

# 효소의 정제와 안정화

## (Purification and Stabilization of Enzyme)

전 흥 기

부산대학교 자연과학대학 미생물학과

### I. 서 론

생물에 의해서 생산되는 생체촉매인 효소의 종류는 현재 알려져 있는 것만으로도 약 2,200여종이 있다. 효소의 대부분은 생산한 생물의 세포내에 존재하며, 생물체에서 볼 수 있는 모든 화학반응을 촉매하고 있다. 예를 들면 생물에 있어서 필수적인 에너지를 획득하기 위해서 생물은 호흡, 발효 등의 생물현상을 구현해 가고 있지만, 이들 현상은 생체내에서 일어나는 화학반응이다. 즉 세포내에 흡수된 화학물질이 산화, 인산화 등등의 화학변화를 받아, 잇달아 다른 물질로 되면서 변화되어 간다. 이처럼 생체내에서 일어나는 화학반응을 일반적으로 물질대사라고 부르고 있는데, 이들 물질대사의 각 단계는 각각 특유한 효소에 의해서 촉매되고 있다.

현재 수많은 대사경로가 알려져 있으며 이들은 metabolic map으로서 정리되어 있다. 생물화학에서 취급되고 있는 대부분의 효소는 metabolic map에 나타난 대사의 각각의 단계(화학반응)를 촉매하는 효소로써 생물학적 혹은 생리학적인 의의가 해명되어 있다. 그러나 현재로서는 metabolic map과는 관계없는 효소로 취급되는 것도, 생물이 생명유지를 위해서는 필수적인 어떤 화학반응을 촉매하고 있는 것으로 생각되고 있다.

생체내에 존재하는 무수한 효소중에서 개개의 특이적인 효소의 성질을 해명하기 위해서는 촉매성의 기반이 되고 있는 효소단백질의 구조라든가 성질을 검토하지 않으면 안된다. 그렇게 하기 위해서는 될 수 있는 한 목적효소를 생체내에 존재할 때와 같은 상태로 순수하게 정제할 필요가 있다.

우선 적당한 재료를 선택하고, 세포내효소의 경우는 재료를 파괴해서 목적하는 효소를 추출·가용화하지 않으면

안된다. 일반적으로 효소류는 생체내에 존재할 때는 상당히 안정하게 유지되지만, 일단 세포외에 추출되면 생체내에서의 생리적 조건으로부터 벗어나기 때문에 서서히 실활되는 경우가 많다. 따라서 효소의 취급에는 안정성을 고려한 세심한 주의가 필요하다.

### II. 효소의 단리와 정제에 관한 기본적 사항

생체내에서 효소가 어떠한 상태로 존재하고 있는가는 효소의 종류에 따라 다르다. 혈액, 소화액 등의 체액중에서는 유리상태로서 효소가 포함되어 있지만, 대부분의 효소는 세포내에 존재하며 또한 미생물의 경우에는 배양액중에 분비되는 세포외효소와 세포내효소로 대별된다. 효소의 형태를 살펴보면, 일반적으로 단순단백질로 된 효소와 보조효소를 가지고 있는 복합단백질로 된 효소를 생각할 수 있는데 효소의 분리 및 정제에서는 효소의 본체가 천연고분자 화합물인 단백질이므로 일반적인 단백질의 정제법으로써 사용되고 있는 방법이 적용되고 있지만, 각 정제단계마다 효소활성과 정제도 등을 검토하면서 활성의 저하를 가져오는 조작은 피해야 된다. 정제에 이용될 수 있는 특성은 ① 고분자물질일 것, ② 양성전해질일 것, ③ 무기중성염류에 의해서 염색될 것, ④ 유기용매에 불용성일 것 등이 있다.

단백질의 특이적인 성질은 그것을 구성하는 아미노산(약 20종류)의 종류와 배열순서에 의존하고 있다는 것은 말할 것도 없지만 특히 단백질이 생리활성을 나타내는 경우에는 특이적인 공간적 배치를 가지고 있는 고차구조가 중요한 역할을 하고 있다. 단백질의 일차구조인 peptide는 일반적으로 안정해서 아주 과격한 조건(6N HCl, 110°C, 2시간 정도)이 아니면 가수분해되지 않는다. 그러나 고차구조를

유지하는 공유결합인 disulfide결합(-S-S-)을 제외한 비공유결합(수소결합, 이온결합, 소수결합, van der Waals 힘)은 특히 불안정해서, 비교적 온화한 조건하에서도 분해를 받는다. 예를 들면 pH, 온도, 염농도 등의 아주 적은 변화에서도 단백질의 입체구조에 변화가 일어나서 특이적인 생리활성을 잃어버리는 일이 종종 있다.

단백질의 분리·정제를 실시할 때에는 먼저 목적하는 효소의 활성측정법을 충분히 검토해서 정확한 측정방법을 확립해야 한다. 다음으로 효소활성은 환경조건, 특히 pH, 온도, 염류의 종류와 보효소를 필요로 하는 효소는 보효소의 농도 등에 따라서 예민하게 변동하기 때문에, 분리 및 정제의 전제조건으로써 생물체로부터 추출한 추출액중의 효소의 안정성을 검토하여, 효소의 안정영역내에서 분리·정제와 효소의 보존을 행하여야 한다. 여기에서 효소의 분리·정제의 방법을 요약해 보면, 개개의 효소를 구성하고 있는 아미노산의 종류, 수, 배열순서, 공간적 배치에 따라서 각각 성질을 달리하고 있다. 예를 들면, 안정성, 용해도, 전기적 성질, 크기, 밀도 등이 각각 효소에 따라 다르다. 이와같은 성질의 차를 이용하여 목적효소를 혼재된 단백질로부터 분리해 내는 것이 효소정제의 원리이다. 단일분자로 되어 있는 단량체효소(monomeric enzyme)의 정제법은 상범화 되어 있으며, 특히 chromatography의 개발에 의하여 거의 완성되었다고 보아도 과언이 아니다. 그러나 분자집합체의 형태를 가진 효소(oligomeric enzyme)를 정제할 경우에는 상범에 따라서 무조건 이온교환 chromatography 등을 사용하면, 분자집합체의 파괴에 의한 실활을 가져오는 경우가 있으므로 이와같은 효소의 정제에는 다른 방법의 개발이 필요하다.

### III. 일반적인 효소의 안정화와 보존

효소의 안정성은 정제도, 효소농도 혹은 혼재하고 있는 물질에 따라서 다르기 때문에 조효소액(粗酵素液)에서 정한 안정조건이 반드시 정제효소에 적용된다고는 말할 수 없다. 또한 정제과정에서 미생물에 의한 오염으로 효소의 실활이 일어나는 경우가 있기 때문에 실온에서의 정제시는 특별히 주의할 필요가 있다. 효소용액은 여러가지 온도에서 일정시간 처리한 후에, 보존온도로 바꾸어서 효소의 활성을 측정하면 효소의 열안정곡선을 얻을 수 있다. 대부분의 효소는 50°C 전후에서 열변성이 시작되며, 온도가 높을수록

변성속도가 빨라져서 급속하게 활성이 저하된다. 효소활성이 저하되지 않고 안정하게 보존될 수 있는 온도를 열안정영역 혹은 온도안정영역이라고 부르며, 이러한 안정영역은 효소의 종류에 따라서 다르다. 일반적으로 효소는 저온에서 안정하므로 동결시키든가 혹은 황산암모늄으로 염색을 하여 0~4°C의 냉암소에서 보존하는 방법이 사용되고 있다. 그러나 *Neurospora crassa*로부터 분리된 glutamate dehydrogenase(1)와 효모(2) 및 *Streptococcus faecalis*(3)의 ATPase등의 경우는 저온감수성효소(cold labile enzyme)로써 0°C 부근에서는 오히려 불안정하며, 30°C 부근에서 안정성을 나타내는 예외적인 것도 있다.

대부분의 효소는 70°C 전후의 고온에서는 완전히 실활하지만 고온에서 생육하는 미생물의 효소중에는 90°C에서 1시간 가열하여도 90% 이상 활성을 유지하는 내열성효소가 존재하는데, 이와같은 높은 열안정성은 목적효소의 분리정제에 그대로 이용되고 있다.

효소의 안정성은 효소의 순도에 따라서 영향을 받는 경우가 있는데, *Pseudomonas synxantha* A3로부터 추출한 adenine deaminase(4)의 경우를 보면, 부분정제 효소는 매우 안정하지만 gel 여과과정을 거친 정제효소는 극히 불안정한 성질을 가지고 있다. 이와는 반대로 목적효소의 순도가 높아짐으로서 안정해지는 경우도 있으며, 때로는 기질과 효소를 공존시킴으로써 안정성을 증대시키는 보존법도 사용되고 있다.

효소의 pH안정성은 언제나 검토되어야만 하는 기본적인 사항중의 하나이다. 효소용액의 pH를 여러가지 완충액을 사용하여 조정해서, 일정한 시간동안 방치한 후에 활성측정 pH에서 각각을 측정하면 pH안정곡선을 얻을 수 있다. pH안정영역 역시 효소의 종류에 따라서 다르다. 난백(卵白) lysozyme은 pH 3~11이라는 아주 넓은 안정영역을 가지지만, pepsin은 pH 1~5라는 산성영역에서는 안정하며, pH 6이상에서는 실활한다. 그러나 trypsin의 경우는 산성에서 실활하지만, 이것을 다시 약알칼리성으로 조절하면 활성이 회복된다. 효소의 안정영역은 효소단백질의 등전점과는 관계는 없으며, 일반적으로 볼 때 pH 4~5에서 8~10사이 안정영역을 가지는 효소가 가장 많다. 그리고 한 효소의 pH안정성은 방치시간, 온도에 따라 좌우되며, 이때에도 효소의 순도에 따라서 안정성이 다르다.

공기중(산소의 존재하)에서 불안정하며 약간씩 실활되어가는 효소의 경우는 효소단백질중에 포함된 필수 반응

Table 1. Purification of xanthine dehydrogenase from *Pseudomonas synxantha* A3

| Purification step                          | Total protein<br>(mg) | Total activity<br>(units) | Specific activity<br>(units/mg protein) | Relative purification | Yield (%) |
|--|-----------------------|---------------------------|---|-----------------------|-----------|
| 1. Crude extract                           | 40,500                | 1,629                     | 0.040                                   | 1                     | 100       |
| 2. Ammonium sulfate<br>(20~40% saturation) | 12,150                | 867                       | 0.071                                   | 1.8                   | 53        |
| 3. DEAE-cellulose                          | 3,710                 | 1,107                     | 0.300                                   | 7.5                   | 68        |
| 4. DEAE-Sephadex A-50                      | 205                   | 216                       | 1.05                                    | 26.3                  | 13        |
| 5. Sephadex G-200                          | 75                    | 174                       | 2.32                                    | 58                    | 11        |
| 6. First crystallization                   | 9                     | 165                       | 18                                      | 450                   | 10        |
| 7. Second crystallization                  | —                     | —                         | —                                       | —                     | —         |
| 8. Third crystallization                   | 8                     | 159                       | 20                                      | 500                   | 9.8       |

기인 SH기가 산소에 의해서 산화되는 결과가 주된 원인이 되는 경우가 많은데 이러한 경우에는 cysteine, 2-mercaptoethanol, 환원형 glutathione, 1,4-dithiothreitol 등과 같은 SH 시약의 첨가에 의해서 실활을 방지할 수 있다. *Pseudomonas synxantha* A3의 xanthine dehydrogenase(5)는 효소의 추출 및 정제과정에 2-mercaptoethanol과 EDTA(ethylenediaminetetraacetate)를 효소용액중에 첨가함으로써 효소를 안정화시켜, 최후의 수단으로써 결정화(황산 암모늄 첨가)에 의한 정제방법을 선택함으로써 정제가 되었다(Table 1). Fig. 1은 각 정제단계의 전기영동 pattern을 나타낸 것이며, Fig. 2는 xanthine dehydrogenase의 결정(fragile rod-shaped crystals, reddish brown)사진을 나타낸 것이다. Xanthine dehydrogenase의 결정화는 우리들이 알고 있는 일반상식을 벗어난 경우로서, 결정화가 되기 쉬운 성질을 가진 효소는 다른 단백질과의 혼재비율에 관계없이 결정화가 이루어진다는 점이다.

여하튼 대다수의 효소는 최적 조건에서 보존한다해도 정제과정 혹은 보존중에 실활되는 경우가 많은데, 이럴때는 적극적인 효소의 안정화방법이 강구되어야 한다. 즉 지금 까지 각 연구자들에 의하여 검토 보고된 각종 안정화제를 사용하여 목적효소를 안정화 시킬 수 없을 때는 지금까지 사용된적이 없는 비특이적인 안정화제를 찾아야만 된다.

#### IV. 유기용매에 의한 특정효소의 안정화

저농도의 유기용매인 acetone과 ethyl alcohol을 안정화제로 사용함으로써 목적효소를 처음으로 정제·결정화한



Fig. 1. Polyacrylamide gel electrophoresis of xanthine dehydrogenase

- A : The enzyme solution of Sephadex G-200  
B : The enzyme solution of first crystallization  
C : The enzyme solution of third crystallization

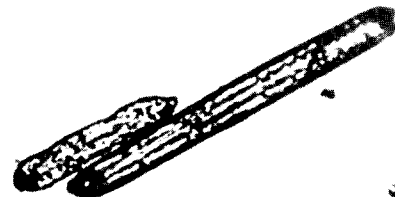


Fig. 2. Crystals of xanthine dehydrogenase

예가 있다.

1. Metapyrocatechase(Catechol 2,3-dioxygenase)

*Pseudomonas arvilla*가 생산하는 metapyrocatechase(6)는 catechol에 2원자의 산소를 첨가함으로써,  $\alpha$ -hydroxymuconic semialdehyde를 생성하는 반응을 촉매하는 산소 첨가 효소이다. 분자량은 140,000으로서, 35,000의 동일 subunit 4개로 구성되어 있으며, 각각 1원자의 철( $Fe^{2+}$ )을 포함하고 있다(7). 본 효소는 산소의 존재하에서 아주 불안정하여, pH 7.5, 4°C에서 24시간 이내에 80% 이상이 실활되는 효소로서, 이 실활은 SH시약등의 공존하에서도 전혀 보호될 수 없었으며, 혐기적인 보존에서는 부분적인 보호는 되었지만 특이적인 안정화제를 찾을 수가 없었다. 그러나 저농도의 유기용매의 공존하에서는 산소의 존재하에서도 본효소가 완전하게 보호된다는 것이 발견되어(Fig. 3), 10% acetone존재하에서 본효소를 정제하여 dioxygenase로서는 최초로 결정화에 성공하였다(Table 2).

## 2. Adenosine deaminase

*Pseudomonas iodinum*이 생산하는 adenosine deaminase (8)는 nucleoside인 adenosine을 탈아미노하여 inosine을 생성하는 adenosine aminohydrolase이다. 동물기원의 효소에 관해서는 많은 연구가 되어 있으나 미생물의 세포내 효소는 불안정하여 정제효소를 얻을 수가 없었다. *Pseudomonas iodinum*의 adenosine deaminase도 매우 불안정하여 정제가 불가능한 경우였지만, 안정제의 검토 결과, 저농도의 ethyl alcohol에 의해서 안정화되며 또한 완충액의 농도가 0.05M 이상일때 저온에서 완벽하게 안정화된다는 사실이 발견됨으로서 adenosine deaminase의 세포내 효소의 정제가 처음으로 가능하게 되었다(Fig. 4).

본 효소의 특징은 ethyl alcohol 이외의 alcohol류, acetone, 그 밖의 일반적인 효소 안정제에 의해서는 안정화가 되지않고, 15% ethyl alcohol을 포함한 완충액중에서만

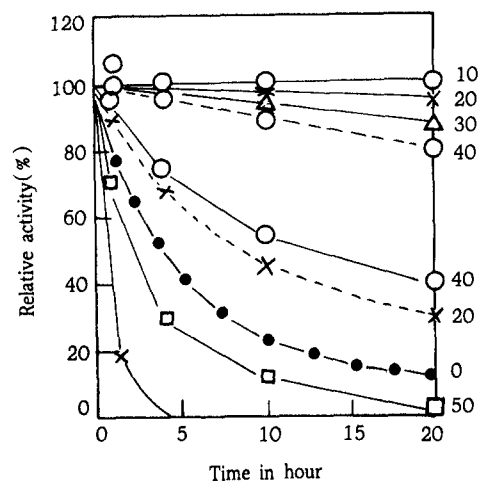


Fig. 3. Stability of metapyrocatechase in an organic solvent. The acetone fraction was stored at 30°C in 0.05M phosphate buffer, pH 7.5 containing different concentrations(as indicated in the figure in per cent) of an organic solvent. After 1, 4, 10 and 20 hours, activity was measured spectrophotometrically by the standard method. — • — without organic solvent ; — — — in acetone ; . . . . in ethanol

특이적으로 안정화되는 성질을 가진 효소이다. 미생물의 세포내 효소가 ethyl alcohol의 안정화에 의해서 처음으로 정제가 되었으며, 또한 정제효소액에 황산암모늄을 첨가함으로써 결정화에도 성공을 하였다(Table 3, Fig.5).

유기용매에 의한 효소단백질의 보고기작에 관해서는 아직까지 확실한 점은 밝혀지지 않고 있지만, 앞으로 확실한

Table 2. Purification of Metapyrocatechase

|                                      | Volumn<br>(ml) | Units  | Specific<br>activity | Yield<br>(%) |
|--------------------------------------|----------------|--------|----------------------|--------------|
| Crude extract                        | 530            | 26,700 | 4.0                  | 100.0        |
| Acetone fraction                     | 20             | 21,400 | 20.9                 | 81.0         |
| DEAE-cellulose chromatography        | 320            | 13,700 | 105.0                | 51.7         |
| 1st Crystallization                  | 5              | 6,000  | 110.0                | 22.4         |
| 2nd Crystallization                  | 3              | 5,300  | 114.0                | 19.8         |
| 3rd Crystallization                  | 3              | 4,000  | 116.0                | 15.0         |
| Supernatant from 3rd crystallization | 3              | 500    | 102.0                | 2.0          |

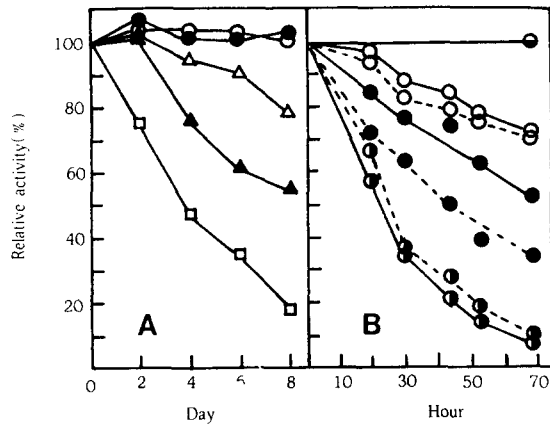


Fig. 4. Effects of ethyl alcohol and ionic strength on the stability of adenosine deaminase. (A) The purified enzyme was stored at 4°C in 0.05M Tris-HCl buffer, pH 7.0, containing different concentrations of ethyl alcohol: (○) 20%; (●) 15%; (△) 10%; (▲) 5%, (□) 0. (B) The purified enzyme was stored at 8°C in different concentrations of potassium phosphate: (---●---) 0.05M; (---○---) 0.02M; (---●---) 0.01M; (---●---) 0.001M, or Tris-HCl buffer, pH 7.0; (---●---) 0.05M; (---○---) 0.02M; (---○---) 0.01M; (---●---) 0.001M, containing 15% ethyl alcohol. After storage for indicated period, activities were measured.

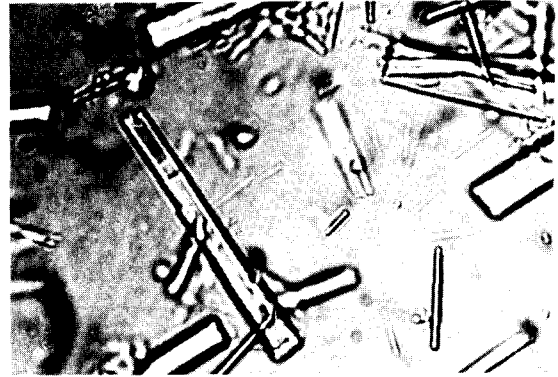


Fig. 5. Crystals of adenosine deaminase

해답이 나오리라고 믿는다. 필자의 연구경험을 토대로 하여 효소의 안정화와 정제에 관해서는 한마디로 요약해본다면, “다각적인 검토와 노력만이 문제를 해결해주는 열쇠가 될 뿐이며, 따로 왕도가 없다”고 말하고 싶다.

### 참 고 문 헌

1. Fincham, J. R. S., *Biochem. J.*, **65**, 721(1957)
2. Schatz, G., Penefsky, H. S. and Racker, E. J., *J. Biol. Chem.*, **242**, 2552(1967)
3. Abrams, A., *J. Biol. Chem.*, **240**, 3675(1965)
4. Sakai, T. and Jun, H. K., *J. Ferment. Technol.*, **56**, 251

Table 3. Purification scheme for adenosine deaminase

| Purification step      | Total protein (mg) | Total activity (units) | Specific activity (units/mg protein) | Relative purification | Yield (%) |
|------------------------|--------------------|------------------------|--------------------------------------|-----------------------|-----------|
| 1. Cell free extract   | 84,056             | 724,186                | 8.6                                  | 1                     | 100       |
| 2. Ammonium sulfate    | 32,000             | 694,847                | 21.7                                 | 2.5                   | 96        |
| 3. Ethanol fraction    | 3,700              | 566,145                | 153                                  | 17.8                  | 78        |
| 4. 1st DEAE-cellulose  | 518                | 456,826                | 882                                  | 102.6                 | 63        |
| 5. 2nd DEAE-cellulose  | 249                | 393,000                | 1,579                                | 183.6                 | 54        |
| 6. Sephadex G-200      | 168                | 336,000                | 2,000                                | 232.6                 | 46        |
| 7. DEAE-Sephadex A-50  | 46.2               | 286,154                | 6,194                                | 720.2                 | 40        |
| 8. 1st Sephacryl S-200 | 24.5               | 240,000                | 9,796                                | 1,139.0               | 33        |
| 9. 2nd Sephacryl S-200 | 14.5               | 236,153                | 16,286                               | 1,893.7               | 32        |
| 10. Hydroxyapatite     | 12.6               | 197,308                | 15,659                               | 1,820.8               | 27        |
| 11. Crystallization    | 9.5                | 148,390                | 15,620                               | 1,816.3               | 20        |

- (1978)
5. Sakai, T. and Jun, H. K., *Agr. Biol. Chem.*, **43**, 753 (1979)
6. Nozaki, M., Kagamiyama, H. and Hayaishi, O., *Biochem. Z.*, **338**, 582(1963)
7. Nozaki, M., *Topics in Current Chemistry*(Boschke, F. L. ed.), **78**, 145(1979)
8. Sakai, T. and Jun, H. K., *FEBS Lett.*, **86**, 174(1978)

### 생명과학 편집 원고 모집

생명과학의 편집계획과 관련된 원고들은 수시로 모집하오니, 회원동정에 관한 부분까지도 본 연구회 사무실로 보내주시기 바랍니다.

편집은 권두언, 총설, 최근연구동향, 세미나리포트, 학회참관기, 생명과학중계실, 생명과학에세이, 오류도 게시판, 자유 칼럼 순으로 계획되어 있으니 관련원고를 적극적으로 투고하여 주시면 보다 충실한 생명과학지로 성장할 수 있을 것으로 믿습니다.

또한 총설 및 미니리뷰의 경우에는 본지에 게재된 투고요령을 참고 하시기 바랍니다.