분간 반응시킨 다음, 50%  $\text{NaBH}_4$  용액 20  $\mu\text{l}$ 를 가하여 4% 농도로 한 다음 40°C에서 10분간 환원시켰다.

여기에 0.2 M K-인산완충액(pH 7.0)을 가하여 10배 희석하고, 그 중 200  $\mu\text{l}$ 를 취하여 pH 4.0 변형 파파인은 80°C에서 시간별로 흡광도를 측정하고, pH 7.0과 9.7에서 변형한 파파인은 각 온도에서 40분간 항온한 다음 흡광도를 측정하였다. 파파인 용액은 반응시간 외에는 얼음 위에 올려 놓아서 자가소화가 일어나지 않도록 하였다.

### 7. pH 안정성

상기 열안정성과 같은 방법으로 파파인을 pH 4.0, pH 7.0, pH 9.7에서 변형하여  $\text{NaBH}_4$ 로 환원하고 10배 희석한 파파인 용액 50  $\mu\text{l}$ 에 각 pH의 0.2 M Britton-Robinson 완충액 200  $\mu\text{l}$ 를 가하여 37°C 항온수조에서 3시간 정지한 다음 1% 함머스타인 밀크 카제인을 가하고 TCA 침전법과 닐히드린 발색법으로 흡광도를 측정하였다. 파파인 용액은 반응 시간 외에는 얼음 위에 올려 놓아서 자가소화가 일어나지 않도록 하였다.

### 8. FPLC에 의한 파파인과 $\text{IO}_4$ -산화 가용성 전분 반응의 분석

2.5% 산화 가용성 전분을 함유한 0.05 M Britton-Robinson 완충액(pH 9.7), 3.0% 파파인을 함유한 0.2 M K-인산완충액(pH 7.0) 1 ml를 37°C에서 10분간 반응시킨 다음 0.2 M NaCl을 함유한 0.1 M K-인산완충액(pH 6.8)을 이동상으로 0.5 ml/min의 유속에서 Superose 12 컬럼으로 크로마토그래피하여 280 nm에서 검출하였다. 비변형 파파인, 산화 가용성 전분도 같은 조건에서 크로마토그래피하였다.

### 9. pH 4, pH 7.0, pH 9.7 변형 파파인의 반응산물 분석

pH 4.0, 7.0, 9.7에서 변형한 파파인 2 mg과 함머스타인 밀

크 카제인 8 mg을 함유한 K-인산완충액(pH 7.0)을 37°C에서 10분 반응시킨 다음 0.2 M NaCl을 함유한 0.1 M K-인산완충액(pH 6.8)을 이동상으로 유속 0.5 ml/min, 컬럼 Superose 12로 크로마토그래피하여 280 nm에서 검출하였다.

**결과 및 고찰**

**1. IO<sub>4</sub>-산화 가용성 전분 변형 파파인 공유결합의 NaBH<sub>4</sub> 환원과 비활성**

단백질과 산화당을 반응시키면 단백질 분자 표면 리신의 아미노기와 산화당의 알데히드가 Schiff 염기를 형성하는데 이중결합은 불안정하기 때문에 단일결합으로 안정화시키기 위하여 NaBH<sub>4</sub>로 환원시켰다.

그 결과, 변형시키지 않은 파파인을 100%(흡광도 0.317)로 하였을 때 비활성은 변형시켜서 NaBH<sub>4</sub> 처리하지 않은 파파인은 60%(흡광도 0.196), NaBH<sub>4</sub> 0.4% 처리한 파파인은 60%(0.188/0.293), NaBH<sub>4</sub> 1.5% 처리한 파파인은 70%(0.197/0.264), NaBH<sub>4</sub> 4.0% 처리한 파파인은 70%(0.177/0.242)를 나타내어서 NaBH<sub>4</sub> 1.5% 이상 농도에서 잔류 활성이 10% 증가하였다.

NaBH<sub>4</sub> 1.5% 미만 농도에서 비활성이 10% 낮은 것은 이중결합의 불안정으로 인한 기질과의 반응 등이 생기기 때문으로 보인다. 1.5% 이상 농도에서 비활성이 10% 높아진 것은 결합을 안정화시켜서 부반응이 일어나지 않게 하였기 때문으로 보인다.

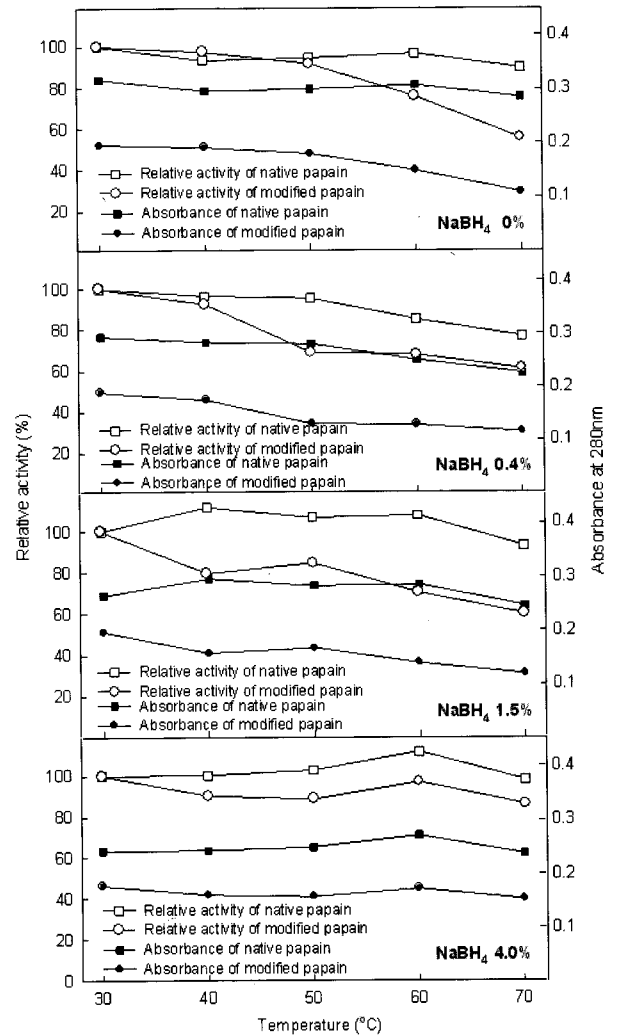
동일한 조건에서 공시험한 비변형 파파인보다 변형한 파파인의 비활성이 저하한 것은 파파인에 결합한 산화 가용성 전분이 파파인의 기질 결합 부위나 촉매 부위를 차단하여 저해하기 때문으로 보인다<sup>15)</sup>.

**2. IO<sub>4</sub>-산화 가용성 전분 변형 파파인의 NaBH<sub>4</sub> 환원과 열안정성**

NaBH<sub>4</sub> 농도를 달리하여 IO<sub>4</sub>-산화 가용성 전분 변형 파파인을 환원시킨 후 온도별로 20분간 항온시켜서 잔존 활성을 측정된 결과, Fig. 1과 같이 변형 파파인(●)은 1과 같이 활성이 비변형 파파인(■)보다 큰 폭으로 떨어졌다.

두 파파인의 비활성 저하 형태가 유사하고, 경사도가 완만하여 IO<sub>4</sub>-산화 가용성 전분이 파파인의 열안정성을 증가시키는지 알기 어려워서 상대적 활성으로 표시한 결과, Fig. 1과 같이 NaBH<sub>4</sub>로 환원시키지 않은 파파인(□)은 50°C까지 안정하였고, 환원시킨 파파인(○)은 NaBH<sub>4</sub>를 0.4%에서는 40°C까지 안정하고 1.5%와 4.0%에서는 30°C 이상부터 저하 폭이 넓어졌다. 안정성 저하 폭은 1.5%와 4.0%가 컸다.

이것은 IO<sub>4</sub>-산화 가용성 전분으로 변형한 파파인은 NaBH<sub>4</sub>로 환원하여도 안정성이 증가되지 않는다는 결과이다. *Asper-*



**Fig. 1. Thermal stability of papain modified with IO<sub>4</sub>-oxidized soluble starch.**

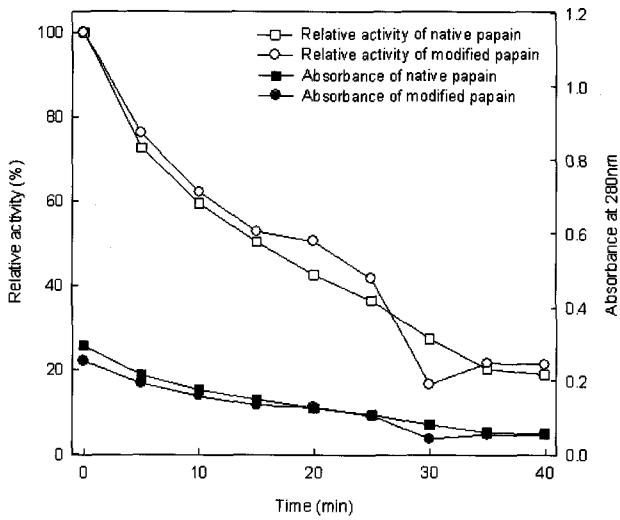
Papain was incubated in 0.1 M K-phosphate buffer(pH 7.0) at each temperature for 20 min in the presence of NaBH<sub>4</sub>.

*gillus α*-아밀라아제<sup>11)</sup>, 밀 *β*-아밀라아제<sup>12)</sup>의 경우는 환원시키지 않았어도 안정성이 증가하여 큰 영향을 미치지 않는 경우도 있다.

**3. 열안정성**

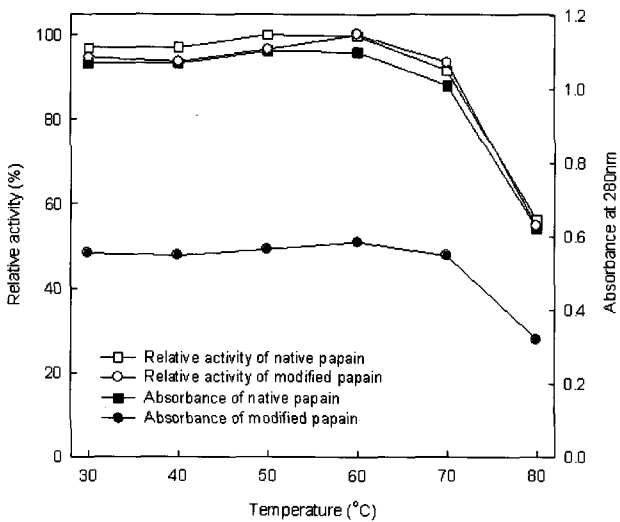
pH 4.0, 80°C에서 변형한 파파인의 열안정성을 조사한 결과, Fig. 2와 같이 시간이 지날수록 활성이 저하하여 40분 후 변형 파파인은 21.3%, 비변형 파파인은 18.9%의 활성이 남아 거의 차이를 나타내지 않았다.

pH 7.0에서 변형한 파파인을 온도별로 40분간 항온하여 측정된 결과는 Fig. 3과 같이 비활성이 51% 저하하였으나, 백분율로는 비변형 파파인과 거의 동일하여서 60°C까지 안정하



**Fig. 2. Thermal stability of papain modified with IO<sub>4</sub>-oxidized soluble starch at pH 4.0.**

Papain was modified in pH 4.0 and incubated in 0.1 M K-phosphate buffer(pH 7.0) at 80°C for 40 min.

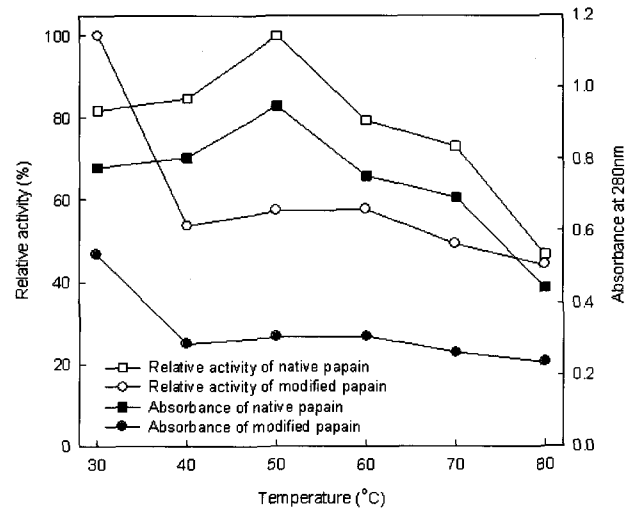


**Fig. 3. Thermal stability of papain modified with IO<sub>4</sub>-oxidized soluble starch at pH 7.0.**

Papain was modified in pH 7.0 and incubated in 0.1 M phosphate buffer(pH 7.0) at each temperature for 40 min.

고, 70°C에서 활성이 약간 저하하고, 80°C에서 비변형 파파인은 56.3%, 변형 파파인은 54.7%의 활성이 남았다.

pH 9.7에서 변형한 파파인도 변형으로 비활성은 52%만 남았는데, 40°C에서 안정성이 급격히 저하한 다음 60°C까지 완만하게 증가하다가 저하하여 80°C에서 44.1%의 활성이 남았다. 비변형 파파인은 50°C까지 안정성이 증가하다가 이후 저하하여 80°C에서는 46.6%의 활성이 남았다(Fig. 4).



**Fig. 4. Thermal stability of papain modified with IO<sub>4</sub>-oxidized soluble starch at pH 9.7.**

Papain was modified in pH 9.7 and incubated in 0.1 M phosphate buffer(pH 7.0) at each temperature for 40 min.

pH별 변형에 따른 파파인의 비활성 차이는 산성에서 약하고, 중성 pH에서 안정하고, 알칼리에서 강한 특성 때문이기도 하지만, 산성 쪽에서 IO<sub>4</sub>-산화 가용성 전분의 용해도가 낮아서 용해되지 않은 IO<sub>4</sub>-산화 가용성 전분과 파파인이 결합하여 비용해성이 되는 부분이 생겼기 때문일 수도 있다.

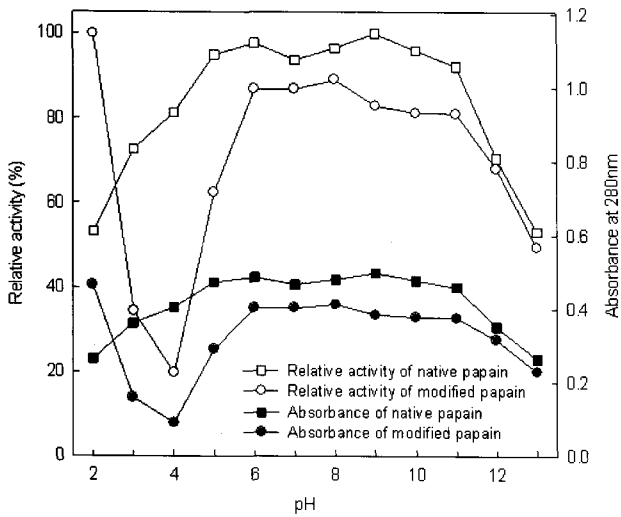
전분 가수분해효소인 아밀라아제는 산화 가용성 전분 변형<sup>9-13)</sup>으로 대부분 안정성이 증가하는데 반하여 이것은 단백질 가수분해효소인 파파인이 산화 가용성 전분 변형 및 NaBH<sub>4</sub> 처리로 비활성과 안정성이 증가하지 않는다는 결과를 나타낸다.

**4. pH 안정성**

pH 4.0 변형 파파인은 비변형 파파인보다 전체 pH 2.0~13.0에 걸쳐서 비활성이 저하되었다. Fig. 5와 같이 pH 2.0에서는 변형 파파인의 안정성이 매우 높지만, pH 3.0~5.0 사이에서 매우 저하되었는데, pH 6.0 이상에서는 비변형 파파인과 같은 형태이다. 변형 파파인은 pH 2.0에서 안정성이 가장 높았으나, 안정 범위는 pH 6.0~11.0이었다. 비변형 파파인은 pH 9.0에서 안정성이 가장 높았고, 안정 범위는 5.0~11.0이었다.

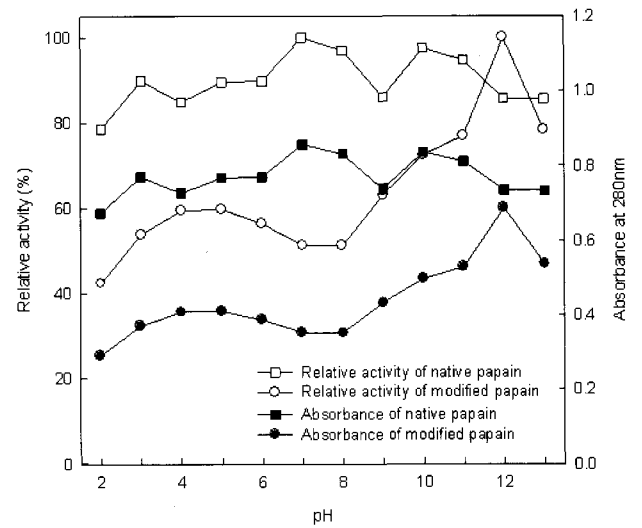
pH 7.0에서 변형한 파파인도 pH 2.0~6.0까지는 비변형 파파인과 비슷한 형태지만, pH 7.0~13.0에서 비변형 파파인은 안정성이 저하하는데 반해, 변형 파파인은 알칼리 쪽에서 안정성이 증가하였다. 비변형 파파인은 pH 2.0~13.0까지 넓은 범위에서 안정하였고, 변형 파파인은 pH 2.0에서 pH 13.0까지 진행할수록 안정성이 증가하였다(Fig. 6).

pH 9.7에서 변형한 파파인은 pH 4.0과 5.0에서 안정하였고, pH 2.0, 3.0, 7.0, 8.0에서 저하하였다가 알칼리 쪽으로 진행할



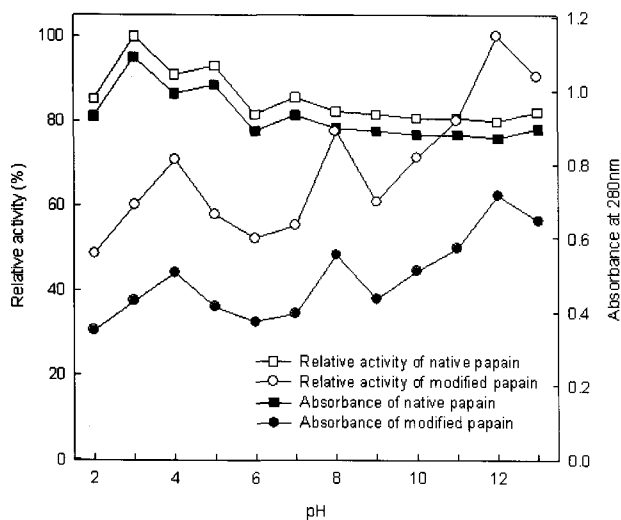
**Fig. 5.** pH stability of papain modified with IO<sub>4</sub>-oxidized soluble starch at pH 4.0.

Papain was modified in pH 4.0 and incubated in 0.1 M Britton-Robinson buffer of each pH at 37°C for 3 hours.



**Fig. 7.** pH stability of papain modified with IO<sub>4</sub>-oxidized soluble starch at pH 9.7.

Papain was modified in pH 9.7 and was incubated in 0.1 M Britton-Robinson buffer of each pH at 37°C for 3 hours.



**Fig. 6.** pH stability of papain modified with IO<sub>4</sub>-oxidized soluble starch at pH 7.0.

Papain was modified in pH 7.0 and incubated in 0.1 M Britton-Robinson buffer of each pH at 37°C for 3 hours.

수준 증가하였다. 비변형 파파인은 pH 7.0과 10.0에서 가장 안정하였는데, pH 2.0~13.0 전반에 걸쳐서 완만한 곡선을 보였다(Fig. 7). 이 결과는 pH 7.0 변형 파파인과 유사하다.

파파인은 산화 가용성 전분 변형 아밀라아제<sup>9-13)</sup>에 비하여 pH 안정성이 증가하지 않았는데, 단백질 가수분해효소에 대한 결과가 없으므로 그것이 단백질 가수분해효소의 일반적인 특징인지, 파파인 자체의 특징인지는 다른 단백질 가수분해효

소에 대하여 실험을 해 보아야 결론이 얻어질 수 있다.

**5. 파파인의 FPLC**

겔 크로마토그래피 컬럼 Superose 12로 변형 전후의 파파인과 산화 가용성 전분을 분석한 결과는 Fig. 8과 같다. 1은 산화 가용성 전분, 3은 파파인, 2는 산화 가용성 전분과 파파인을 반응시킨 것으로, 산화 가용성 전분은 파파인과 일부 결합되어 피크의 모습과 유출 속도가 약간 달라졌고, 파파인과 산화 가용성 전분 사이에 새로운 물질이 생겼다(Fig. 8). *Aspegillus awamori* α-글루코시다아제<sup>11)</sup>의 경우도 산화당 결합에 의하여 효소의 분자량이 증가하였다.

**6. 반응 산물의 FPLC**

변형 파파인과 비변형 파파인의 기질 특이성 변화를 알아보기 위하여 Superose 12 컬럼으로 반응산물을 분석하였다. Fig. 9는 pH 4.0에서 변형 파파인에 기질인 함머스타인 밀크 카제인 용액을 가하여 반응시킨 후 분석한 결과이다. 기질인 함머스타인 밀크 카제인은 분자량이 커서 25분에 피크를 나타냈다. 그러나 변형 파파인, 비변형 파파인 모두 25분이 주 피크인 카제인을 분해하여 25분 뒤의 분자량이 작은 펩티드와 아미노산으로 분해하여 25분 피크가 없어졌다.

변형 파파인, 비변형 파파인의 30~40분 사이의 피크는 비슷하지만 변형 파파인에 보이는 41분 피크, 44분 피크가 비변형 파파인에서는 나타나지 않고, 비변형 파파인 50분에 나타나는 피크가 변형 파파인에서는 나타나지 않았다(Fig. 9).

이것은 변형으로 기질 특이성과 촉매 특이성이 변한 것을

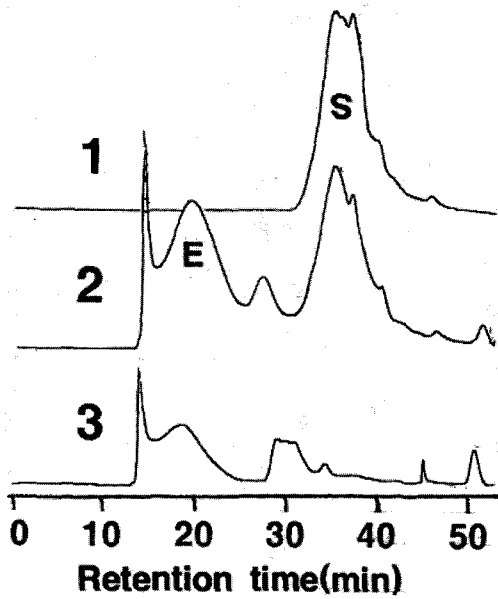


Fig. 8. Papain, oxidized starch, and its reaction product.

1, IO<sub>4</sub>-oxidized soluble starch: 2, modified papain: 3, native papain: E, papain: S, IO<sub>4</sub>-oxidized soluble starch: flow rate, 0.5 ml/min: detect, UV 280 nm: column, Superose 12(1×30 cm): elute, 0.1 M K-phosphate buffer(pH 6.8) containing 0.2 M NaCl.

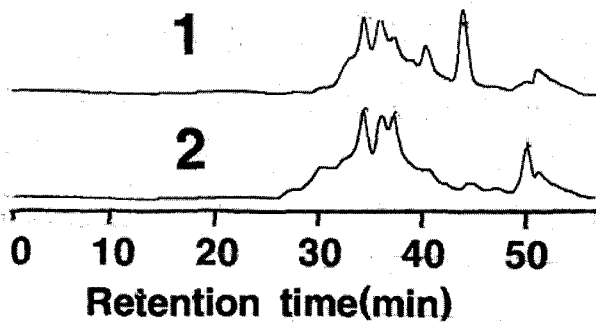


Fig. 9. Reaction product of Hammerstein milk casein by papain modified with IO<sub>4</sub>-oxidized soluble starch at pH 4.0.

Papain was modified at pH 4.0 and 2.0 mg and 8.0 mg of Hammerstein milk casein reacted in 0.2 M phosphate buffer(pH 7.0) at 37°C for 10 min. 1, products by modified enzyme: 2, products by native enzyme: flow rate, 0.5 ml/min: detect, 280 nm: column, Superose 12(1×30 cm): elute, 0.1 M K-phosphate buffer(pH 6.8) containing 0.2 M NaCl.

나타낸다.

Fig. 10은 pH 7.0에서 변형한 파파인(B)과 비변형 파파인(A), pH 9.7에서 변형한 파파인(D)과 비변형 파파인(C)의 결과로, 변형으로 기질 특이성이 변하여 반응산물의 피크가 달

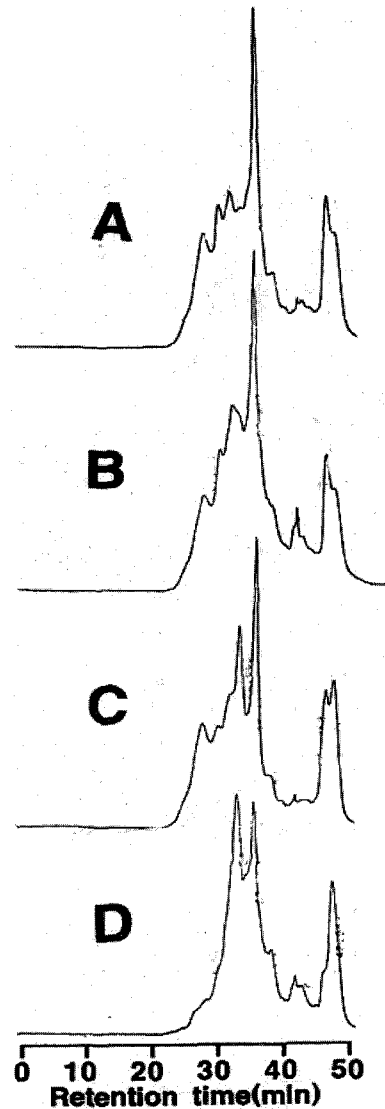


Fig. 10. Reaction product of Hammerstein milk casein by papain modified with IO<sub>4</sub>-oxidized soluble starch at pH 7.0 and 9.7.

Papain was modified in pH 7.0 and pH 9.7, and 2.0 mg and 8.0 mg of Hammerstein milk casein reacted in 0.2 M K-phosphate buffer(pH 7.0) at 37°C for 10 min. A and C were the products by native papain at pH 7.0 and pH 9.7, B and D the products by the modified papain at pH 7.0 and pH 9.7. flow rate, 0.5 ml/min: detect, UV 280 nm: column, Superose 12(1×30 cm): elute, 0.1 M K-phosphate buffer(pH 6.8) containing 0.2 M NaCl.

라졌다. 변화는 pH 7.0 변형보다 pH 9.7 변형의 경우가 더 커서 다른 변형 및 비변형의 경우는 35분에 주피크가 있지만, pH 9.7 변형의 경우는 33분에 더 높은 주피크가 생기고, 다른 변형 및 비변형의 경우 25분에 있던 피크가 pH 9.7 변형의

경우는 없어졌다. 이것은 pH 9.7에서 변형한 과파인의 기질 특이성 및 촉매 특이성이 가장 많이 변화한 것을 나타낸다.

아밀라아제의 경우<sup>9-13)</sup>는 기질이 대부분 전분이고, 전분은 글루코오스의  $\alpha$ -1,4결합 사슬에  $\alpha$ -1,6 결사슬이 더러 있는 단순한 구조이므로 효소를 변형시켜도 생성물에 큰 변화가 없으나, 과파인의 기질인 단백질은 아미노산 20개가 수많은 조합으로 결합하였기 때문에 과파인에 당이 결합하여 활성 부위나 기질 결합 부위를 저해하거나 변화가 생기면 평소 잘 분해하던 특정 아미노산과 특정 아미노산의 펩티드 결합에 대한 친화력 또는 가수분해력에 변화가 생겨서 다른 배열의 펩티드 산물이 생길 가능성이 있다.

### 요약 및 결론

NaO<sub>4</sub>-산화 가용성 전분을 pH 4.0, pH 7.0, pH 9.7에서 p-ain과 반응시켜서 산화 가용성 전분-과파인을 만들었다. 변형시키지 않은 과파인에 비하여 비활성은, 변형하여 NaBH<sub>4</sub> 처리하지 않은 과파인과 NaBH<sub>4</sub> 0.4% 처리한 과파인은 60%, NaBH<sub>4</sub> 1.5% 처리한 과파인과 NaBH<sub>4</sub> 4.0% 처리한 과파인은 70%로 저하하였다. NaBH<sub>4</sub> 환원은 변형 과파인의 열안정성에 영향을 미치지 않았다. pH 4.0에서 변형한 과파인은 80℃에서 40분 항온시킨 결과 54.7%의 활성이 남았다. pH 7.0, pH 9.7에서 변형한 과파인은 각 온도에서 40분간 항온한 결과 60℃까지 안정하였는데, pH 7.0 변형은 활성이 80℃에서 56.3%, pH 9.7 변형은 44.1%가 남았다. 열안정성 모습은 변형하지 않은 과파인과 유사하여 증가하지 않았다. pH 2.0~13.0의 범위에서 pH 4.0 변형 과파인은 pH 3.0~5.0사이의 안정성이 매우 저하하였으나, 나머지 pH에서는 비변형 과파인과 유사하고, pH 7.0 변형 과파인은 pH 2.0~6.0 사이에서는 비변형 과파인과 비슷하지만 알칼리 쪽일수록 안정성이 증가하였다. pH 9.7에서 변형한 과파인도 알칼리 pH일수록 안정성이 증가하였다. 햄머스타인 밀크 카제인에 pH 4.0, 7.0, 9.7에서 변형한 과파인을 작용시켜서 FPLC로 분석한 결과, 변형 과파인은 pH별 변형에 따라 분해물의 모습이 다른데, pH 9.7에서 변형한 결과가 가장 달랐다.

### 참고문헌

1. Iwase, H, Ohnishi, M, Kso, M, Hirabayashi, Y and Tamamoto K. Science of carbohydrate chain, pp.1-197. Bifukan. Tokyo, Japan. 1994
2. Ann, YG. Glycosylation of protein by conjugation of periodate-oxidized sugars. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 31:62-67. 1999

3. Ann, YG. Preparation mechanism of glycoprotein by periodate-oxidized soluble starch and maltooligosaccharides. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 31:482-487. 1999
4. Ann, YG, Iizuka M, Minamiura M and Yamamoto T. Evidence for the existence of an active monomer of sweet potato  $\beta$ -amylase. *Agric. Biol. Chem.* 53:3109-3110. 1989
5. Ann, YG, Iizuka M, Minamiura M and Yamamoto T. Preparation and some properties of active monomer of sweet potato  $\beta$ -amylase. *Agric. Biol. Chem.* 54:769-774. 1990
6. Ann, YG, Iizuka, M, Minamiura N and Yamamoto T. Active monomer of sweet potato  $\beta$ -amylase: Stabilization and an improved preparation method using  $\alpha$ -cyclodextrin. *J. Ferment. Bioeng.* 70:75-79. 1990
7. Minamiura, N, Ann, YG, Adachi, T, Ito, K, Iizuka, M and Yamamoto, T. Function of subunit structure of sweet potato  $\beta$ -amylase. *Microbial Utilization of Renewable Resources.* 7:18-24. 1990
8. Minamiura, N, Ann, YG, 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 Kagaku.* 38:153-157. 1991
9. Ann, YG and Minamiura, N. A study of  $\beta$ -amylase modified with periodate-oxidized soluble starch-Effect of  $\alpha$ -cyclodextrin. *Kor. J. Food & Nutr.* 11:159-164. 1998
10. Ann, YG, Anindyawatti, T, Ito, K, Iizuka M and Minamiura N. Stabilization of amylolytic enzymes by modification with periodate-oxidized soluble starch. *Kor. J. Food & Nutr.* 11: 561-564. 1998
11. Ann, YG. Stabilization of *Aspergillus* sp.  $\alpha$ -amylase by modification with periodate-oxidized starch. *Kor. J. Food & Nutr.* 12:265-270. 1998
12. Ann, YG. Stabilization of wheat  $\beta$ -amylase by modification with periodate-oxidized Starch. *Kor. J. Food & Nutr.* 13: 348-352. 2000
13. Ann, YG. Stability and modification of *Aspergillus awamori*  $\alpha$ -glucosidase with periodate-oxidized soluble starch. *Kor. J. Food & Nutr.* 18:4-1. 2005
14. Ann, YG. Experimental biochemistry, pp.97-99, Yangseogak. 1999
15. Ann, YG. Enzyme chemistry, p50, pp.391-394, Cheongmoon-gak. 1997

(2007년 10월 30일 접수; 2007년 12월 5일 채택)