J. KOREAN SOC. FOOD NUTR.
14 (2) 164~170 (1985)

Dithiocarbamate Wool에 固定된 不溶性 α-Amylase의 特性에 대하여

李 京 熙·金 鍾 德·李 康 鎬*

釜山大學校 藥學大學 藥學科, *釜山水產大學 食品工學科
(1985년 3월 5일 접수)

Enzymatic Characteristics of Water-Insoluble α-Amylase Immobilized on Dithiocarbamate Wool

Kyung-Hee Lee, Jong-Deog Kim and Kang-Ho Lee*

Department of Pharmacy, Pusan National University
**Department of Food Science and Technology, National Fisheries University of Pusan*
(*Received March* 5, 1985)

Abstract

Yellowish modified wool, dithiocarbamate(DTC) wool, was synthesized by partial hydrolysis in 0.2 N-NaOH reacting with carbon disulfide to use as α-amylase immobillzation matrix. α-amylase was immobilized reacting with sulfide group of DTC-wool by covalent binding within 1 hour. 0.5 gram of this preparation, DTC- wool-α-amylase, contained 150 ug of enzyme protein and its specific activity was about 90% of the native one. General properties of DTC-wool-α-amylase were a little different from optimum temperature, optimum pH, heat stability, kinetic constants and activation energy. An apparent Michaelis constant and maximum velocity of DTC-wool-α-amylase were 5.56 mg/ml and 0.37 mg/ml. min^{-1} respectively, while activation energy was 16.6 kcal/mole.

緖 論

酵素의 固定은 Nelson[1]等이 Alumina에 酵素를 吸着法으로 吸着 固定시킨 것을 始初로 Bernfeld[2]等이 β-amylase 및 amidase를 Polymeric Gel에 包括法으로固定하였고, Herzig[3] 等은 酵素를 Enol-2,4-disulfanilic Acid에 架橋法으로 固定하여 活性을 硏究하였다. 또, Goldstein[4,5]等은 Trypsin을 maleic acid와 ethylene의 copolymer에 共有結合法으로 固定하여 動力學的 動態를 硏究하였다.

固定化劑의 現狀은 Charcol, Kaolinate, Cellulose, Glass bead等을 利用한 이래 Landsteiner[1]가 高分子支持體로서는 처음으로 Diazohapten을 赤血球間質에 結合시킨후 固定化劑가 高分子化 되어 갔고 高分子合成 이후는 合成高分子 物質을 固定化劑로 利用하게 되어 Katchalski[1]等은 高分子物質의 化學的 性質, 結合酵素의 安定性, 結合酵素의 Functional Group을 體系化시켜 本格的인 酵素固定이 이루어져 Acrylic polymer 誘導體와 그의 Copolymer가 固定化劑로써 使用되었으며 Hornby[6]等에 의한 Nylon 誘導體 外에도 Polyacryl amide, Polymer Gel 等의 固定化劑가 開發되었다.

最近에는 Polysaccharide 類로서는 cellulose, seph-

arose, dextran, chitin 誘導體, vinyl polymer 로서 acrylamide 誘導體, polystyrene 誘導體, poly-acid와 蛋白質類로서 polyglutamic acid, poly-amide類로서는 nylon 誘導體, inorganic support로서는 porous glass 等이 主類를 이루고 있다.[1]

Polymer의 일종인 Wool이 酵素固定에 利用된 것은 Campbell[7]等이 Nylon의 peptide結合을 分解시켜 N, N-dimethyl-1, 3-propane-diamine과 bifunctional reagent를 使用하여 nylon tube에 酵素를 固定시킨 이후이다.

Wool은 peptide 結合으로 이루어져 있고 많은 amine基를 함유하고 있어 이러한 1 級 및 2 級 amine 基가 알카리성에서 二黃化炭素에 의해 dithiocarbamate化 된다는 것이 알려져 있다.[8] Han[9]等은 이렇게 變形된 wool이 吸着力이 강하여 중금속 吸着劑 開發에 유용함을 보고 하였으며, wool은 加熱時 殘存하는 NH_2 基에 의하여 thiourea가 形成된다는 것도 알려져 酵素의 固定이 可能함을 提示하였다. 또한 thiocarbamate wool은 熱에 不安定한 短點은 있으나 70°C 까지는 無妨하며 SH-reagent를 反應시키면 -S-S- bond를 갖는 可逆的인 固定化劑로서 사용할 수 있고, 酵素와의 反應時間이 1 時間 以內로 짧으며 反應槽로 부터 分離가 容易하여 工業的 利用이 期待되어지므로 dithiocarbamate wool을 固定化劑로 하여 固定한 DTC-wool-α-amylase의 活性을 觀察하여 그 結果를 native-α-amylase의 活性과 比較 檢討하였다.

理 論

Ⅰ. Dithiocarbamation

1 級 및 2 級 amine基가 알카리性에서 二黃化炭素에 의하여 쉽게 dithiocarbamate化 되는 것을 反應式으로 나타내면 式 (1), (2)와 같다.

$$R\cdot NH_2+CS_2 \xrightarrow{OH^-} R\cdot NH-C(=S)-S^- +H_2O \quad (1)$$

$$\begin{matrix}R_1\\R_2\end{matrix}\!\!>\!NH+CS_2 \xrightarrow{OH^-} \begin{matrix}R_1\\R_2\end{matrix}\!\!>\!N-C(=S)-S^- +H_2O \quad (2)$$

또, 加熱時에 thiourea가 形成되는 것을 式으로 나타내면 (3)式과 같다.

$$R=NH-C(=S)-S^- +H_2N-R' \rightarrow R-\overset{H}{\underset{|}{N}}-\overset{S}{\underset{\|}{C}}-\overset{H}{\underset{|}{N}}-R' + HS \quad (3)$$

材料 및 方法

1. 材 料

羊毛는 오스트레일리아産 메리노(Merino) 羊毛를 原料로 하여 ether에 2 日間 沈積시켜 脫脂시킨 後 室溫에서 風乾하여 使用하였다.

2. 酵 素

酵素 溶液은 α-amylase(和光純藥)를 0.15M—phosphate buffer(pH 6.0) 溶液으로 100 μg/ml 되겠끔 調製하여 使用하였다. (以下 Nat-α-amylase)

3. Dithiocarbamate Wool의 製造

脫脂한 羊毛 30 g 을 細絶한 後 0.2N-NaOH 溶液 2 l 에 넣고 二黃化炭素 50 ml 를 加한 後, 室溫에서 2 日間 反應시키고 BTB로 中性이 될 때까지 吸引濾過한 後, 蒸溜水로써 洗滌하고 室溫에서 乾燥시켜 使用하였다(以下 DTC—Wool)

4. 酵素活性 測定 및 蛋白質 定量

1.0%의 Starch 溶液을 基質로 하여 酵素와 反應시킨 後 遊離된 還元糖 量을 3, 5-dinitrosalicylic acid[12] 法으로 575 nm 에서 吸光度를 測定하였다. 活性單位는 1 分間 1 μM 의 glucose 生成量을 觸媒하는 DTC-wool-α-amylase量을 1 Unit(U)로 했으며 비교 對照酵素는 native-α-amylase를 使用하였다. 蛋白質의 定量은 Lowry法[13]으로 吸光度 定量했다.

5. DTC-wool-α-amylase의 製造

DTC-Wool 0.5g 을 비이커에 넣고 diamino spacer (以下 space reagent)로서 0.15 M-phosphate buffer (pH 7.0) 용액으로 調製한 0.5M-urea 溶液 50ml 를 加하여 室溫에서 2 時間 反應시키고 餘液을 同 buffer 溶液으로 洗滌한 後, bifunctional reagent 로서 0.15 M-phosphate buffer(pH 7.0)로 稀釋한 2.5% glutaraldehyde溶液 50ml 를 加하여 室溫에서 2 時間 反應시킨다음 同 buffer 溶液으로 洗滌하여 DTC-NH-space-NH-glutaraldehyde(以下 DTC-NB-Wool)을 製造하였다. 活性化된 DTC-NB-Wool을 비이커에 넣고 酵素溶液 5ml(500 ug/ml)를 加한 後 20°C water bath 에서 1.5 時間 反應시킨 後, 0.15M-phosphate buffer(pH 7.0) 溶液으로 洗滌하여 얻어진 固定 α-amylase(以下 DTC-wool-α-amylase)를 4°C에 保管

使用하였다.

6. 酵素의 活性 測定

1.0% Starch solution 50ml를 基質로 하여 nat-α-amylase는 100 ug/ ml로, DTC-wool-α-amylase는 0.5g을 넣고 90回/分으로 흔들면서 10분간격으로 測定하였으며 각 酵素의 반응 시간은 1.5時間으로 하였다.

7. 겉보기 $K_m(K_m^*)$ 및 겉보기 $V_{max}(V_{max}^*)$의 測定[11]

K_m^*및 V_{max}^*를 Michaelis-Menten方程式의 定積分形態를 利用하여 求하였으며, 그 식은 다음과 같다.

$$\frac{T}{Q}=\frac{K_m}{V_{max}}\left(\frac{1}{Q}ln\frac{1}{1-Q}-1\right)+\frac{C_0+K_m}{V_{max}}$$

T : 총 반응시간

Q : 기질 변환률

$Q=\frac{C_0-C_e}{C_0}$

C_0 : 초기 농도

C_e : 시간 t 에서의 농도

結果 및 考察

1. Dithiocarbamate Wool 合成의 最適條件[6]

Wool이 Dithiocarbamate化 되는 最適條件은 Table 1과 같았다.

위에서 보는 바와 같이 0.2N—NaOH 水溶液 中 에서 2~3日間 反應시키는 것이 適當함을 알 수 있었다.

2. Wool의 Dithiocarbamate化의 確認[6]

Dithiocarbamate化의 與否를 確認하기 위해 二黃化炭素로 處理하지 않은 羊毛와 處理한 羊毛의 硫黃含量을 分析해 본 결과 處理하지 않은 羊毛 1g 中에는 14.4 mg(n=3, S.D=2.7 mg), 處理한 羊毛 1g 中에는 54.1 mg(n=3, S.D=10.9 mg)이었고, 또한 IR Spectrum 上에서 2000—2500 cm^{-1} 사이에서 S=C=S의 吸收臺가 나타나지 않아 硫黃의 增加는 二黃化炭素가 Wool matrix에서의 水素結合이나 疏水性結合에 依한 것이 아님을 알 수 있었고 1400 cm^{-1}에서 Dithiocarbamate基의 特有한 吸收臺가 觀察된 것에서 알 수 있었다.

3. 酵素의 固定

0.5g 의 DTC-NB-Wool에 酵素의 固定은 1時間 以內에서 거의 이루어 졌으며 固定은 151.7 ug (n=4, S.D=2.5 ug) 로서 固定率은 30.3% 였다. Space reagent와 Bifunctional reagent는 分子量이 작고 測鎖의 길이가 짧은 것이 立體障碍를 줄이는 것으로 볼 수 있었다. 위의 結果는 Fig.1에 나타내었으며, DTC-wool-α-amylase 0.5 g에는 결합효소가 150 ug 임을 알 수 있었다.

4. 酵素活性과 反應時間

DTC-wool-α-amylase 및 Nat-α-amylase는 반응 후 70分에서 最大의 還元糖을 나타내었으며 DTC-wool-

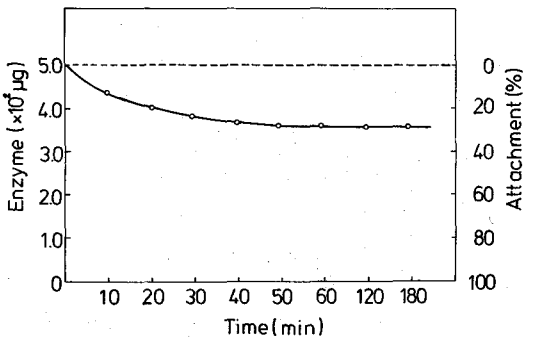

Fig. 1. Amount of α-amylase binded on DTC-NB-wool.

Table 1. The effect of sodium hydroxide strength and reaction time on the dithiocarbamation of wool

Normality of NaOH	Reaction time (days)				
	1	2	3	4	5
0.05	20.7	26.1	26.8	30.0	35.8
0.10	30.5	33.0	36.7	44.2	50.5
0.20	45.1	54.1	56.0	51.3	54.8

(unit:mg S/g D.W)

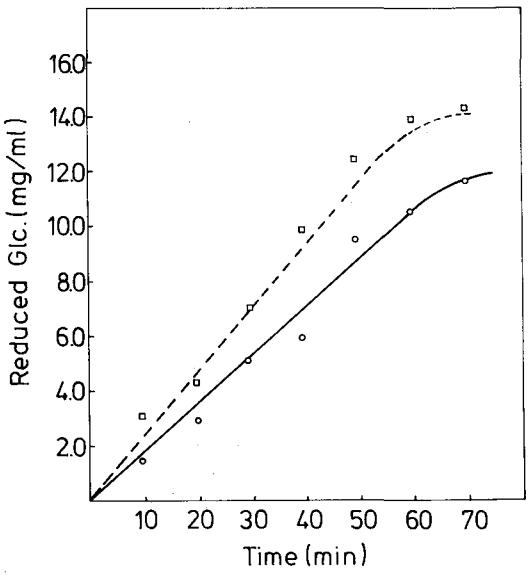

Fig. 2. Amount of the reduced Glc. on the time of DTC-wool-α-amylase(binding protein 150 μg) and nat-α-amylase (100 μg) for 1% starch solution.
○—○: DTC-wool-α-amylase.
□···□: Nat-α-amylase.

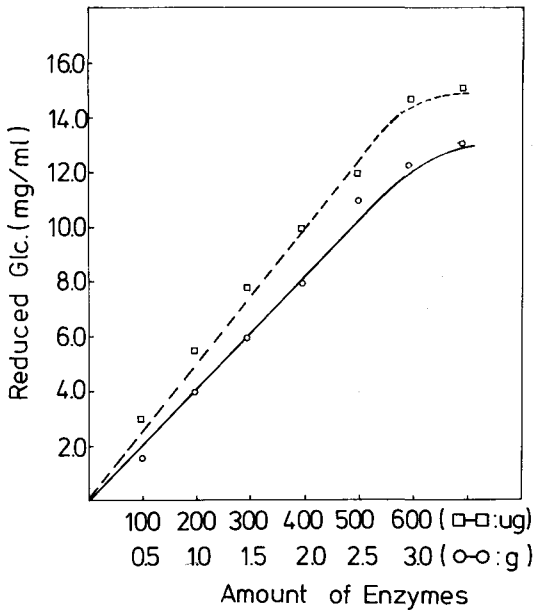

Fig. 3. Relationship between amount of enzyme and Glc. reduced from 1.0% starch solution
○—○: DTC-wool-α-amylase.
□···□: Nat-α-amylase.

α-amylase는 12.2 mg/ml 였고, nat-α-amylase는 14.6 mg/ml 였다. 위의 結果를 Fig. 2 에 나타내었다.

5. 酵素活性과 酵素量

DTC-wool-α-amylase 및 nat-α-amylase 모두 효소량을 增加시킬수록 活性은 增加되었으나, DTC-wool-α-amylase는 효소량 3.0 g 에서 還元糖이 13.5 mg/ml, Nat-α-amylase는 600μg/ml 에서 還元糖이 15.8mg/ml 를 나타내었으며, 더 이상의 酵素量에서는 活性이 增加하지 않았다. 위의 結果를 Fig. 3 에 나타내었다.

6. K_m* 및 V_{max}*[11]

Simple batch system에서 DTC-wool-α-amylase의 K_m* 및 V_{max}*를 Michaelis-Menten 方程式의 定積分形態를 利用하여 最適溫度 60°, 最適 pH 7.0 일 때의 것을 求하였으며, 結果는 Fig. 4 에 나타내었다.

그리고, 30°C, 40°C, 50°C, 70°C 및 80°C 에서의 K_m* 및 V_{max}*値는 Table 2 와 같았다.

위 Table에서 溫度가 增加할수록 V_{max}*値가 增加하여 60°C 에서 最大를 나타내고 70°C 以上의 溫度에서는 減少되는傾向을 보아 不活性化 되어짐을 볼

Table 2. The effect of temperature on V_{max}* and K_m*

Temp. (°C)	DTC-wool-α-amylase		Nat-α-amylase	
	V_{max}* (μg/ml·min^{-1})	K_m* (mg/ml)	V_{max} (μg/ml·min^{-1})	K_m (mg/ml)
30	39.82	22.27	87.74	2.47
40	99.10	0.12	105.54	4.08
50	146.95	0.67	110.62	4.96
60	370.37	5.56	114.51	3.82
70	7.83	11.11	0.22	9.49
80	9.8	11.09	0.92	10.13

V_{max}*, K_m*: Apparent V_{max} 및 K_m.

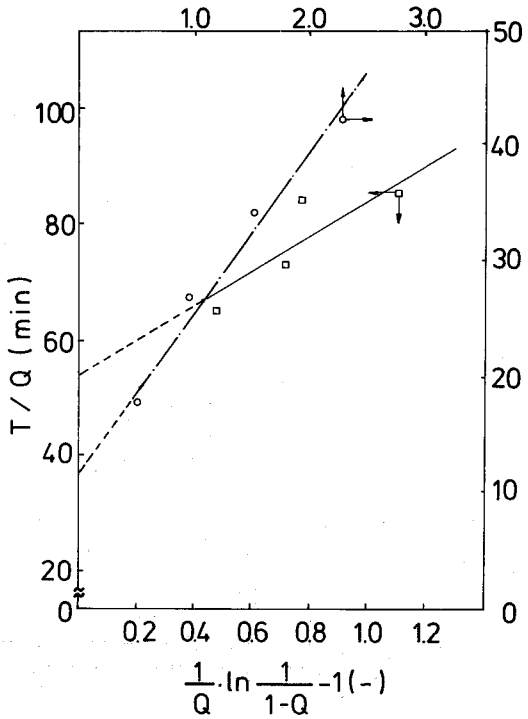

Fig. 4. Linear regression of integrated Michaelis-Menten equation. T/Q as a function of [1/Q. ln(1/(1−Q))]−1 with the reaction time, T and the substrate conversion, Q.
○—○: DTC-wool-α-amylase
□···□: Nat-α-amylase.

수 있었다. 온도에 따른 K_m値를 보면 Nat-α-amylase에서는 K_m値와 V_{max}와의 상관관계가 일률성이 있으나 DTC-wool-α-amylase에서는 상관관계가 떨어짐을 볼수 있었는데 이것은 固定化 酵素와 基質간의 입체장애, electrostatic force, partitioning effect, mass-transport등에 기인되는 것으로 사료되어 진다.

7. 最適溫度

DTC-wool-α-amylase는 溫度의 增加에 따라 活性이 增加되어 60C° 에서 還元糖의 量이 16 mg/ml 로서 최대의 活性에 到達하였고, nat-α-amylase는 60 °C 에서 15 mg/ml 로서 活性이 最大였다. 위의 結果를 Fig. 5 에 나타내었다.

8. 最適 pH 및 pH 安定性

DTC-wool-α-amylase는 pH 7.0 까지 活性이 增加되어 pH 7.0 에서 還元糖의 量이 16 mg/ml로서 最大

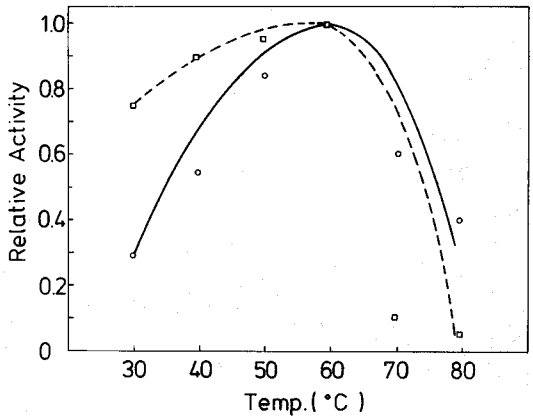

Fig. 5. Comperison with relative activity on the temperature of DTC-wool-α-amylase and Nat-α-amylase.
○—○: DTC-wool-α-amylase
□···□: Nat-α-amylase

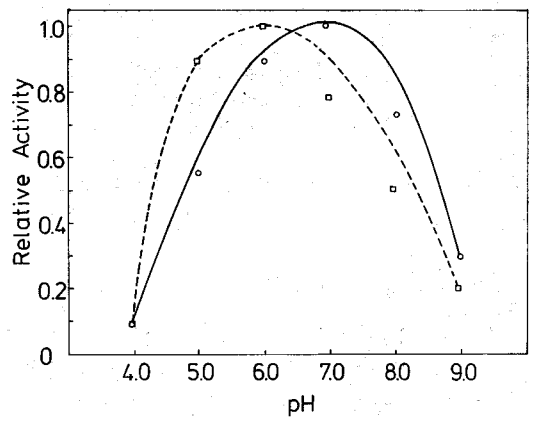

Fig. 6. Comparison with relative activity on pH of DTC-wool-α-amylase and Nat-α-amylase.
○—○: DTC-wool-α-amylase
□···□: Nat-α-amylase

의 活性을, nat-α-amylase는 pH 6.0 에서 還元糖의 量, 15 mg/ml 로서 活性이 最大였다. 위의 結果를 Fig. 6 에 나내타었다.

따라서 DTC-wool-α-amylase의 最適 pH는 pH 7.0 이었고 nat-α-amylase는 pH 6.0 이었다. 活性이 95 % 以上의 pH 安定性은 DTC-wool-α-amylase는 pH 6.0~7.0 이었고 nat-α-amylase는 pH 5.5~6.5 였다.

9. 耐熱性

DTC-wool-α-amylase와 nat-α-amylase 모두 70°C

以上에서는 活性이 減少됨을 볼 수 있고 70~80°C에서는 時間이 지날수록 活性이 減少하나 DTC-wool-α-amylase가 Nat-α-amylase 보다 耐熱性이 強함을 알 수 있었다. 위의 結果를 Fig. 7 에 나타내었다.

10. 活性化 Energy[15]

最適溫度(60°C) 前後는 反應速度가 같아짐을 볼 수 있었고 活性化 에너지는 DTC-wool-α-amylase가 16.6 Kcal/mole 이었고 Nat-α-amylase는 3.4 Kcal/mole 이었다. 위의 結果를 Fig. 8 에 나타내었다.

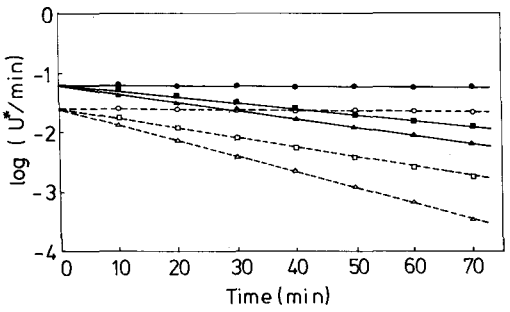

Fig. 7. The effect of heat on the activity of DTC-wool-α-amylase and Nat-α-amylase.

DTC-wool-α-amylase: ●—● 60°C
: ■—■ 70°C
: ▲—▲ 80°C
Nat-α-amylase : ○···○ 60°C
: □···□ 70°C
: △···△ 80°C

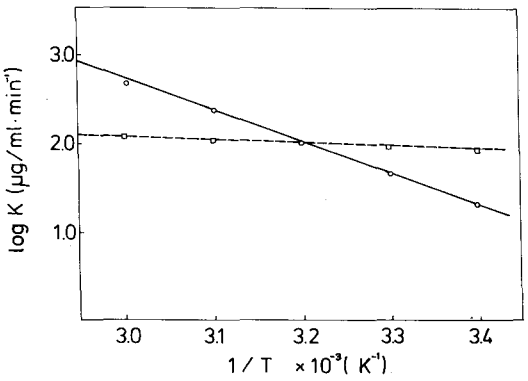

Fig. 8. Arrhenius plot for the activation energy on the temperature of DTC-wool-α-amylase and nat-α-amylase.
○—○: DTC-wool-α-amylase
□···□: Nat-α-amylase.

要 約

Thiocarbamate wool은 CS_2및 기타의 SH-reagent로 쉽게 修飾할 수 있을 뿐만 아니라 可逆的으로 使用이 可能하며 一般的인 條件에서도 酵素와 쉽게 結合하여 再使用 및 除去에 容易하므로 thiocarbarmate wool의 特異한 反應性을 利用, 酵素를 固定하여 工業的인 利用 目的으로 硏究 檢討하였다.

DTC-wool-α-amylase의 一般的인 性質은 Nat-α-amylase에 比하여 最適溫度, 最適 pH, 耐熱性, 動力學的 動態 및 活性化 에너지 等이 다르게 나타났다.

1) 反應時間은 70分에서 還元糖이 12.2 mg/ml로서 最大의 活性을 나타내었고

2) 酵素量은 3.0g 으로서 13.5 mg/ml의 還元糖으로 最大의 活性을 나타내었으며

3) Michaelis constant (K_m*)는 5.6 mg/ml 였고 V_{max}*는 370.37 μg/ml·min^{-1} 이었다.

4) 最適溫度는 60°C 였고 이때의 還元糖의 量은 16 mg/ml 였고

5) 最適 pH는 pH 7.0이었고 95% 以上의 活性을 나타낸 pH 安定性은 pH 6.0~7.0 이었다.

6) 耐熱性은 Nat-α-amylase 보다 強하였으며

7) 活性化 에너지는 16.6 Kcal/mole 이었다.

thiocarbamate wool은 可逆, 再使用 및 除去의 便利에 큰 意義를 둘 수 있으며 쉽게 調製할 수 있는 容易點이 있을 뿐 아니라 이 DTC-wool에서 酵素의 固定이 室溫에서도 짧은 時間 內에 이루어지며 상당히 높은 固定率을 기대할 수 있다. 또 最適溫度가 60°C 이고 最適 pH 는 7.0 이므로 反應裝置 및 運用에 별다른 어려움이 없고, 耐熱性이 強하므로 쉬운 條件 下에서 經濟的으로 工業的 利用에 有利하다고 判斷되어진다.

謝 辭

本 硏究를 遂行할 수 있도록 羊毛를 提供하여주신 泰光產業 株式會社에 깊이 感謝드립니다.

기 호 설 명

C : substrate concentration, mg/ml.
C_e : immediate concentration at $t=T$, mg/ml.
C_0 : starting concentration, mg/ml.

K_m : Michaelis-Menten constant, mg/ml.

K_m*: apparent Km, mg/ml.

R : reaction rate, mg/ml·min^{-1}.

T : reaction time, min,

Q : substrate conversion.

U : enzyme unit.

V_{max}: reaction rate at substrate saturation, mg/ml·min^{-1}.

V_{max}*: apparent V_{max}, mg/ml·min^{-1}.

참 고 문 헌

1. Goldstein, L. and Menke, G.: *Applied Biochemistry and Bioengineering*, Academic Press, New York, **1**, 126(1976)
2. Sideney, P.C. and Nathan, O.K.: *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York, **44**, 148(1976)
3. 辻阪好夫：酵素工學ハンドブック,(講談社, 東京) 163(1977)
4. Goldstein, L., Levin, Y., Pecht, M. and Katchalski, E: *Biochemistry*, **3**, 1905(1964)
5. Golodstein, L., Levin, Y., Pecht, M and Katchalski, E.: *Biochemistry*, **3**, 1913(1964)
6. Hornby, W. E., Campbell, J. and Morris, D.L.: *Biochem. J.*, **147**, 593(1975)
7. Campbell, J., Hornby, W.E. and Morris, D.L.: *Biochem. Biophs.*, **384**, 307(1975)
8. Henderikson, J.B., Cram, D.J. and Hammond, G.S.: *Organic Chemistry*, McGraw-Hill, KOGAKUSHA, Tokyo, 484(1972)
9. 한석규·이경희·김영미·윤일: 약학연구지, 부산대학교, **15**, 7(1981)
10. Crithfield, F.E. and Johnson, L.B.: *Anal. Chem.*, **28**, 430(1956)
11. Halwach. E: *Biotch. Bioeng.*, **20**, 281(1978)
12. Miller, G.L.: *Anal. Chem.*, **31**, 426(1959)
13. Hartee, E.F.: *Anal. Chem.*, **48**, 422(1972)
14. 高木誠 司: *Quantitative Analysis*,(共立出版株式會社, 東京), 505(1971)
15. Suzuki, H. and Maeda, H.: 日本農藝化學會誌 **44**, 547(1970)