

IO₄-산화전분 변형에 의한 효소의 안정성 증가

안 용 근
충청대학 식품영양과

Stabilization of *Aspergillus* sp. α -Amylase by Modification with IO₄-oxidized Starch

Yong-Geun Ann

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

Abstract

The stabilization of *Aspergillus* sp. α -amylase was attained by modification with periodate-oxidized soluble starch. The pH stability of modified enzyme was increased at pH 3~4 and 9~11 in the presence of α -cyclodextrin(α -CD) compared with that of native enzyme. Thermal stability of the modified enzyme was increased. After treatment at 60°C for 30min, the activity remained 20% for the enzyme modified at pH 9.7 in the presence of α -CD and tested in the presence of α -CD, 10% for the enzyme modified at pH 9.7 in the presence of α -CD, 0% for the native enzyme. The native enzyme and modified enzyme showed one peak in HPLC. The substrate specificity of the modified enzyme was not changed in HPLC analysis of reaction product.

Key words : stabilization of *Aspergillus* sp. α -amylase, modification of *Aspergillus* sp. α -amylase, periodate-oxidized soluble starch.

서 론

당은 전세기 말부터 우수한 연구 결과가 얻어져 있으나 영양원 이외의 생물학적 의의를 발견하지 못하여 긴 역사 속에서 중심적 과제가 되지 못하였다. 그러나 근래 들어 당의 중요성이 발견되고 있다.

당단백질은 구조단백질, 운반체 단백질, 면역계 단백질 호르몬, 인터페론, 효소 등 생체의 주요 구성성분이다. 이것은 당단백질이 세포 사이, 분자 사이, 분자와 세포 사이의 인식마커와 정보전달자로서 여러 생명현상에 관여하여 생체 대사와 활성발현을 조절하기 때문으로, 이것은 당단백질이 점성과 용해성, 유화성, 방부 효과 및 항산화 효과 등 많은 기능성을 갖기 때문이다. 그래서 이들 기능성을 이용하여 당단백질을 방부제, 선도유지제, 신미각물질, 장내세균 제어제, 충치 예방제, 기능성 단백질, 바이오리액터, 분리정제용 재료, 인공장기 재료, 바이오센서, 화장품 재

료, 진단약 등으로 사용하려는 시도가 계속되고 있다.

이를 위해 여러 분야에서 인공적으로 당단백질을 조제하기 위해 노력하고 있다. 이를 탄수화물공학이라 하며, 유전자공학과 단백질공학에 이어 제3의 바이오테크놀러지로 주목받고 있다.¹⁻⁴⁾

그래서 본 연구자는 싼 재료를 사용하여 쉽고, 간단한 방법으로 무해하고 유용한 기능성 당단백질을 조제하고자 NaIO₄-산화 전분 및 말토올리고당을 단백질과 반응시켜 당단백질을 만드는 방법을 개발하였다.^{5,6)} 분자 표면에 리신의 ϵ -NH₂기가 존재하는 효소와 단백질은 이 방법으로 모두 당단백질로 조제할 수 있으며, 본 연구자는 이 방법으로 고구마 β -아밀라아제에 산화당을 부가하여 고구마 β -아밀라아제의 서브유닛 구조와 기능을 해석한 바 있고, 여러 아밀라아제의 안정성을 증가시키는 결과를 확인한 바 있다.⁷⁻¹¹⁾

본 연구는 *Aspergillus* sp.의 α -amylase에 이 방법

Corresponding author : Yong-Geun Ann

을 적용시켜서 인공당단백질로 만들어서 안정성이 증가되고, β -아밀라아제의 경쟁적 저해제인 α -cyclodextrin(α -CD)이 α -아밀라아제에 대하여서도 안정제 역할을 한다는 것을 확인한 결과이다.

재료 및 방법

1. 재 료

태평양화학의 복합효소 5,000(*Aspergillus* sp. α -amylase)을 제공받아 사용하였다. 활성은 α -amylase 150,000unit/g, β -amylase 5,000unit/g, protease 1,000unit/g로 최적 pH는 5.0, 최적 온도 55°C이다. 사용시는 750unit/ml로 희석하여 모액으로 사용하였다. 시약은 일급 및 특급을 사용하였다. 가용성 전분은 일본 國産化學 제품을 사용하였다.

2. 총당 정량

Phenol-H₂SO₄법¹²⁾을 사용하였다. 즉, 당시료 1ml에 5% 페놀 1ml를 가하고 황산 5ml를 가하여 발색시킨 다음 490nm에서 글루코오스를 표준물질로 비색정량하였다.

3. 환원당 정량

Somogy-Nelson법¹³⁾을 사용하였다. 즉, 시료액 0.4ml에 Somogyi-Nelson 시약 A용액 1ml를 가하여 100°C에서 10분간 가열한 다음 B용액 1ml를 가하여 나머지를 물로 채워 25ml로 하였다. 이 반응액을 분광광도계를 사용하여 500nm에서 글루코오스를 표준으로 비색정량하였다.

4. α -아밀라아제 활성 측정

전보의 방법⁷⁻¹¹⁾에 따랐다. 0.1M 아세트산 완충액(pH 4.8) 중에서 끓여 녹인 0.2% 가용성 전분 0.2ml와 효소액 0.2ml를 37°C에서 10분간 반응시킨 다음 Somogyi-Nelson A 시약 1ml를 가하여 반응을 중지시키고, 100°C에서 10분간 가열하였다. 식힌 다음 Somogyi-Nelson B시약 1ml를 가하고 증류수로 채워 25ml로 하여 분광광도계로 말토오스를 표준으로 500nm에서 비색정량하였다. 1 Unit는 1분간에 말토오스 1 μ mol을 유리하는 효소량으로 하였다.

5. NaIO₄에 의한 가용성 전분의 산화

가용성 전분 2g을 100ml의 0.2M NaIO₄ 용액에 현탁하여 4°C에서 40분간 교반하여 반응시킨 다음 ethyleneglycol 10ml를 가해 미반응의 NaIO₄를 소

모 제거시켰다. 다음, 증류수에 투석하여 동결건조하였다.

6. pH 8.0에서의 당 부가 및 당부가 효소의 열안정성

pH 8.0의 0.5M Tris-HCl 완충액에 효소 0.2ml와 pH 9.7의 0.1M 붕산완충액 2.5ml에 산화전분 30mg을 녹인 용액 0.2ml를 37°C에서 10분간 반응시켜서 사용직전에 조제한 1M NaBH₄-HCl 용액(pH 7.5) 0.4ml를 가한 후 0.1M 아세트산 완충액(pH 5.5) 7.2ml를 가해 60°C에서 열처리하여 잔존활성을 측정하였다.

7. pH 9.7에서의 당부가 및 당부가효소의 열안정성
증류수에 녹인 상기 효소 0.2ml와 pH 9.7의 0.1M 붕산완충액 2.5ml에 산화전분 30mg을 녹인 용액 0.2ml를 37°C에서 10분간 반응시킨 것 외에는 상기와 동일하다.

8. α -CD 존재하에 pH 9.7에서 당부가지킨 효소의 열안정성

α -CD 4%를 함유한 증류수 중의 효소액을 사용한 것 외에는 상기 7과 동일하다.

9. α -CD 존재하에 pH 9.7에서 당부가지킨 효소의 α -Cyclodextrin 존재하의 열안정성

당부가 용액과 반응 후 열처리용 희석 효소액에 2% α -CD를 함유한 외에는 상기 7과 동일하다.

10. 열안정성 측정

상기 6과 같이 40배 희석한 효소액을 60°C에서 0분, 5분, 10분, 20분, 30분 간격으로 0.2ml씩 취해 0.1M 아세트산완충액(pH 5.5) 9.8ml에 가하여 최종적으로 2,000배 희석하고 그중 0.5 ml를 기질(2% 가용성 전분 / 0.1M 아세트산완충액, pH 5.5) 0.5ml에 가해 37°C에서 10분간 반응시켜서 Somogyi-Nelson법으로 비색정량하여 잔존활성을 측정하였다.

11. pH 안정성 측정

효소액 50 μ l를 pH 2에서 pH 12까지의 0.1M Britton-Robinson의 광역완충액 0.95ml에 가하여 37°C에서 2시간 항온한 후 0.1M 아세트산완충액으로 100배 희석하여 그중 0.5ml를 기질(2% 가용성 전분 / 0.1M 아세트산 완충액, pH 5.5) 0.5 ml에 가하여 10분간 반응시킨 다음 Somogyi-Nelson법으로

비색정량하여 잔존활성을 측정하였다.

12. 효소의 HPLC

HPLC 펌프는 Shimadzu LC-6A, 적산기는 Shimadzu Chromatopak G-R3A, 검출기는 UV 검출기로 280nm에서 검출하고, 컬럼은 SynChropak GPC 100 (1×30cm)을 사용하여 유속 0.5ml/min에서 0.2M NaCl을 함유한 0.1M K-인산 완충액으로 0.7ml/min으로 유출시켰다.

13. 당의 HPLC

HPLC 펌프는 Shimadzu LC-6A, 적산기는 Shimadzu Chromatopak G-R3A, 검출기는 굴절을 검출기 Knauer 98.00, 컬럼은 Superose 12 (1×30cm), 컬럼오븐은 Shimadzu CTO-6A를 사용하여 유속 1ml/min, 60℃에서 증류수를 용매로 분석하였다.

결 과

1. 비활성

Aspergillus sp.의 α -아밀라아제(복합효소 5000)를 pH 8.0에서 변형시키면 잔존활성이 87%, pH 9.7에서 변형시키면 80% 남았다. 알칼리에 약하기 때문이다.

2. 열안정성

60℃에서 10분간 경과하였을 때의 안정성은 α -CD 존재하 pH 9.7에서 변형한 효소에 α -CD를 가하여 열안정성을 측정한 것 > α -CD 존재하에서의 비변형 효소 >pH 9.7에서 변형한 효소 > α -CD 존재하 pH 9.7에서 변형한 효소 >pH 8.0에서 변형한 효소 >비변형효소의 순으로 높았다. 20분 후에는 α -CD 존재하, pH 9.7에서 변형한 효소에 α -CD를 가한 것이 가장 높은 잔존활성을 나타냈다. 그후 α -CD 존재하 pH 9.7에서 변형한 효소의 잔존활성이 높았다. (Fig. 1)

3. pH 안정성

pH 8.0 또는 9.0에서 변형한 효소의 pH 안정성은 Fig. 2와 같이 α -CD 존재 하에서의 비변형 효소가 가장 낮았다. pH 9.7에서 변형한 효소는 비변형효소에 비해 별 차이가 없었으나 변형효소는 pH 3~4와 9~11에서 안정성이 증가하였다. α -CD 존재 하에 변형시킨 다음 α -CD 존재 하에 pH 안정성을 측정한

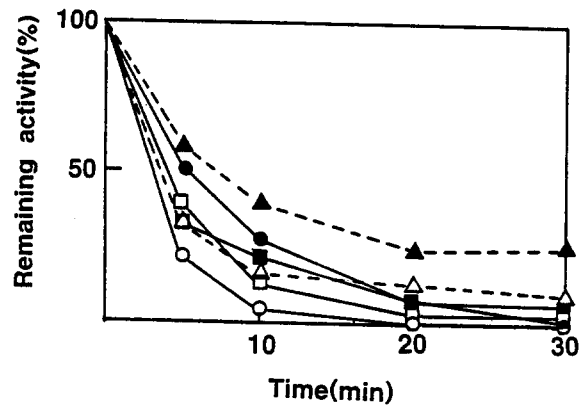


Fig. 1. Thermal stability of *Aspergillus* sp. α -amylase modified with IO₄-oxidized soluble starch. The enzyme (300unit) was reacted with 2.4mg of oxidized soluble starch in 0.4ml of 0.25M Tris-HCl buffer (pH 8.0) or Britton-Robinson buffer (pH 9.7) at 37℃ for 10min and diluted with 0.1M acetate buffer (pH 5.5) to 10 folds. Then, 200 μ l of the mixture was incubated at 60℃ for each time and diluted with 0.1M acetate buffer (pH 5.5) and its activity was assayed. The native enzyme was treated in the same conditions in the absence of oxidized soluble starch. ○, native enzyme ; ●, native enzyme in the presence of α -CD ; △, enzyme modified at pH 9.7 in the presence of α -CD ; ▲, enzyme modified at pH 9.7 in the presence of α -CD, and thermal stability was analyzed in the presence of α -CD; □, enzyme modified at pH 8.0; ■, enzyme modified at pH 9.7.

효소의 안정성은 알칼리, 산성 쪽 모두 매우 증가하였다. 그러나, pH 6과 7에서는 다른 효소보다 감소하였다. (Fig. 2)

4. 효소의 HPLC

겔크로마토그래피 컬럼인 SynChropak GPC 100을 사용하여 변형 전후의 효소의 순도와 분자량의 증감을 HPLC 분석한 결과는 Fig. 3과 같이 단일 피크로 나타나 순수한 것으로 나타났다. 뒤에 나타나는 피크는 비단백질성 피크이다. 2와 3의 S는 산화가용성 전분의 피크이다.

유출시간은 pH 9.7에서 변형한 효소는 16.264분 >pH 8.0에서 변형한 효소는 16.521분 >비변형효소는 16.666분의 순서를 나타내어 pH 9.7에서 변형하는 경우 효소에 당이 가장 많이 부가되어 분자량이 가장 커지고, 다음 pH 8.0에서 변형한 효소의 분자량이 커져서 그 순서대로 유출속도가 빨라진 것으로 나타

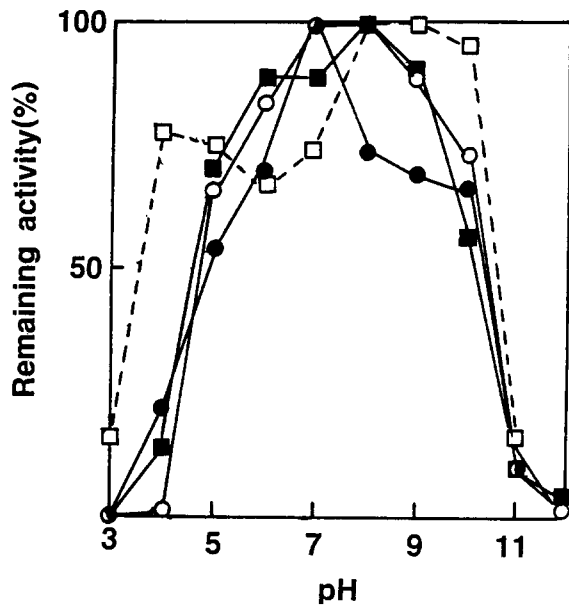


Fig. 2. pH stability of *Aspergillus* sp. α -amylase modified with IO_4 -oxidized soluble starch. The modification conditions was same as Fig 1. Modified enzyme(50 μ l) was added in 0.1M Britton-Robinson buffer(each pH) and incubated at 37 $^\circ$ C for 2hour and diluted 100 folds with 0.1M acetate buffer(pH 5.5) and remaining activity assayed. ○, native enzyme; ●, native enzyme in the presence of α -CD; □, enzyme modified at pH 9.7 in the presence of α -CD, and pH stability was analyzed in the presence of α -CD; ■, enzyme modified at pH 9.7.

났다.

5. 반응 산물의 FPLC

변형효소와 비변형효소의 기질 특이성의 변화를 알아보기 위하여 Superose 12 컬럼으로 반응산물을 분석하였으나 Fig. 1과 2와 같이 큰 차이점은 나타나지 않았으나 변형한 경우 글루코오스가 약간 더 생산되고 있다. 그러나 반응 시간의 차이에서 나타나는 결과인지 확인할 필요가 있다(Fig. 4).

고 찰

당단백질에서 당부분을 제거하면 안정성이 떨어지는 경우가 많다. 이것은 거꾸로 안정성이 약한 단백질에 당을 입히면 안정성이 증가할 수 있다는 것을 의미한다. 그래서 본연구자는 인공적으로 당단백질을 만드는 방법을 개발하여 효소의 안정성이 증가한다는

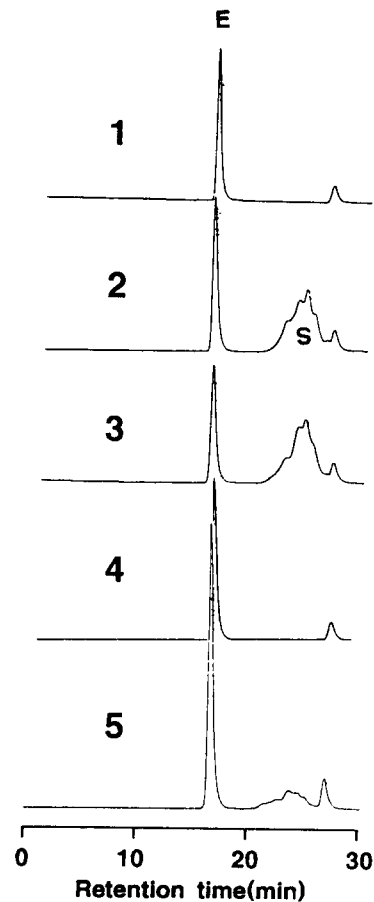


Fig. 3. HPLC patterns of *Aspergillus* sp. α -amylase modified with IO_4 -oxidized soluble starch. The enzyme (18mg/ml) reacted with oxidized soluble starch (6mg/ml) in 0.1M Tris-HCl buffer (pH 8.0) or 0.1M borate buffer (pH 9.7) at 37 $^\circ$ C for 10min. 1, native enzyme; 2, modified enzyme in 0.1M borate buffer (pH 9.7); 3, modified enzyme in 2% α -CD and 0.1M borate buffer (pH 9.7); 4, modified enzyme in Tris-HCl buffer (pH 8.0); 5, native enzyme in 0.1M borate buffer (pH 9.7); E, enzyme; S, oxidized soluble starch; column, SynChropak GPC 100 (1 \times 30cm); elute, 0.1M K-phosphate buffer (pH 6.8) containing 0.2M NaCl; elute, distilled water; flow rate, 0.7ml/min; detect, 280nm.

사실을 밝혔다.^{14,15)}

당단백질을 얻는 방법은 천연 당단백질을 분리하는 방법, 효소를 이용하여 합성하는 방법, 화학적으로 결합시키는 방법, 물리적으로 결합시키는 방법 등이 있다.

그러나, 천연 당단백질을 분리 조제한다는 것은 정

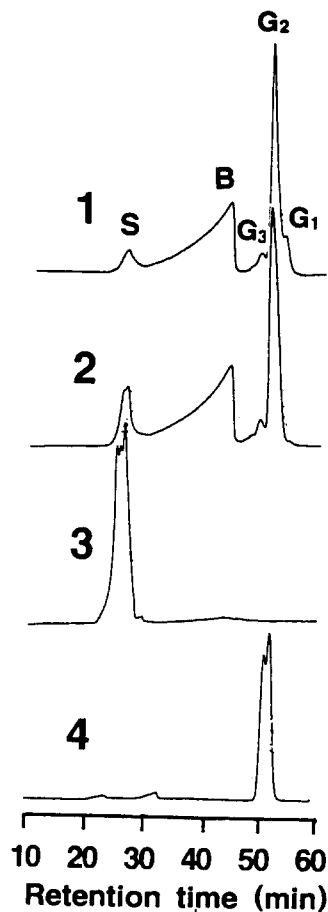


Fig. 4. FPLC patterns of reaction products of soluble starch by *Aspergillus* sp. α -amylase modified with IO₄- oxidized soluble starch. Reaction mixture contained 0.5mg of the enzyme and 1% soluble starch in 1ml 0.1M acetate buffer (pH 5.5). The reaction mixture was incubated at 37°C for 10min. 1, products by native enzyme ; 2, products by modified enzyme ; 3, soluble starch ; 4, markers ; S, soluble starch ; B, buffer ; G3, maltotriose ; G2, maltose ; G1, glucose ; elute, distilled water ; flow rate, 0.5ml/min ; detector, RI ; column, Superose 12 (1×30cm).

제기술과 경비 때문에 한계에 부딪치고, 효소에 의한 합성은 해당 효소나 기질을 생산, 정제하기가 어려워 구입할 수 없거나, 물리적 방법은 결합이 불안정한 경우가 많다. 화학적 방법은 식품에 허용된 첨가물질이 아니면 사용할 수 없고, 반응으로 단백질이 변성되는 등 여러 가지 제약이 많다.

그러나 본 방법은 싸고, 안정한 식품인 전분을 재료로 사용하며, 산화와 당단백질 조제 방법이 간단하

여 중성 pH, 상온에서 10분 정도의 반응으로 당단백질을 만들 수 있고, 단백질 변성이 일어나지 않으므로, 효소와 단백질의 안정성, 점성, 유화성, 용해성, 방부성 등을 향상시키기 위한 당단백질 조제에 매우 효과적이다.

다른 화학 물질에 의한 변형은 독성 때문에 또, 반응이 복잡하여 식품산업이나 의약품 산업에 사용하기 힘들지만 염가이며, 식품인 당을 상온에서 단시간에 간단히 부가시킬 수 있기 때문에 본 방법은 식품산업과 의약품산업에 폭넓게 사용할 수 있다.

본 방법은 단백질 분자 표면의 리신의 ϵ -NH₂기와 산화당의 CHO기와의 Schiff염기 형성에 의하고 있으므로 이를 이용하여 염가인 전분 등의 당류와, 유기 자원 중 가장 막대하며 저렴한 cellulose를 산화시켜 간단한 직접반응으로 효소 및 미생물을 고정화시킬 수 있다.

나아가 본 연구를 통해 β -아밀라아제의 경쟁적 저해제인 α -cyclodextrin이 역시 α -아밀라아제에 대해서도 안정성을 증가시킨다는 사실을 확인하였다.

요 약

과요오드산-산화전분으로 *Aspergillus* sp. α -amylase를 변형시켜서 인공당단백질을 만들었다. pH 8.0에서 변형한 효소는 비변형효소의 87%, pH 9.7에서 변형한 효소는 80%의 활성이 남았다. 60°C에서의 열 안정성은 α -cyclodextrin (α -CD) 존재 하에 변형하고 α -CD 존재 하에 분석한 효소가 가장 높았다. pH 안정성은 변형시켜서 α -CD 존재하에 분석한 효소가 가장 높아서 pH 3~4와 9~11에서 안정성이 매우 증가하였다. HPLC 분석 결과 변형효소와 비변형효소 모두 단일 피크로 나타났고, 변형시킨 것은 당결합으로 분자량이 커져서 유출시간이 빨라졌다. 반응산물 분석 결과 기질 특이성의 변화는 나타나지 않았다.

감사의 말

본 연구는 충청대학 교내연구비로 수행되었다.

참고문헌

1. 楠本正一 : インタビュー, 바이오インダストリ, 3, 2~4(1991).
2. N. シャロン著/大澤利昭譯 : 糖蛋白質. 複合糖質. 學會出版センター, p.19~27(1986).
3. N. シャロン著/大澤利昭譯 : 糖の機能, 複合糖質, 學

- 會出版センター, p.109~130 (1986).
4. 近畿バイオインダストリ振興會議：通産省は次世代で(複合糖質生産利用技術)の開発. バイオインダストリ, 3, 5~6 (1991).
 5. 안용근 : 과요오드산 산화당에 의한 인공 당단백질의 조제, *한국식품과학회지*, 31, 62~67 (1999).
 6. 안용근 : 과요오드산 산화당에 의한 인공 당단백질의 조제 메카니즘, *한국식품과학회지*, 31, 482~487(1999).
 7. 安龍根 : 甘薯 β -アミラーゼに関する研究. 大阪市立大學博士學位論文(1989).
 8. Ann, Y.G., Iizuka, M., Yamamoto, T. and Minamiura, N. : Evidence for existence of an active monomer of sweet potato β -amylase, *Agric. Biol. Chem.*, 53, 3109~3110(1989).
 9. Ann, Y.G., Iizuka, M., Yamamoto, T. and Minamiura, N. : Preparation and some properties of active monomer of sweet potato β -amylase, *Agric. Biol. Chem.*, 54, 769~774(1990).
 10. Ann, Y.G., Iizuka, M., Yamamoto, T. and Minamiura, N. : Active monomer of sweet potato β -amylase: Stabilization and an improved preparation method using α -cyclodextrin, *J. Ferment. Bioeng.*, 70, 75~79(1990).
 11. Minamiura, N., Ann, Y.G., Iizuka, M., Ito, K. and Yamamoto, T. : Preparation of an active monomer from sweet potato tetrameric β -amylase in the presence of α -cyclodextrin, *Denpun Kakaku*, 38, 153~157(1991).
 12. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. : Coloric metric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.*, 28, 350~356(1956).
 13. Nelson N. : A photometric adaption of the Somogyi method for the determination of glucose, *J. Biol. Chem.*, 153, 375~380(1944).
 14. 安龍根, 南浦能至 : IO_4^- 산화전분 변형 β -아밀라아제의 안정성 및 α -cyclodextrin의 영향, *한국식품영양학회지*, 11, 159~164(1998).
 15. Ann, Y.G., Anindyawati, T., Ito, K., Iizuka M. and Minamiura N. : Stabilization of amylolytic enzymes by modification with periodate-oxidized soluble starch, *한국식품영양학회지*, 11, 561~564 (1998).

(1999년 5월 26일 접수)