

## Microemulsion을 이용한 고체표면에서 효소 비활성화 결정 -콜레스테논 표면에서 콜레스테롤 산화효소의 비활성화-

†이 강 민 · 이 석 재

†전북대학교 분자생물학과 · 화학과

### Determination of Enzyme Inactivation on Solid Surface by Microemulsion -Cholesterol Oxidase Inactivation on Cholestenone Surface-

Kang-Min Lee<sup>†</sup> and Seog-Jae Lee

<sup>†</sup>Department of Molecular Biology, Chonbuk National University, Chonju 561-756, Korea  
Department of Chemistry, Chonbuk National University, Chonju 561-756, Korea

#### 서 론

단백질이 고체 표면에 흡착하면 그 3차 구조가 변하게 된다. 흡착된 단백질이 효소라면 비활성화될 수 있다. 크로마토그래피와 면역측정에 사용되는 단백질은 고체물질 표면에 잘 흡착되어야 하지만 조직 이식이나 이식기관에는 단백질 흡착이 가능한 한 일어나지 않아야 한다(1-3). 단백질 흡착현상은 단백질의 성질이나 고체 표면에 따라 다르며, 이러한 단백질의 흡착 현상은 지금까지 ESCA, IR 같은 물리학적 방법으로만 연구되어왔다(4-6). 그러나, 최근 소수성 고체를 녹일 수 있으며 동시에 단백질을 안정화시킬 수 있는 미셀에 대한 연구가 이루어져 소수성 고체물질과 효소의 상호관계에 대한 연구가 가능하게 되었다.

미셀은 유기용매-물-계면활성제의 혼합액이며 계면활성제는 양친성이므로 소수성 부분은 유기용매와 친수성인 극성부분은 수용액과 서로 상호작용을 한다. 역미셀에서 유기용매 중의 물은 계면활성제가 만드는 막으로 둘러싸여 미세한 물방울 상태로 존재

하게 된다. 계면활성제 막으로 둘러싸인 수용액상에 있는 효소는 유기용매에 의한 비활성화로부터 보호 받을 수 있기 때문에 소수성 물질을 녹일 수 있는 유기용매에서 효소를 안정화시킬 수 있다(7). 이러한 미셀은 소수성 물질의 분석, 의약품합성, 단백질 분리, 막 모델 등 여러 생명공학분야에 이용되고 있다(8-10). 그러나, 미셀을 이용하여 고체 표면에서의 효소 비활성 기작을 연구하는 수단으로 이용할 수 있음은 지금까지 알려져 있지 않다.

본 논문은 미셀을 고체 기질 표면에서의 효소가 비활성화되는 기작을 연구하는데 이용할 수 있음을 밝히고자 한다.

#### 재료 및 방법

##### 시약 및 효소

*Streptomyces species*로부터 분리된 콜레스테롤 산화효소와 Peroxidase는 Boehringer Mannheim로부터 구입하여 사용하였다. CTAB(Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide), 5-cholestenone, phenol, aminoantipyrine과 cholesterol같은 기질물질은 Sigma로부터 구입하였다. CTAB는 에탄올로 재결

† Corresponding Author

정하여 정제한 후 사용하였다. 모든 유기용매는 특급 HPLC용이었으며 효소활성도는 37°C에서 항온되는 UV분광기(Hitachi, U-3300)를 사용하여 측정하였다.

**완충용액에서 효소 활성도 결정**

효소 활성도는 콜레스테롤로부터 콜레스테논이 합성되면서 생기는 흡광도(240nm)와 부가 생성물인 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 aminoantipyrine, phenol, peroxidase를 사용하여 500nm에서 흡광도로 측정되었다. 효소 활성도 결정은 0.5ml/ℓ의 Triton X-100이 녹아 있는 50mM TES(pH 7.5)완충용액에서 하였다. 효소 활성도를 결정하는 용액의 최종농도는 2.5 × 10<sup>-4</sup>M cholesterol, 20mM phenol, 1mM aminoantipyrine, 25 μg peroxidase이었다.

**Microemulsion에서 효소 활성도 결정**

Microemulsion에서 효소의 활성도 결정은 효소가 흡착되어 있는 고체결정(50~200mg)을 microemulsion(2ml)에 녹인 후 미셀의 최종농도가 6mM cholesterol, 80mM phenol, 3 × 10<sup>-4</sup>M aminoantipyrine, 25 μg peroxidase에서 활성도를 측정하여 비활성도를 결정하였다.

**고체 표면에서의 효소 비활성화 결정**

고체 표면 물질로 사용한 콜레스테논을 메탄올에서 재결정한 다음 완충용액에서 원심분리(3~4회)하여 고른 입자를 가진 고체를 얻었다. 먼저 완충용액과 microemulsion에서 효소농도에 따른 활성도를 결정하여 표준곡선을 만들어 효소의 활성도에 대한 효소의 농도를 결정하였다. 50~200mg의 콜레스테논과 콜레스테롤산화제 50U(250 μg)을 완충용액에 잘 섞어 250°C에서 15분 정도 평형 상태로 유지시킨 다음 5분 동안 원심분리하여 상층 수용액과 하층의 고체를 분리하였다. 상층액인 완충용액의 부피와 효소활성도(E<sub>liquid</sub>)를 결정한 후 활성도로부터 효소의 농도를 구하였다. 이로부터 E<sub>solid</sub>를 결정하였다.

$$E_{total} = E_{liquid} + E_{solid} \quad (1)$$

효소가 흡착되어 있는 고체를 20% CTAB microemulsion에 녹인 후 위의 조건에서 효소활성도를 결정하여 microemulsion 안에 녹아 있는 가역적 효소의 농도(E<sub>sol</sub><sup>rev</sup>)를 결정하였다. 이로부터 고체 표면의 가역적 효소 농도(E<sub>sol</sub><sup>rev</sup>)와 비가역적 효소농도(E<sub>sol</sub><sup>irr</sup>)를 구하였다.

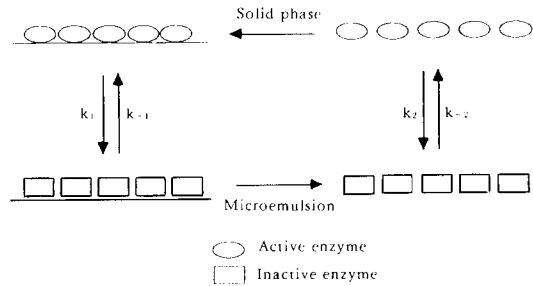


Fig. 1. Scheme of enzyme inactivation on solid surface and reactivation by microemulsion.

$$E_{sol} = E_{sol}^{rev} + E_{sol}^{irr} \quad (2)$$

**결과 및 고찰**

고체물질 표면에서 단백질의 흡착에 관한 연구는 의학과 생명공학분야에서 연구되고 있다. 단백질 분리, 단백질 여과기에는 단백질이 흡착되지 않아야 하며, 크로마토그래피에서는 단백질의 흡착이 잘 일어나야 한다. 특히 피부이식, 혈액, 치아에 관련되어 사용되는 물질은 혈액, 침에 함유되어 있는 단백질과의 상호작용이 일어나지 않아야 한다. 고체 표면에서 단백질 현상에 대한 연구는 air-water, oil-water 접촉면에서 일어나는 단백질 현상의 연구를 통하여 많은 정보를 얻을 수 있었다(14). 고체 표면에서 일어나는 단백질 흡착도는 단백질의 소수성(hydrophobicity)와 전하량(charge)에 의존한다(15). 효소가 고체 표면에 흡착되어 비활성화되는 것은 단백질 내부에 있는 소수성 아미노산과 고체 표면의 상호작용으로 그의 3차 구조가 변하여 비활성화 되기 때문이다. 생명과학에서 고체 표면에서 단백질 흡착에 대한 연구는 혈액단백질, plasma, fibrinogen에 대한 연구가 수행되고 있으나 이것들의 연구들은 거의 모두 물리적인 방법으로 결정되어 활성도의 변화는 측정할 수가 없었다.

효소와 많은 양의 소수성 물질의 동시에 녹일 수 있는 미셀은 Fig. 1처럼 고체 표면으로 사용된 소수성 물질을 microemulsion 형태로 녹일 수 있으며, 고체 표면에 흡착된 효소의 활성도 측정을 가능하게 하였다.

콜레스테롤 산화효소는 완충용액에서 고체상태인 기질 물질과 반응하여 20% 효율로 생성물을 만든다(11, 12). 더 이상 반응이 진행되지 않는 이유 중 한

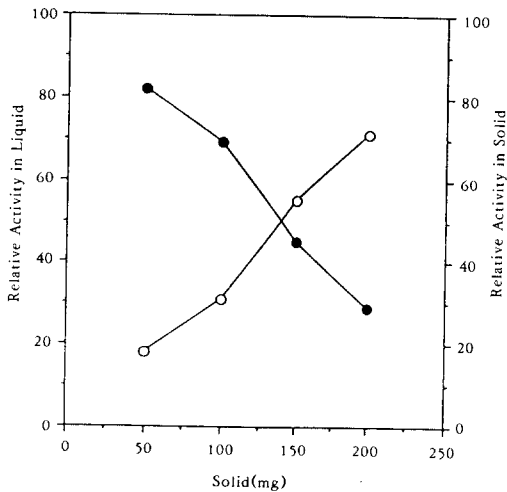


Fig. 2. Partition percentage of cholesterol oxidase in liquid(50mM TES pH 7.5) and on solid surface with increasing solid surface (cholestenone). ● is percentage of enzyme in liquid( $E_{liq}$ ) and ○ is percentage of enzyme on solid ( $E_{sol}$ ).

가지는 이때 효소가 고체 표면에 흡착되어 비활성화될 수 있기 때문이다. 고체 표면으로 사용된 물질(cholestenone)은 microemulsion에 매우 잘 녹으므로, 이것을 사용하여 고체 표면을 제거할 수 있다. 20% CTAB microemulsion에서 이 효소는 매우 안정하므로 이것을 이용하여 비활성화된 효소를 결정할 수 있었다(13).

고체 표면으로 사용한 고체의 양이 증가할수록 Fig. 2에서 보는 바와 같이 상층 수용액에 존재하는 효소의 양은 감소하고 하층 고체 표면에 효소가 많이 흡착한다. 50mg의 고체를 사용할 때에는 효소의 18%가 표면에 흡착하지만 200mg을 사용할 때에는 75%가 고체 표면에 흡착하였다(Fig. 2). 또한 고체 표면의 면적이 증가할수록 고체 표면에서 비활성화되는 효소의 양도 증가한다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 효소의 최대 흡착량은 1g/mg solid 정도이다. 효소 250을 100mg의 고체에 흡착했을 때 식(1)에 의하면 효소는 54%가 고체 표면에 흡착한다. 이때 수용액상의 효소활성도로부터 계산한 효소의 양( $E_{liquid}$ )은 115g이었다. 이것은 고체상에 효소 135g( $E_{sol}$ )이 흡착되어 있음을 의미한다. 고체상을 microemulsion에 녹여 고체 표면에 흡착된 효소

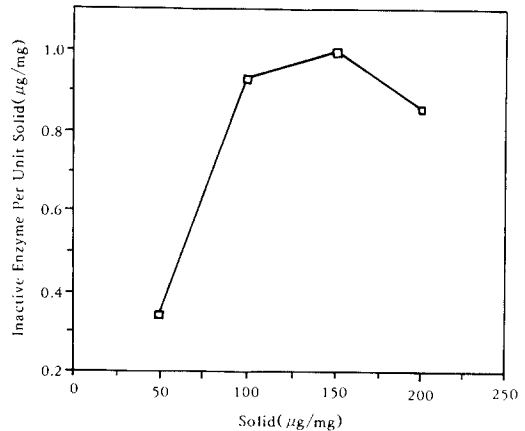


Fig. 3. Inactivation of cholesterol oxidase( $E_{ox}^*$ ) per unit solid( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) with increasing solid surface.

중 microemulsion에서 재활성화되는 가역적효소( $E_{sol}$ )을 결정하니 42g이었다. 식(2)로부터 고체에 흡착되어 완전히 비가역적으로 비활성화된 비가역효소( $E_{sol}$ )를 구하면 93g이 된다. 이때 단위 고체에 대한 비가역 흡착 효소량은 0.92g/mg solid가 된다.

이 연구는 막에서 콜레스테롤 산화효소의 기작을 이해하는데 도움이 될 수 있다. 콜레스테롤 산화효소는 막 안에 위치하는 콜레스테롤은 산화시키지 못하지만 표면에 있는 콜레스테롤은 산화시킨다(16). 이와 같이 콜레스테롤이 막안에 존재할 때 효소에 의하여 산화되지 않는 것은 두 가지 기작으로 설명될 수 있다. 그것은 콜레스테롤이 막에 강하게 결합되어 있어 산화되지 않거나 효소활성도가 표면의 밀도, 압력, packing에 의하여 비활성화되기 때문이다.

Microemulsion은 효소와 소수성 활성제 또는 억제제와 상호작용을 연구하거나 고체 표면에서 효소 비활성화를 연구하는데 이용할 수 있다.

### 참고문헌

1. H. G. Lensen, W. D. Bargeman, P. Bergveld, C. A. Smolders and J. Feijen (1984), *J. Colloid Interface Sci.*, **99**, 1.
2. W. G. Wood and A. Gadow (1983), *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **21**, 789.
3. G. H. Kessler and D. B. Lund (1989), *Foul-*

- ing and Cleaning in Food Processing (G. H. Kessler and D. B. Lund eds) Prien Chiemsee.
4. T. J. Lenk, B. D. Ratner, R. M. Gendreau and K. K. Chittur (1989), *J. Biomed. Mater. Res.*, **23**, 549.
  5. J. D. Andrade (1985), *Surface and Interfacial Aspects of Biomedical Polymers*, Vol. 1 *Surface Chemistry and Physics* (J. D. Andrade ed.), Plenum Press.
  6. C. R. Mcmillin and A. G. Walton (1974), *J. Colloid Interface Sci.*, **48**, 345.
  7. K. Martinek, A. V. Levashov, L. Khmel'niskiyu, N. C. Klyachko and I. V. Berezin (1982), *Science*, **218**, 889.
  8. J. P. Samama, K. M. Lee and J. F. Biellmann (1987), *Eur. J. Biochem.*, **163**, 609.
  9. P. L. Luisi, F. Henninger, M. Joppich, A. Dossena and G. Casnati (1977), *Biochem. Biophys. Res Comm.*, **74**, 1386.
  10. S. Barbaric and P. L. Luisi (1981), *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 4239.
  11. Lee K. M. and J. F. Biellmann (1988), *Tetrahedron*, **44**, 1135.
  12. Lee K. M. and J. F. Biellmann (1987), *New J. Chem.*, **11**, 775.
  13. Lee K. M. and J. F. Biellmann (1986), *Bioorganic Chem.*, **14**, 262.
  14. E. Dickinson and C. M. Workett (1989), *Foods and Colloids*(Bee R. D. ed), p. 74, Royal Society of Chemistry.
  15. W. Norde (1986), *Adv. Colloid Interface Sci.*, **25**, 341
  16. L. Gronberg and J. Slotte (1990), *Biochemistry*, **29**, 3173.