

과요소산 산화 전분에 의한 고구마 β -아밀라제의 수식

安龍根·池義相*

日本 大阪市立大學 理學部 酵素化學研究室

*信興專門大學 食品營養科

Modification of Sweet Potato β -Amylase with Periodate-Oxidized Soluble Starch

Yong-Geun Ann · Eui-Sang Ji*

Laboratory of Enzyme Chemistry Faculty of Science, Osaka City University,
3-3-138 Sugimoto, Sumiyoshi, Osaka, 558, Japan

*Dept. of Food and Nutrition, Shin Heung Junior College, Euijungbu City,
Kyung Ki Do, 480-020, Korea

ABSTRACT

Sweet potato β -amylase is a tetrameric enzyme consisting of four identical polypeptide chains with a molecular weight of 5.6×10^4 , though most of the other β -amylases are monomeric enzymes. But, the relationship between subunit structure and catalytic function of the enzyme is not known. This study was done to know what the function of the subunit structure of the enzyme is.

We obtained the monomer from the enzyme by the treatment of SDS, alkali pH buffer and urea. But the monomer had not activity. We tried to prepare the active monomer from the enzyme by the modification with periodate-oxidized soluble starch. In the result, we succeeded in isolating an active monomer as an oxidized soluble starch-conjugated form. The active monomer had 57% of the original activity, 13.2% of the sugar and the molecular weight was estimated to be 6.4×10^4 .

This results suggest that the tetrameric form of the enzyme is a most stable one and exists in nature, and the subunit structure of the enzyme plays an important role in stabilization but not catalytic function.

I . 서 론

β -아밀라제 (α -1,4-glucan maltohydrolase

EC 3.2.1.2)는 글루칸의 α -1,4-결합을 비환원성 말단에서 차례대로 가수분해하여 β -말토스를 유리하는 효소이다.

현재까지 β -아밀라제는 여러 식물 및 미생물에서 보고¹⁾되어 있다. 그러나 그중 고구마 β -아밀라제만 분자량 55,707²⁾의 동일 서브유니트 넷으로 형성된 분자량 215,000의 테트라머일 뿐 다른 효소는 모두 분자량 5만 전후의 모노머이다³⁾.

이와 같이 고구마 β -아밀라제만 서브유니트 구조를 가지는 것은 특별한 의의가 있을 것으로 생각되나 고도 희석에 의해 실활된다는 보고³⁾에 따라 모노머는 활성을 가지지 않는 것으로 인식되어 왔다.

일반적으로, 효소 단백질의 서브유니트 구조의 결합양식과 서브유니트가 단독으로 촉매기능을 발휘하는가 여부를 밝히는 방법은 여러 가지가 있으나 그중 화학 시약에 의한 방법은 변성, 실활이 일어나 결과를 해석하기 어렵다⁴⁾.

본 연구는 고구마 β -아밀라제의 서브유니트 구조와 기능의 관계를 밝히기 위해 과요소산 산화 가용성 전분으로 효소단백질을 수식(당의 부가)시켜 활성을 나타내는 안정한 모노머를 조제하는 방법에 관한 결과이다.

II. 실험재료 및 방법

1. 고구마 β -아밀라제의 조제

고구마 β -아밀라제는 일본산 고구마 高系 14號의 착즙액을 100°C에서 10분간 열처리하여 함유 β -아밀라제에 상온의 아세톤에 대한 내성을 부여한 다음, 50% 및 45%의 2회의 아세톤 침전과 DEAE-cellulose 이온교환 크로마토그래피, Sephadex G-200 겔크로마토그래피, 결정화 등으로 정제하였다⁵⁾

2. 올리고 당 및 가용성 전분의 산화

전분 및 올리고 당 각 2g을 100 ml의 0.2 M NaIO₄ 용액에 현탁하여 4°C에서 40분 반응시킨 후 에틸렌글리콜로 잔류 NaIO₄를 소모시킨 후 가용성 전분은 증류수에 투석하고⁶⁾, 기타 올리고 당은 증류수를 사용, Sephadex G-25 칼럼 (1.9×150 cm)의 겔크로마토그래피로 정제한 후 동결 건

조하였다.

3. 시 약

가용성 전분은 국산화학, 분자량 측정용 표준 단백질은 Bio Rad 사 및 Pharmacia 사에서 구입하였다.

4. 활성 및 단백질 함량 측정

β -아밀라제 활성은 0.04% Triton X-100 이 함유된 0.05 M 초산완충액(pH 4.8) 중에서 효소를 1% 가용성 전분 기질과 37°C에서 10분간 반응시킨 후 Somogyi-Nelson 법으로 생성된 maltose를 정량하여 측정하였다. 1 unit는 1분간 1 μ mole의 maltose를 유리하는 활성으로 하였다.

단백질 함량은 $E_{280\text{nm}}^{1\%} = 17.1^{7)}$ 을 사용하여 정량하였다.

5. 모노머 해리조건의 검토

1) 가용성 전분의 산화도

0.2 M H₃BO₃-KCl-Na₂CO₃ 완충액(pH 9.7) 중에 상기의 과요소산 산화 가용성 전분액(10 mg/ml) 20 μ l와 효소액(2 mg/ml) 20 μ l를 37°C에서 10분간 반응시켜 HPLC로 분석하였다. 이하 별도의 언급이 없는한 수식조건의 검토는 0.1 M H₃BO₃-KCl-Na₂CO₃ 완충액(pH 9.7) 중에서 수행하였다.

2) pH

각 pH의 0.2 M H₃BO₃-KCl-Na₂CO₃ 완충액에 과요소산 산화 전분을 10 mg/ml 농도로 용해한 20 μ l를 효소액 20 μ l와 37°C에서 10분간 반응시켜 HPLC로 분석하였다.

3) 산화당쇄의 사이즈

효소액(2 mg/ml) 100 μ l와 여러 사이즈의 산화 당액(10 mg/ml) 100 μ l를 37°C에서 10분간 반응시켜 HPLC로 분석하였다.

4) 산화전분의 양

0.16 mg/ml 농도에서 10 mg/ml까지의 단계적 농도의 산화전분액 15 μ l와 효소액(2 mg/ml) 15 μ l를 37°C에서 10분간 반응시켜 HPLC로 분석

하였다.

5) 반응시간

산화전분액 (5 mg/ml) 50 μ l를 효소액 (2.5 mg/ml) 50 μ l와 37°C에서 반응시키면서 5분, 30분 및 2시간후 일부를 각기 취해서 HPLC로

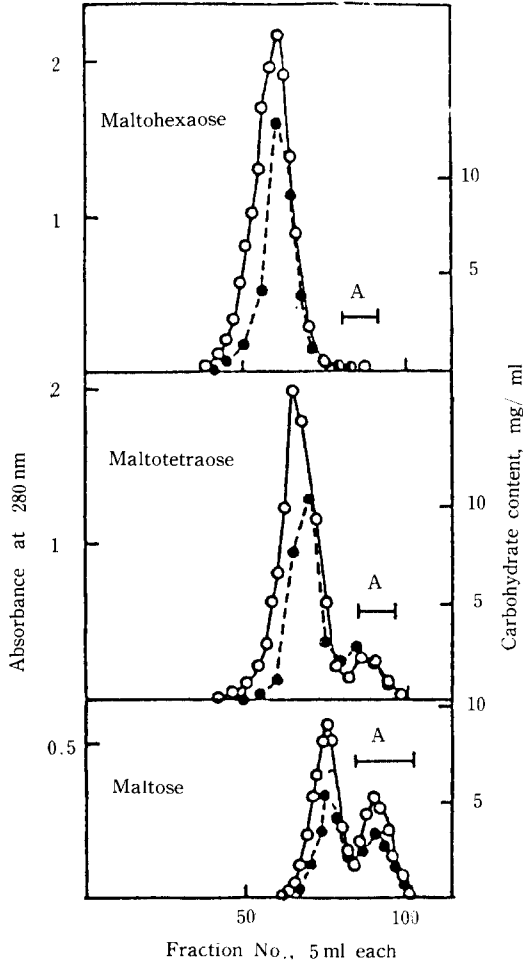


Fig. 1. Gel chromatography of oxidized maltooligosaccharides on column of Sephadex G-25

column size, 1.9×150 cm; elution, distilled water; flow rate, 15 ml/hour; ○, absorbance at 280 nm; ●, carbohydrate content.

분석하였다. 각 분획은 0.5 ml/min로 받아서 활성을 측정하였다.

6. 전기영동

13.5×13.5 cm의 플레이트에 아크릴아미드를 5%에서 20%까지 직선 농도구배로 중합시켜 pH 8.8의 Tris 완충액 계에서 전기영동 후 Coomassie brilliant blue로 염색하였다.

7. HPLC

모노머 해리조건의 검토는 K-인산완충액 (pH 6.8)을 사용, TSK SW gel 3000 (0.75×30 cm)칼럼을 장착한 Shimadzu 모델 LC 6 A HPLC 시스템으로 분석하였다.

III. 결 과

1. 산화가용성 전분 및 산화 올리고 당의 성질

Fig. 1은 말토올리고 당을 NaIO₄로 산화시켜 Sephadex G-25로 크로마토그래피한 결과로, 산화에 의한 알데히드의 280 nm에서의 흡광도(○)와, 페놀황산법에 의한 당의 흡광도(●)가 일치하고 있다. A는 NaIO₃의 피크이다.

Fig. 2는 각 당이 산화되어 생긴 알데히드의 자외부의 흡수 패턴으로 당의 종류에 따라 다른 패턴을 나타냈다. 이들 산화당은 Fig. 3의 B와 같이 알데히드가 나타내는 280 nm에서의 흡광도에서 비례관계를 나타내 정량성은 있으나 상온의 용액 상태에서는 불안정하여 경시적으로 흡광도가 감소하였다.

Fig. 3의 A는 알데히드의 환원력을 글리세랄 디하이드를 표준물질로 Somogyi-Nelson법으로 측정한 결과로 정량성을 보였다. 그러나 역시 경시적으로 감소하였다. 이에 따라 이들 산화당의 알데히드를 신속히 Somogyi-Nelson 법으로 정량한 결과 1g 당 가용성 전분은 2.05, 말토hex아스는 2.33, 말토tet라아스는 2.2, 말토스는 1.06 m mole이었다.

또 조제한 산화 가용성 전분은 Fig. 4와 같이

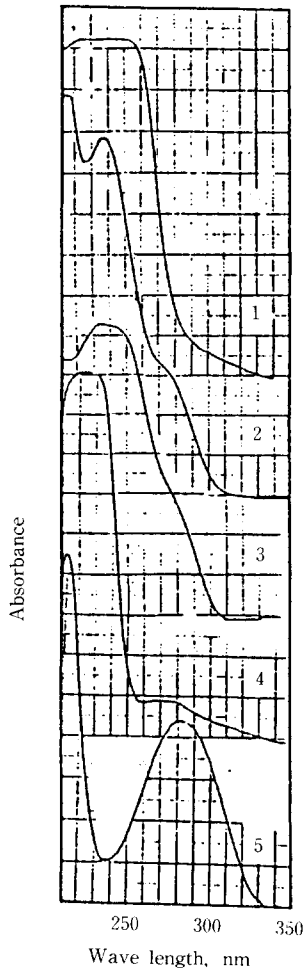


Fig. 2. UV spectra of oxidized soluble starch and maltooligosaccharides

Oxidized:1, soluble starch:2, maltohexaose:3, maltotetraose:4, maltose:5, glyceraldehyde.

네이티브 β -아밀라제에 의해서도, 수식한 β -아밀라제에 의해서도 가수분해 되지 않았다.

2. 모노머 해리조건외 검토

모노머 제조에 효과적인 당쇄의 사이즈는 전기영동적으로 말토테트라오스 이상이었다(Fig. 5).

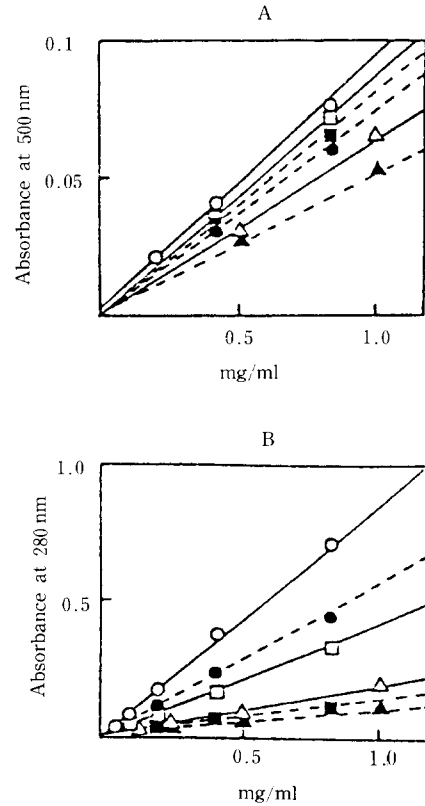


Fig. 3. Absorbance of oxidized soluble starch and maltooligosaccharides at 500 nm by Somogyi-Nelson method and 280 nm

○, Oxidized maltohexaose; ●, oxidized maltohexaose after standing at 23°C for 16 hrs ; □, oxidized maltotetraose; ■, oxidized maltotetraose after standing at 23°C for 16 hrs ; Δ, soluble starch ; ▲, soluble starch after standing at 23°C for 16 hrs .

SDS 처리 결과 말토스와 글리세랄디하이드에 의해서도 같은 패턴을 나타내 모노머의 해리와는 별도로 기본적으로 모두 수식을 받고 있는 것으로 나타났다.

Fig. 6 은 가용성 전분의 산화율에 따른 모노머

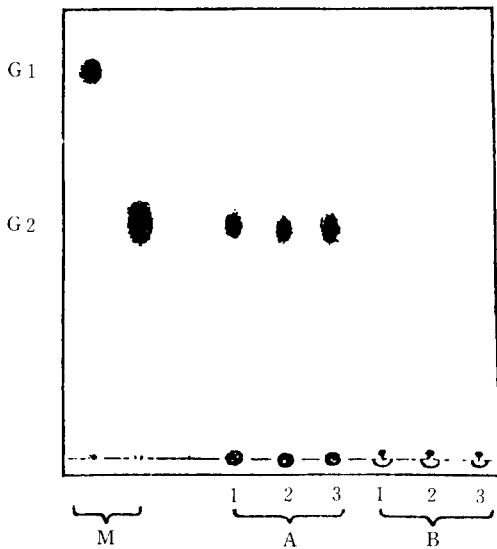


Fig. 4. Thin layer chromatography of reaction products from soluble starch and oxidized soluble starch by sweet potato β-amylase

One % soluble starch and oxidized soluble starch in 0.1 M acetate buffer (pH 5.0) were reacted with the enzyme (300 units/ml) at 37°C for 1 hour. M, markers: G 1, glucose; G 2, maltose; A, enzyme: 1, original enzyme; 2, F-A; 3, F-B+ soluble starch.; B, enzyme: 1, original enzyme; 2, F-A; 3, F-B+ oxidized soluble starch. The terms of F-A and F B are described below in text.

(C)의 해리로, 40 분간 산화시킨 경우 가장 효과적이었다.

Fig. 7.은 수식시의 pH 조건에 따른 모노머 (D)의 해리로 pH 9.5 부근에서 가장 많은 모노머가 해리되었다. pH 10 이상에서는 역으로 감소하

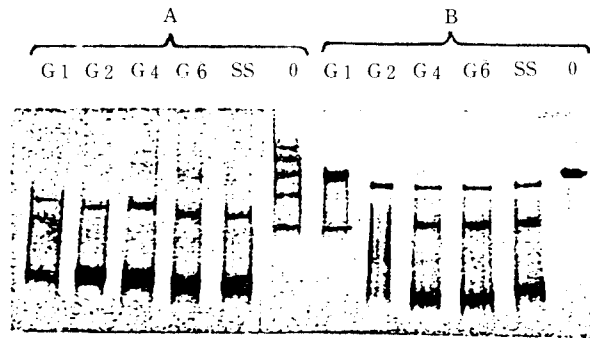


Fig. 5. PAGE of sweet potato β-amylase modified with oxidized soluble starch and several maltooligosaccharides.

Fifty μl of the enzyme solution (1 mg/ml) was added to 50 μl of each oxidized sugar solution (20 mg/ml in 0.2 M H₃BO₃-KCl-Na₂CO₃ buffer, pH 9.7) and incubated at 37°C for 10 min. SDS-treatment of the modified enzymes were done in the presence of 1% SDS at 100°C for 2 min, and then 10 μg/lane of the samples were applied. The electrophoresis was performed at pH 8.8 and 30 mA of electric current using acrylamide gel of a linear gradient system from 5% to 20% concentration. Treated: A, with SDS; B, without SDS. Enzyme with modified: G 1, glyceraldehyde; G 2, oxidized maltose; G 4, oxidized maltotetraose; G 6, oxidized maltohexaose; SS, soluble starch; 0, original enzyme.

였다.

Fig. 8은 산화전분의 양에 따른 수식조건을 검토한 결과로, 산화전분이 효소보다 4배 정도 더 많은 경우(가)가 가장 효과적이었다.

Fig. 9는 반응시간에 따른 모노머의 해리조건을 검토한 결과로, 시간이 길수록 모노머 (D)의 해

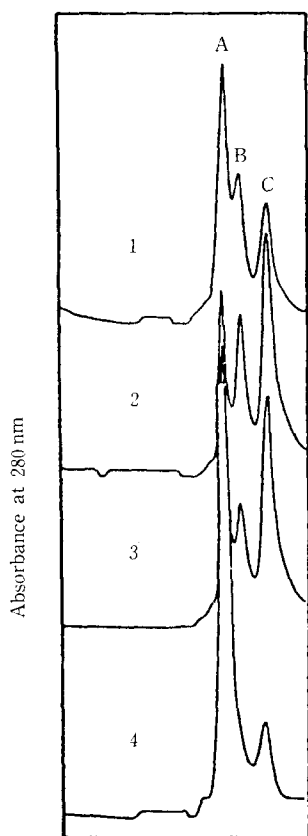


Fig. 6. HPLC patterns of sweet potato β -amylase modified with several kinds of oxidized soluble starches prepared by different oxidation

Soluble starch (2 g) was oxidized with 0.2 M NaIO_4 100 ml at 4°C for each time. The enzyme (2.5 mg/ml) was modified with the oxidized soluble starch (10 mg/ml) in 0.1 M H_3BO_3 -KCl- Na_2CO_3 buffer (pH 9.7) at 37°C for 10 min. Column, TSK gel SW 3000 (0.75 \times 30 cm); elution buffer, 0.1 M K-phosphate buffer (pH 6.8); flow rate, 0.3 ml/min. Oxidation: 1, 10 min; 2, 20 min; 3, 40 min; 4, 80 min. A, F-A; B, original enzyme; C, F-B.

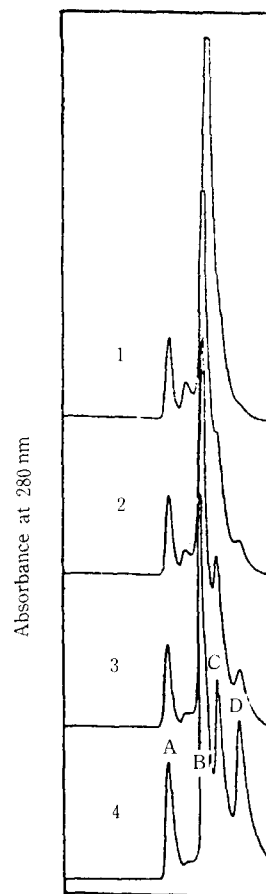


Fig. 7. HPLC patterns of sweet potato β -amylase modified with oxidized soluble starch in buffer solution of various alkaline pH

The enzyme (1 mg/ml) was reacted with oxidized soluble starch (5 mg/ml) in 0.1 M various pH H_3BO_3 -KCl- Na_2CO_3 buffers at 37°C for 10 min. Column, TSK gel SW 3000 (0.75 \times 30 cm); elution buffer, 0.1 M K-phosphate buffer (pH 6.8); flow rate, 0.3 ml/min. Modification at pH: 1, 8.0; 2, 8.5; 3, 9.0; 4, 9.5. A, F-1; B, F-A; C, original enzyme; D, F-B.

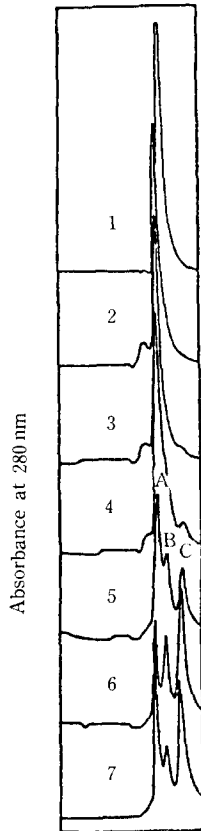


Fig. 8. HPLC patterns of sweet potato β -amylase modified with various concentrations of oxidized soluble starch

The enzyme (1 mg/ml) was reacted with various concentration of the oxidized soluble starch in 0.1 M H_3BO_3 -KCl- Na_2CO_3 buffer (pH 9.7) at 37°C for 10 min.

Column, TSK gel SW 3000 (0.75×30 cm); elution buffer, 0.1 M K-phosphate buffer (pH 6.8); flow rate, 0.3 ml/min. Concentration (mg/ml) of oxidized soluble starch; 1, 0; 2, 0.16; 3, 0.31; 4, 0.63; 5, 1.25; 6, 2.5; 7, 10.0. A, F-A; B, original enzyme; C, F-B.

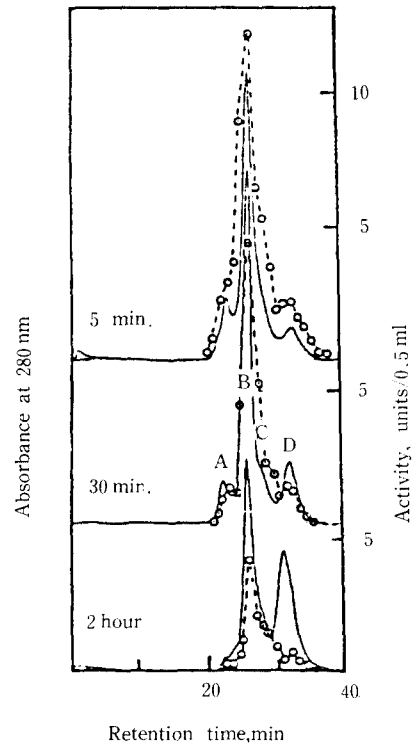


Fig. 9. HPLC patterns of sweet potato β -amylase modified successively with oxidized soluble starch

Oxidized soluble starch (2.5 mg/ml) in H_3BO_3 -KCl- Na_2CO_3 buffer (pH 9.7) was reacted with the enzyme (1.25 mg/ml) at 37°C for each time. Column, TSK gel SW 3000 (0.75×30 cm); elution buffer, 0.1 M K-phosphate buffer (pH 6.8); flow rate, 0.3 ml/min. A, F-1; B, F-A; C, original enzyme; D, F-B. —, absorbance at 280 nm; ○-, activity.

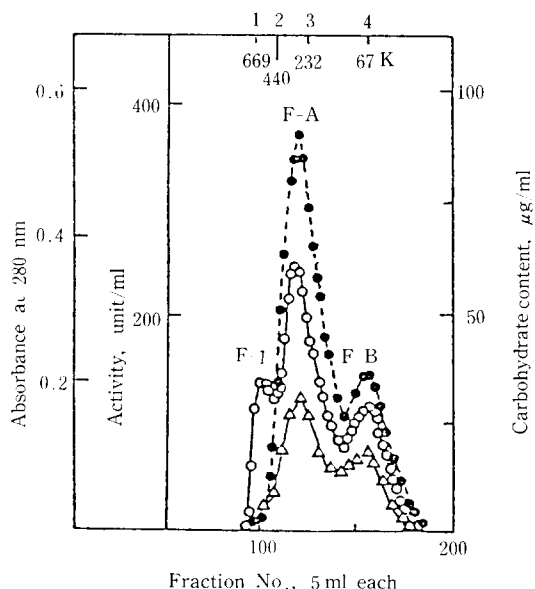


Fig. 10. Exclusion chromatography of sweet potato β -amylase modified with oxidized soluble starch on a column of Sephadex G-200

Sixty mg of sweet potato β amylase was incubated with 250 mg of the oxidized soluble starch in 10 ml of 0.13 M H_3BO_3 KCl- Na_2CO_3 buffer (pH 9.7) at 37°C for 10 min. Then, pH of the mixture was adjusted to 7.5 by addition of a 1 M $NaBH_4$ -HCl solution (pH 4.5). After dialyzing against 0.1 M $NaBH_4$ -HCl buffer, pH 7.5, at 4°C for 24 hour the dialyzed solution was applied to the column (3.5×104 cm) in 0.1 M K-phosphate buffer (pH 6.8) containing 0.1 M NaCl. ○, absorbance at 280 nm; ●, activity; Δ, carbohydrate content. 1, thyroglobulin; 2, ferritin; 3, catalase; 4, bovine serum albumin.

리량은 증가하였으나 비활성은 점차 감소하였다. 이는 얻어진 모노머가 수식시의 알칼리 조건에 매우 불안정한 것을 의미한다. 따라서 해리모노머가 pH의 영향을 별로 받지 않는 반응시간인 10분으로 한정하여 수식하였다.

3. 수식효소의 분리 및 성질

이상의 실험을 통해 얻은 최적조건에서 본효소를 수식, Sephadex G-200의 크로마토그래피로 비수식 효소를 분리하여 Fig. 10의 결과를 얻었다.

수식효소는 3개의 단백질 피크(○F-1, F-A, F-B)로 나누어졌다. F-A와 F-B는 모두 활성(●) 및 phenol-황산법에 의한 당 피크(Δ)가 단백질 피크와 일치하였다. F-1은 수식시 변성된 효소이다.

분자량은 비수식 효소의 모노머가 55,600의 분자량을 나타내는데 반해 수식 모노머(F-B)는 64,000으로 당이 부가된 만큼 커진 분자량을 나타냈다. 네이티브 효소는 215,000의 분자량을 나타내나 F-A는 315,000으로서 수식된 모노머 5에 해당되는 펜타머의 분자량을 나타냈다. 현재 어찌서 본수식으로 펜타머가 생기는가는 밝히지 못했고, 계속된 연구를 통해 밝힐 예정이다.

비활성은 네이티브 효소가 2,500 unit/mg인데 비해 F-B, 모노머는 1,436 unit/mg로 40%, F-A 펜타머는 1,769 unit/mg로 70%의 활성을 나타냈다. 수식에 의해 효소분자에 결합된 산화기용성 전분의 함량은 13.4%이었다.

수식 모노머의 반응 최적온도 및 pH와 K_m 은 네이티브 효소와 별 차이 없었으나 온도 및 pH에 대한 안정성은 약간 저하하였다.

이들 조제된 활성 모노머 및 펜타머는 HPLC 및 전기영동 분석결과 균일하였다.

IV. 고 찰

다른 β -아밀라제는 모두 분자량 5만 전후의 단량체인데 반해 고구마에서 얻어지는 β -아밀라제

만 분자량 55,707²⁾의 동일 서브유니트로 형성되는 테트라머이다. 이와 같이 고구마 β -아밀라제만 테트라머의 서브유니트 구조를 형성하고 있는 것은 특별한 의의, 즉, 촉매기능의 발현, 또는 효소반응의 제어나 효소 분자의 안정화 기능을 담당하기 위한 것으로 생각되나 지금까지 그에 대해서는 밝혀진 바가 적고, 고도희석에 의해 해리 실행된다는 보고와 화학시약으로 처리하여 얻은 모노머는 활성을 나타내지 않기 때문에 모노머는 활성을 가지지 않는 것으로 인식되어 왔다.

그러나 본연구는 불안정하여 거의 활성을 나타내지 않던 모노머를 저자가 개발한 수식법으로 안정화시켜 활성을 갖는 모노머로서 조제하는데 성공함에 따라 본 효소의 서브유니트 구조는 촉매기능 때문이 아니고 효소의 안정화 기능을 위한 구조로서 존재한다고 하는 새로운 사실을 밝혔다.

본 수식방법은 서브유니트로 형성되는 큰 분자량의 효소를, 수식으로 서브유니트로 나누어 결정화할 수 있기 때문에 분자량이 지나치게 커서 지금까지 어려웠던 효소 단백질의 입체구조의 X-선 해석을 가능하게 할 수 있다. 또, 서브유니트 구조와 기능의 관계를 밝히고, 불안정한 효소를 안정화시키고, 약품투여시 문제가 되는 면역을 완화시키고, 전분 및 셀룰로스를 산화시켜 알데히드와, 효소나 미생물 분자 및 세포 표면의 ϵ -Lys의 NH_2 기와의 직접 반응으로 효소 등을 고정화시키는데 응용할 수 있는 등 다양한 용도를 가지고 있다.

본 결과는 산화가용성 전분에 의한 고구마 β -아

밀라제의 수식⁶⁾에 대한 결과이나, 이후 말토헥사오스에 의한 수식⁵⁾ 및 수식시 경쟁적 저해제인 α -사이클로헥사아밀로스가 활성모노머의 조제에 매우 뛰어난 안정제로서의 역할을 하는 결과⁸⁾ 등에 대해서도 보고가 있을 것이다.

V. 참고문헌

1. Thoma, J.A., Spradlin, J.E. and Dygert, S.: in "The Enzymes", Vol. 5 th, ed. by P.D. Boyers, Academic Press, New York, pp. 115-189(1971)
2. 戶田弘子: 澱粉科學, **36**, 87(1989)
3. Bernfeld, P., Bakeley, B.J. and Bieber, R.E.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **111**, 31(1965)
4. 河原一男: 八木泥皓記. 生化學實驗講座 1, 蛋白質 化學 III, 日本生化學會編, pp. 447-476.
5. Yong-Geun Ann, Masaru Iizuka, Takehiko Yamamoto and Noshi Minamiura: *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 769(1990)
6. Yong-Geun Ann, Masaru Iizuka, Noshi Minamiura and Takehiko Yamamoto: *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 3109(1989)
7. England, S. and Singer, T.P.: *J. Biol. Chem.*, **187**, 213(1950)
8. Yong-Geun Ann, Masaru Iizuka, Takehiko Yamamoto and Noshi Minamiura, *J. Ferment. Bioeng.*, in printed(1990)

(1990년 8월 25일 수리)