Journal of the Korean Chemical Society
1999, *Vol. 43, No. 2*
Printed in the Republic of Korea

단 신

카탈라제에 의한 프로파질알콜의 산화반응

郭眞榮 · 朴忠雄 · 李康民*
전북대학교 자연과학대학 분자생물학과, 기초과학연구소
(1998. 10. 30 접수)

Oxidation of Propagyl Alcohol by Catalase

Gwak Jin-Young, Park Chung-Ung, and Lee Kang-Min*
Department of Mol. Biology, University of Chonbuk, Chonju, 560-756, Korea
(Received October 30, 1998)

효소는 살아 있는 세포에서 모든 반응을 특이적으로 촉매하는 생촉매제이다. 효소는 여러가지 특이성(자리, 입체, 기질특이성)을 가지고 있으므로 의약품 합성, 식품제조 등 여러분야에 사용되고 있다. 효소반응은 기존의 화학반응에 비하여 특이성이 매우 크지만 반응조건에서 안정하지 못하기 때문에 사용이 제한되어 왔다. 그러나 최근에 생촉매제인 효소는 반응조건에 따라서 효소의 구조와 기능이 변해서 새로운 반응을 유도할 수 있음이 입증되었다.[1] 효소의 반응은 압력, 온도, 반응매질 및 산도의 변화와 밀접히 관련되어 있다. 효소반응에서 온도, 산도 및 압력의 변화는 반응의 속도에 영향을 줄 수 있다.[2-4] 무엇보다도 압력은 효소의 반응속도에 크게 영향을 줄 수 있다. 인버타제의 경우 반응속도는 압력이 1에서 100 atm으로 증가하면 10배이상 증가하며 2 katm으로 증가하면 100배 증가한다는 사실이 알려져 있다.[5] 그러므로 본 연구에서는 카탈라제에 의하여 촉매되는 프로파질 알콜의 산화반응에 미치는 압력, 온도, 산도의 영향을 연구하였다.

본 연구에 사용된 카탈라제(EC 1.11.1.6)는 약 250 Kd의 헴을 가지고 있는 효소로 일반적으로 호기성 생물에 존재한다.[6] 산소는 이들 호기성 생물에 중요한 인자이지만 때로는 이들 산소가 생체분자를 산화, 환원시킬 수 있는 초과산화물이나 과산화수소 또는 수산 라디칼 등으로 활성화되어 생체에 치명적인 손상을 입힌다. 카탈라제는 두 가지 기능을 가지고 있다. 과산화수소를 물과 산소로 분해하는 반응과 메탄올, 에탄올과 같은 알콜을 산화하는 과산화반응이다. 과산화 반응은 특이적으로 물질을 합성하는데 이용될 수 있다.

본 연구에서 카탈라제의 효소활성도는 분광광도계와 가스 크로마토그래프로 결정하였으며 고압효소반응 장치는 *Fig.* 1과 같이 직접 조립하여 사용하였다(*Fig.* 1). 가스 크로마토그래프에서 생성물인 프로파르질 알데히드를 확인하기 위하여 알콜로부터 화학적으로 합성한 후 분리하여 확인하였다. 본 실험조건에서 알콜은 5.3분, 알데히드는 2.8분에서 검출되었다. *Fig.* 2에서 보는 것처럼 최적 산도는 과산화수소 분해 활성도는 산도 7 부근에서 나타난 반면, 과산화 활성도는 산도 8 부근에서 나타났다(*Fig.* 2). 과산화 활성도는 과산화수소 분해활성도보다 산도가 1정도 알카리 방향으로 이동하였다. 카탈라제의 위의 두 가지 반응은 다른 기작[7]으로 반응하므로 최적산도는 다를 수 있다.

지난 수년전 부터 효소반응에 미치는 압력의 효과를 연구하려는 관심이 증가되고 있다. 고압을 사용하여 식품을 멸균할 수 있으며,[8] 반응조에서 미생물 배양를 통하여 의약품을 생산하는데 고압배양기술이[9] 사용되고 있다. 효소 반응에서 압력의 감소는 반응의 속도에 영향을 줄 수 있다. 카탈라아제의 산화반응에 미치는 압력의 효과를 살펴 보았다. 압력을 상압에서 12000 psi까지 변화 시키면서 활성도를 보았다. 효소반응의 생성물인 프로파르질 알데히드는 6000 psi에서 가장 많이 만들어졌으며, 생성율은 상

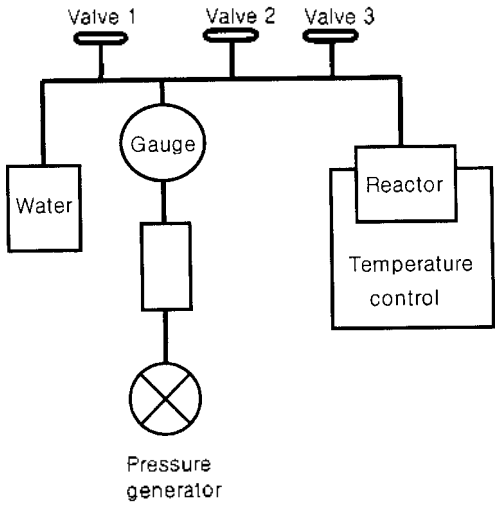

Fig. 1. Scheme of high pressure bioreactor.

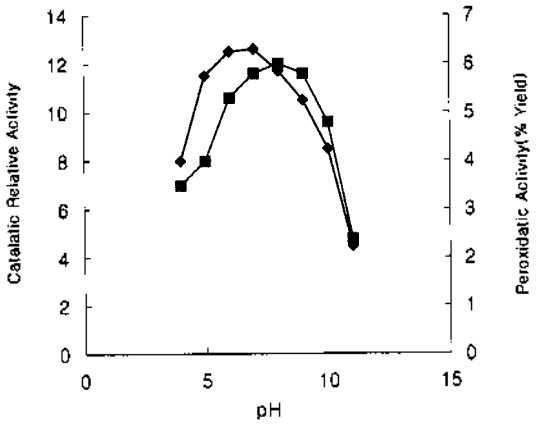

Fig. 2. The pH effect on catalatic activuty (◆) and peroxidation activity (■) of catalase. pH buffers used are citric acid-Na_2HPO_4(pH 4, 5, 6, 7), Tris-HCl(pH 7, 8, 9), Glycine-NaOH (pH 9, 10, 11).

압에서보다 3.7배 증가 하였다(*Fig.* 3). 그러나 압력이 6000 psi 이상으로 증가하면 생성율은 오히려 감소하였다. 그 이유는 압력이 지나치게 증가하면 효소의 구조가 변성되어 비활성화 될 수 있기 때문이다. 이러한 현상은 다른 효소반응에서도 비슷하게 나타났다. 예를 들면 부틸코린 에스터라제는 압력이 증가함에 따라 그의 활성도는 증가하지만 어느 압력 이상이되면 활성도는 오히려 감소하였다.[10] 또한 베타 갈락토시다제도 200 MPa까지는 압력이 증가할수록 효소활성도가 증가하다가 그 이상의 압력에서는 감소하였다. 압력이 증가함에 따라 활성도가 증

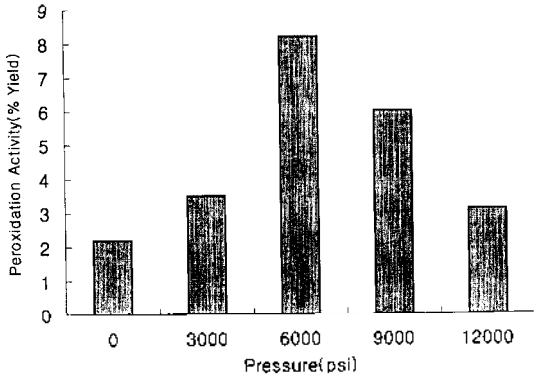

Fig. 3. Influence of pressure on oxidation of propargyl alcohol by catalase.

가하는 이유는 이 효소와 기질의 상호작용이 증가하기 때문이라고 발표되었다.[11] 어느압력이상의 고압에서 압력에 의한 '효소의 비활성화는 가역적인가?' 라는 질문이 생긴다. 고압에서 효소의 비활성화는 가역적일 수 있다. 엑소뉴클레아제의 활성도는 고압에서 가역적으로 억제됨이 발표되었다.[12] 이 효소는 압력이 67 Mpa에서는 13% 비활성화되고 336 Mpa에서는 99%이상 비활성화 되었다. 그러나 거의 비활성화된 압력인 336 Mpa에서 다시 67 Mpa로 압력을 낮추면 효소 활성도는 다시 회복되었다. 고압에서 효소가 비활성화 되는 이유는 고압이 되면 효소의 서브유니트가 해리되거나 침전되거나, 그의 3차구조가 변화되기 때문일 수 있다.[13]

카탈라제의 활성도에 미치는 온도의 영향을 보았다. 상압에서 효소는 *Fig.* 4에서 보는 바와 같이 25에서 가장 큰 활성도를 갖었다. 효소 활성도는 25에서 10에 비하여 3배로 증가 하였다. 그러나 온도를 25 이상 증가시키면 효소는 오히려 비활성화되어 생성율은 감소되었다. 고압에서 효소 활성도에 미치는 온도의 효과를 살펴보았다. 압력 3000 psi에서 효소의 활성도는 상압에서와 마찬가지 현상을 보였다. 높은 압력에서도 상압에서와 마찬가지로 25에서 가장 큰 활성도를 갖으며 그 이상의 온도에서 카탈라제의 활성도는 감소하였다. 그러나 압력 3000 psi에서 효소활성도는 상압에서 보다 많이 증가하였다(*Fig.* 4). 고압에서 온도의 변화에 따른 효소 활성도의 변화는 온도에 크게 관계되지 않는것 처럼 보인다. 아밀라제 A의 경우 효소의 가수분해속도는 압력이 2 kbar까지 압력이 증가함에 따라 활성도는 비례

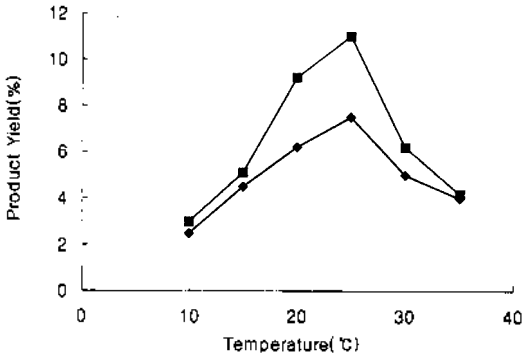

Fig. 4. Influence of temperature on oxidation of propargyl alcohol by catalase at high pressure. 3000 psi (■), no pressure (◆).

적으로 증가한다고 알려져 있다. 이 효소는 높은 압력에서 온도의 증가에 따른 가수분해속도는 압력에 관계없이 어느 정도 증가하지만 어느 온도 이상이되면 열에 의한 비활성화 때문에 가수분해속도가 오히려 감소하였다.[14] 이와같이 효소반응에서 압력의 감소는 반응의 속도에 많은 영향을 주었다. 어느 압력하에서 효소의 반응을 이론적으로 직접 설명하는데는 한계가 있다. 그 이유중 하나는 효소가 반응하는 동안 효소반응과 함께 압력의 변화를 동시에 측정할 수 없기 때문이다. 압력의 변화에 따른 부피의 증가는 효소 자체의 활성자리의 기질결합, 전이상태의 안정화, 효소의 구조의 변화, 효소와 반응매질과의 상호작용을 변화 시킬 수 있으므로 효소의 반응속도에 크게 영향을 줄 수 있다.[15] 최근에 효소와 압력의 관계는 연구되기 시작하고 있으나 아직 초보단계이며 더욱 체계적인 이론적 연구가 필요하다.

실 험

시약 및 기기. 소 간에서 분리한 카탈라제효소(EC 1.11.1.6)와 프로파르질 알콜은 Sigma(St. Louis, USA)로부터 구입하였다. 그 외에 과산화수소(30% 수용액) 및 유기용매는 HPLC용 고순도를 사용하였다. 카탈라제활성도는 분광광도계(Varian, Cary-3E)와 가스 크로마토그래프(Hitachi, G-3000)로 결정하였다. 가스 크로마토그라피는 AT-WAX가 충전된 30 m×0.25 μm 미세칼럼을(Alltech) 장착해서 사용하였다. 칼럼 압력과 유속은 각각 0.6 kgf/cm^2, 0.525 ml/min이었다. 고압 효소반응 장치는 Hip(Boston, USA)회사 부품을 구입하여 *Fig.* 1과 같이 직접 조립하였다. 압력은 수동 압력 발생기를 사용하였고 2 ml 반응용기에서 반응시켰다. 효소의 반응은 항온조로 온도를 조절하여 실험하였다.

카탈라제 활성도 결정. 카탈라제의 활성도는 240 nm에서 흡광도 감소로부터 측정되었다. 완충용액에서(50 mM인 완충용액, pH 7.0) 5 mM에서 100 mM까지의 다양한 농도의 과산화수소와 효소를 넣고 25 °C로 고정된 분광광도계를 사용하여 240 nm에서의 흡광도 감소를 2분동안 측정하였다.

과산화 활성도 결정. 카탈라제에의한 과산화 활성도를 보기 위해 기질물질로 사용한 프로파르질 알콜과 생성물인 프로파르질 알데히드를 GC로 분리하여 결정하였다. 50 mM pH 7.0인 완충용액에 카탈라제 5 mg을 완전히 녹인 후 50 mM 프로파르질 알콜, 20 mM 과산화수소를 넣어 충분히 섞어준 후 이를 25 °C에서 5시간정도 반응시킨후 효소를 제거하기 위해서 여과기로 6000 rpm에서 2시간 원심분리하고 여과하여 GC로 분리하였다. GC 조건은 오븐온도 110 °C, 주입기온도 250 °C, 검출기온도 270 °C였다.

프로파르질 알데히드 화학적 합성 방법. GC 분석에서 생성물을 확인하기 위하여 산화크롬을 사용하여 프로파르질 알데히드를 알콜로부터 제조하여 이용하였다. 산화반응을 위하여 0.17 M 프로파르질 알콜/28 M 황산과 2.1×10^{-2} M 산화크롬/28 M 황산을 섞어 반응시켰다. 반응이 완전히 끝난 후 생성된 프로파르질 알데히드를 물로부터 분리하기위해 에테르로 추출하여 GC-Mass로 분석하였다.

카탈라제 효소의 활성도에 미치는 산도의 영향. 카탈라제의 촉매활성도에 대한 최적 산도의 영향을 결정하기 위하여 10 mM 과산화수소를 포함한 50 mM인 완충용액에서 활성도를 비교하였다. 이때 사용한 pH 완충용액는 citric acid-Na_2HPO_4 완충용액(산도 4,5,6,7), Tris-HCl 완충용액(산도 7,8,9), Glycine-NaOH 완충용액을(산도 9,10,11) 사용하였다.

프로파르질 알콜의 산화 반응에 미치는 산도의 영향. 프로파르질 알콜의 산화반응에 의한 생성물인 프로파르질 알데히드 생성율을 산도 변화에 따라 조사하였다. 각각의 pH에서 50 mM인 완충용액에 카탈라제 30 mg을 넣고 완전히 녹인후 50 mM 과산화수소, 50 mM 프로파르질 알콜을 넣어 충분히 섞은

후 25 °C에 5시간 이상 반응한 후 6000 rpm에서 원심 분리하고 이를 다시 여과한 후 동일한 GC 조건으로 분석하였다.

프로파르질 알콜의 산화 반응에 미치는 압력의 영향. 프로파르질 알데히드 생성율을 압력의 변화에 따라 조사하였다. 각각의 압력에서 50 mM인 완충용액(산도 7.0)에 카탈라제 5 mg을 넣고 완전히 녹인 후 20 mM 과산화수소, 10 mM 프로파르질 알콜을 차례로 넣어 충분히 섞은 후 3000 psi, 6000 psi, 9000 psi, 12000 psi에서 2시간 반응시킨 후 여과기를 이용해서 6000 rpm에서 원심분리하고 이를 다시 여과한 후 동일한 GC 조건으로 분석하였다.

높은 압력하에서 프로파르질 알콜의 산화 반응에 미치는 온도의 영향. 압력을 3000 psi로 유지한 조건에서 프로파르질 알콜로 부터 프로파르질 알데히드 생성에 미치는 온도의 영향을 조사하였다. 50 mM인 완충용액(산도 7.0)에 카탈라제 5 mg을 넣고 완전히 녹인 후 20 mM 과산화수소, 10 mM 프로파르질알콜을 넣어 충분히 섞은후 10~30 °C에서 2시간 반응시킨 후 여과기를 이용해서 원심분리하고 이를 다시 여과한 후 동일한 GC 조건으로 분석한다.

이 연구는 교육부 기초과학육성연구비(BSRI-4429)의 지원으로 이루어졌으며 이에 사의를 표합니다.

인 용 문 헌

1. Yu, K.; Dordick, J. S. *Biochemistry* **1992**, *31*, 2588.
2. Fukuda, M.; Kungi, S. *Eur. J. Biochem.* **1984**, *142*, 565.
3. Masson, P.; Balny C., *Bioim. Biophys. Acta* **1988**, *954*, 208.
4. Morild, E. *Adv. Prot. Chem.* **1981**, *34*, 91.
5. Makimoto,S.; Nishida, H.; Tanighuchi, Y. *Biochem. Biophys. Acta* **1989**, *996*, 233.
6. Lente, F. V.; Pepoy, M. *Clinical Chemistry* **1990**, *36*, 1339.
7. Schonbaum, G.R.; Chance, B.R. in *The Enzymes* (3rd edition) P.D. Boyer Ed.; Academic Press: 1976; p 363.
8. Butz, P.; Ries, J.; Traugott, U.; Webwer, H; Ludwig H. *Pharm. Industrie* **1970**, *52*, 487.
9. Miller, J. F. *Biotechnol. Bioeng.* **1988**, *31*, 407.
10. Clery, C.; Bec, N.; Balny, C.; Mozhaev, V.; Masson, P. *Biochim. Biophys. Acta*, **1995**, *1253*, 85.
11. Gavalda, E.; Degraeve, P.; Lemay, P. *Enz. Micro. Tech.* **1996**, *18*, 10.
12. Rudd, E. A. Biochem. Biophy. Res. Comm. **1997**, *230*, 140.
13. Mozhaaev, V.; Heremanns, K.; Frank, J.; Masson, P.; Balny, C. *Trends in Biotechnology* **1994**, *12*, 493.
14. Gross, M.; Jaenicke, R. *Eur. J. Biochem.* **1994**, *221*, 617.
15. Balny, C.; Travers, F. *Biophys. Chem.* **1989**, *33*, 237.