

고구마 β -아밀라아제의 안정성에 관한 연구(2)

안용근·이석건*

충청전문대학 식품영양과, * 충남대학교 식품공학과

Stability of Sweet Potato β -Amylase (II)

Yong-Geun Ann and Seuk-Keun Lee*

Dept. of Food Nutrition, Chung Cheong Junior College, Wolgokri 330,

Kang Nae Myun, Cheong Won Kun, Chung Buk 363-890, R. O. Korea

* Dept. of Food Science and Technology, College of Agriculture, Chungnam National University,

Gungdong 220, Yuseonggu, Thejon, 305-764, R. O. Korea

Abstract

Stabilities of sweet potato β -amylase on various reagents were studied. The enzyme was stabilized by bovine serum albumin, Triton X-100 and 2-mercaptoethanol of 0.04%. Among them, bovine serum albumin was the most effective. And enzyme stability was increased by using the deairated solution. The enzyme activity was remained 0% in the absence of glycerol, 25% in the presence of 20% glycerol and 50% in the presence of 40% glycerol at 37°C, for 15 hours in pH 11. SDS inhibited the enzyme, and 2-mercaptoethanol and dithiothreitol stabilized it.

Key words : sweet potato β -amylase, stability of sweet potato β -amylase

서 론

β -아밀라아제(EC 3.2.1.2, α -1,4-glucan maltohydrolase)는 녹말이나 글리코겐 등 α -1,4-글루칸을 비활원성 말단에서부터 차례대로 가수분해하여 말토오스를 생성하는 효소이다.

말토오스는 전분공업, 제당공업, 제과공업 등의 식품공업에 필수적인 당으로 수요가 계속 증가하고 있다. 말토오스 제조에는 β -아밀라아제가 필수적이며, 각광을 받고 있는 식혜도 β -아밀라아제의 작용으로 만들어진다.

β -아밀라아제는 고구마¹⁾ 외에 콩,²⁾ 밀,³⁾ 보리,⁴⁾ 무우⁵⁾ 등 여러 식물에서 보고되어 있다. 미생물 β -아밀라아제는 1970년대에 발견되기 시작하여 *Bacillus cereus*⁶⁾, *B. polymixa*⁷⁾, *B. megaterium*⁸⁾ 등의 세균과 *Streptomyces* sp.⁹⁾ 등의放사선균 등에서 발견되었다.

그 중에서 고구마 β -아밀라아제만 분자량 55,707¹⁰⁾의 동일 서브유니트 넷으로 형성된 분자량 222,828의

테트라머일 뿐 나머지 다른 효소는 대부분 분자량 5만 전후의 모노머이다. 필자 등은 산화전분을 아밀라아제에 결합시켜 활성을 갖는 모노머를 얻는데 성공하여, 고구마 β -아밀라아제의 서브유니트 구조는 촉매기능에는 관계없고 아밀라아제의 안정화기능에만 관여한다는 사실을 밝혔다.¹¹⁻¹⁵⁾

β -아밀라아제는 SH 시약으로 실활되기 때문에 SH 효소^{16,19)}로 알려져 왔으나 필수적이 아닌 것으로 밝혀졌다.^{20,21)} 그러나, SH기의 산화나 변형으로 활성을 잃는 경우가 많기 때문에 효소의 안정화를 위해서는 SH 기를 보호해야 하며, 고구마 β -아밀라아제의 안정성에는 여러가지 인자가 관여한다.

필자 등은 전보²²⁾에서 고구마 β -아밀라아제에 미치는 온도의 영향, pH의 영향, NaCl의 영향, SDS의 영향, 염산구아니딘과 우레아의 영향을 보고하였다. 본 연구는 그에 이어 여러 안정화제 및 저해제의 영향과 글리세롤에 의한 안정화를 분석한 결과이다.

실험 재료 및 방법

1. 시 약

가용성 전분은 일본 國產化學, 크로마토그래피용 DE-AE cellulose, Sephadex G-200 등은 Pharmacia사 제품을 사용하였다. 나머지 시약은 특급 내지 일급을 사용하였다.

2. 고구마 β -아밀라아제의 정제

일본산 고구마 高系14號를 찹즙하여 100°C에서 10분간 열처리하여 β -아밀라아제에 상온의 아세톤에 대한 안정성을 부여한 다음 50% 및 45% 2회의 아세톤 침전과 DEAE-cellulose 이온교환크로마토그래피, Sephadex G-200 겔크로마토그래피, 결정화 등으로 정제하였다.¹²⁾

3. 활성 측정¹²⁾

1) 기 질

가용성 전분 200mg을 소량의 물에 풀어 100°C에서 3분간 가열하여 녹인 후 0.8% Triton X-100을 함유한 1M 아세트산 완충액(pH 4.8) 0.5ml를 가하고, 나머지를 중류수로 채워 10ml로 하였다. 이 용액은 0.05M 아세트산 완충액 속에 0.04% Triton X-100과 2% 가용성 전분기질을 함유한다.

2) 아밀라아제 용액

활성측정용 아밀라아제액은 0.04% Triton X-100을 함유한 0.05M 아세트산 완충액(pH 4.8)으로 적정 농도로 희석하여 사용하였다.

3) 반 응

상기와 같이 조제한 기질용액 0.2ml에 고구마 β -아밀라아제 용액 0.2ml를 가하여 37°C에서 10분간 반응시킨 다음 Somogyi-Nelson법²³⁾으로 정량하였다. 활성은 이 조건에서 1분간에 1 μ mol의 말토오스를 유리하는 양을 1unit로 하였다.

4. 단백질 정량

$\epsilon_{280nm}^{1\%} = 17.1$ 을 기준하여 280nm에서의 흡광도로 측정하였다.¹⁶⁾

5. 안정제의 영향

끓여서 탈기한 용액과 탈기하지 않은 용액을 따로 사용하여 0.1M 아세트산 완충액(pH 5.0)에 고구마 β -아

밀라아제 15 μ g / ml와, 0.04% Triton X-100, 0.04% bovine serum albumin, 5mM 2-mercaptoethanol(2-ME)을 각각 가하여 20°C에서 보존하면서 시간별로 채취한 다음 67배 희석하여 활성을 측정하였다.

6. 알칼리 영역에서의 pH 안정성

각 pH의 0.5M glycine-NaCl-NaOH 완충액에 고구마 β -아밀라아제를 10 μ g / ml 농도로 가하고, 글리세롤을 20%, 40% 각각 가해 37°C에서 15시간 보온한 후 0.04% Triton X-100을 함유한 0.1M 아세트산 완충액(pH 4.8)으로 30배 희석하여 활성을 측정하였다.

7. pH 안정성에 대한 글리세롤의 영향

1) 반응 후 즉시 활성 측정

한 가지는 pH 9, 10, 11의 0.3M Britton-Robinson 광역완충액에 글리세롤을 20%, 고구마 β -아밀라아제를 5 μ g / ml 농도로 가하여 37°C에서 보온하면서 정해진 시간에 채취하여 0.04% Triton X-100을 함유한 0.3M 아세트산 완충액(pH 4.8)에 20배 희석하여 활성을 측정하였다.

나머지 하나는 글리세롤을 가하지 않은 것 외에는 동일한 조건에서 반응시켰다.

2) 반응 후 투석시켜 활성 측정

한 가지는 pH 9, 10, 11의 0.3M Britton-Robinson 광역완충액에 ① 글리세롤 20%, 고구마 β -아밀라아제 5 μ g / ml 농도로 가한 것, ② 글리세롤을 가하고 pH 미터로 pH를 조절한 것, ③ 글리세롤을 가하지 않은 것을 37°C에서 7시간 보온하면서 정해진 시간에 일부를 채취하여 0.1M Tris-HCl 완충액(pH 8.0)에 희석한 다음 0.01M 아세트산 완충액(pH 6.5)에 대하여 4°C에서 24시간 투석한 후 찬존활성을 측정하였다.

8. pH에 따른 SDS, 2-ME, dithiothreitol(DTT)의 영향

하나는 0.1M glycine-NaCl-NaOH(pH 9.0) 완충액에 아밀라아제 농도 12 μ g / ml의 조건에서, 다른 하나는 0.1M 칼륨-인산 완충액(pH 6.5)에서 상기와 동일한 조건에서 반응시켜 동일한 방법으로 희석하여 활성을 측정하였다.

9. SDS, 2-ME, DTT의 영향

0.1M glycine-NaCl-NaOH(pH 9.0) 완충액에 고구마 β -아밀라아제 12 μ g / ml과 여러 농도의 SDS, 2-ME,

DTT가 함유된 반응용액을 37°C에서 22시간 반응시키면서 시간별로 채취하여 0.04% Triton X-100을 함유한 0.05M 아세트산 완충액(pH 4.8)으로 40배 희석하여 활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

1. 안정화제에 의한 영향

고구마 β -아밀라아제에 bovine serum albumin, Triton X-100, 2-ME을 가한 것은 이들 시약을 가하지 않은 것보다 높은 활성을 나타냈다. Bovine serum albumin과 Triton X-100은 고도희석에 의한 해리를 방지하여 서브유니트 구조를 안정화시키는 작용을 하고, 2-ME은 활성부위 SH기의 산화를 방지하는 작용을 하여 고구마 β -아밀라아제를 안정화시키는 것으로 보인다. (Fig. 1)

이들 반응에 탈기하지 않은 물을 사용하면 탈기한 물을 사용한 것보다 활성이 낮아졌다. 그것은 물에 녹아 있는 산소가 SH기를 산화시키기 때문이다. 그러므로, 효소의 희석이나 활성 측정에 사용하는 물은 탈기해서 사용해야 한다.

고구마 β -아밀라아제는 SH기가 활성에 관여하는 것으로 알려져 왔으나 결정적인 것은 아니고, 활성 부위에는 글루타밀기가 관여하는 것으로 밝혀졌다.¹⁰⁾ 그러나, SH기의 산화로 불활성화되는 것은 사실이기 때문에 안정화제로서 2-ME, DTT, ascorbic acid, 환원형 글루타티온, 시스테인 등의 산화방지제를 가한다. 공기산화

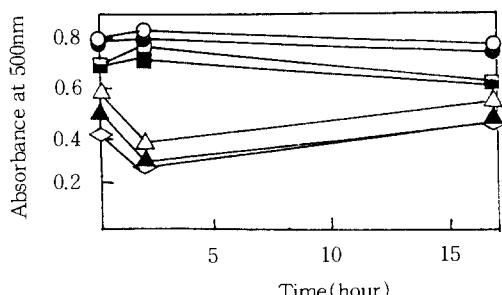


Fig. 1. Effects of some stabilizing reagents of sweet potato β -amylase. The enzyme(15 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was reacted with stabilizing reagents in 0.1M acetate buffer(pH 5.0) for 17 hours at 20°C. ○-○ 0.04% bovine serum albumin, deairated ; ●-● 0.04% bovine serum albumin ; □-□ 0.04% Triton X-100, deairated ; ■-■ 0.04% Triton X-100 ; △-△ 5mM 2-ME, deairated ; ▲-▲ 5mM 2-ME ; ◇-◇ controlled.

되는 효소는 N_2 가스 존재하에 보존해야 한다.²⁴⁾

Tekeda 등²⁵⁾은 0.04% Triton X-100, Tween 101, egg albumin, bovine serum albumin 등은 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하의 고구마 β -아밀라아제를 안정화시키는 작용을 한다고 보고하였다. Tekeda 등²⁵⁾은 Triton X-100과 bovine serum albumin이 동일한 안정화 작용을 한다고 하였으나 본 결과는 bovine serum albumin의 작용이 더 강한 것으로 나타났다. 작용 메카니즘은 미셀을 형성하여 고구마 β -아밀라아제가 서브유니트로 해리되는 것을 방지하는 데 있다고 하였다.

2. 글리세롤에 의한 pH 안정성의 영향

37°C, 각 pH에서 15시간 반응시킨 후 활성을 측정한 결과, 글리세롤량의 증가에 따라 pH 안정성이 증가되었다. 그래서, pH 11에서 글리세롤이 존재하지 않을 경우는 활성을 모두 잃었으나 20% 존재할 때는 25%, 40% 존재할 때는 50%의 활성이 남았다. 그러므로, 글리세롤은 고구마 β -아밀라아제의 효과적인 안정제로 밝혀졌다. (Fig. 2)

Takeda 등²⁵⁾은 폴리에틸렌글리콜과 에틸렌글리콜, 폴리비닐알코올 등을 0.04% 사용하여 안정화 작용을 검토하였으나 지나치게 저농도이기 때문에 효과는 그다지 높지 않다.

이들 외에도 설탕, 글루코오스, 소르비톨, 만니톨 등이 안정화 작용을 하는 것으로 알려져 있다.²³⁾

일반적으로 효소는 기질 속에서 안정화되며, 경쟁적 저해제는 기질보다 더 강한 효소 보호작용을 한다.¹³⁾

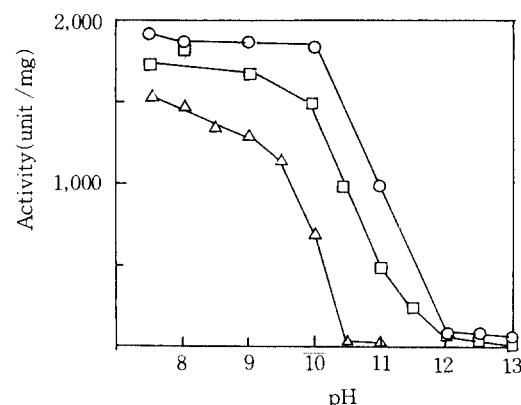


Fig. 2. pH stability of sweet potato β -amylase in the presence or absence of glycerol. The enzyme (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was incubated in the presence or absence of glycerol in 0.5M glycine-NaCl-NaOH buffer for 15 hours at 37°C. ○-○, in the presence of 40% glycerol ; □-□, in the presence of 20% glycerol ; △-△, in the absence of glycerol.

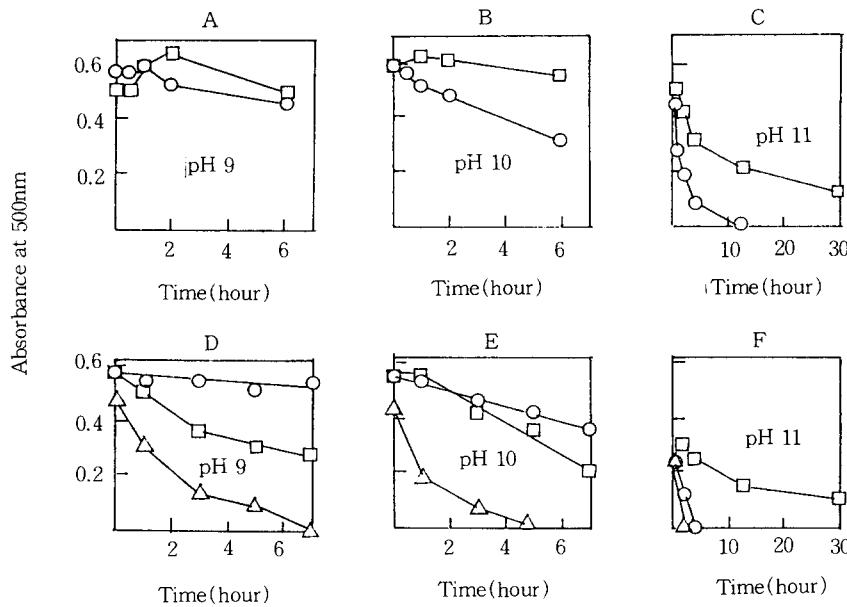


Fig. 3. pH stability of sweet potato β -amylase in the presence or absence of glycerol. The enzyme(5 μ g/ml) was incubated in 0.3M Britton-Robinson buffer(each pH) for each time at 37°C and A~C were diluted with distilled water and D~F were dialized on 0.01M acetate buffer(pH 6.5) for 24 hours at 4°C and activity was assayed. ○-○, in the absence of glycerol ; □-□, in the presence of 20% glycerol ; △-△, in the presence of glycerol, controlled pH.

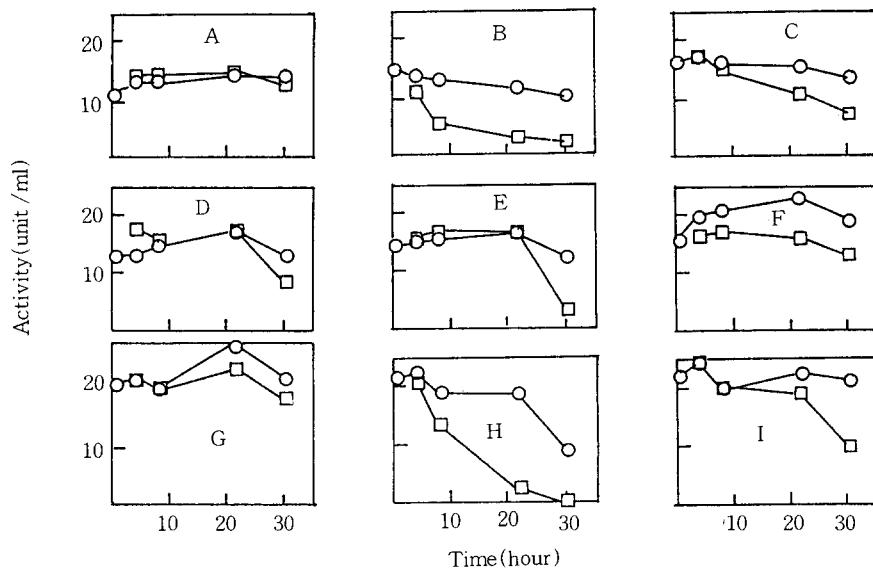


Fig. 4. Effects of SDS, 2-mercaptoethanol and dithiothreitol on sweet potato β -amylase in pH 6.5 and pH 9.0. The enzyme(12 μ g/ml) was reacted with reagent in 0.1M acetate buffer(pH 6.6, ○-○) or 0.1M glycine-NaCl-NaOH buffer(pH 9.0, □-□) for each time at 37°C. A, enzyme alone ; B, 0.2% SDS ; C, 0.1% SDS ; D, 5% 2-ME ; E, 5% 2-ME + 0.2% SDS ; F, 5% 2-ME + 0.1% SDS ; G, 0.1M DTT ; H, 0.1M DTT + 0.2% SDS ; I, 0.1M DTT + 0.1% SDS.

3. 글리세롤 존재시와 비존재시의 pH 안정성의 경시적 변화

글리세롤이 20% 존재할 때의 각 pH에서의 잔존 활성의 경시변화는 Fig 3과 같다. A~C는 증류수에 희석하여 잔존활성을 측정한 결과, D~F는 0.01M 아세트산 완충액(pH 6.5)에 24시간 투석하여 측정한 결과이다. 글리세롤이 존재하지 않을 때는 pH 10에서 6시간 후 남은 활성은 50%인 반면 pH 11에서는 10분 뒤에 활성을 모두 잃었다. 그러나 글리세롤이 존재하면 pH 10까지 거의 변화가 없었고, pH 11에서는 10분 후 40% 정도의 활성이 남아서 글리세롤은 pH에 대한 안정성을 증가시켰다.

투석하여 활성을 측정한 결과도 비슷하지만 전반적으로 낮은 활성을 나타내고 있다. 그것은 투석하면 낮은 농도에서 아밀라아제가 해리되고, 물을 계속 갈아 주기

때문에 산소가 새로 공급되어 SH기 등의 산화가 계속 진행되기 때문으로 보인다. pH 10에서는 예외적으로 글리세롤이 없을 때의 아밀라아제 안정성이 높게 나타났다.

4. pH에 따른 SDS, 2-ME, DTT의 영향

아밀라아제를 불활성화시키는 pH 9.0과, 안정 pH 영역인 6.6에서 계면활성제인 SDS, 환원제인 2-ME과 DTT를 가해 아밀라아제의 안정성에 미치는 영향은 Fig. 4와 같다. pH 6.6, 9.0 모두 2-ME와 DTT의 안정화 작용이 가장 커다. 반면, SDS양이 많을수록 활성을 저하하였다. 이것은 환원제가 활성부위의 SH기산화를 막고, SDS는 서브유니트 해리를 촉진하기 때문으로 보인다.

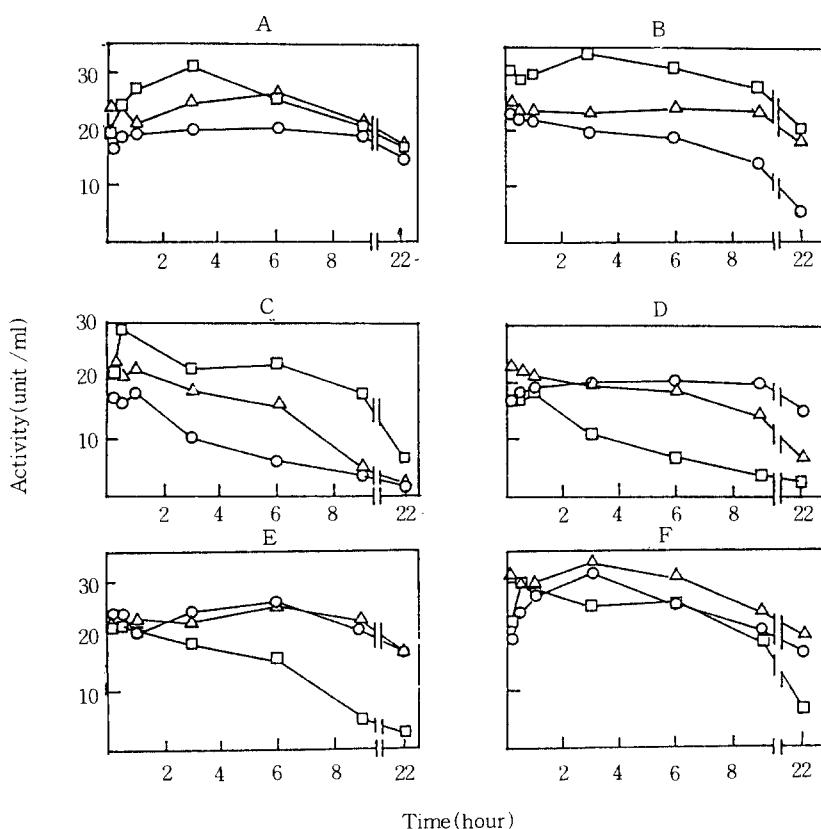


Fig 5. Effects of SDS, 2-mercaptoethanol and dithiothreitol on sweet potato β -amylase. The enzyme (12 μ g/ml) was reacted with each reagent in 0.1M glycine-NaCl-NaOH buffer(pH 9.0) for each time at 37°C. A. ○-○ did not treated ; □-□ 5% 2-ME ; △-△ 0.1M DTT, B. ○-○ 0.1% SDS ; □-□ 5% 2-ME + 0.1% SDS ; △-△ 0.1M DTT + 0.1%, C. ○-○ 0.2% SDS ; □-□ 5% 2-ME + 0.2% SDS, △-△ 0.1M DTT + 0.2% DTT, D. ○-○ did not treated ; □-□ 0.2% SDS ; △-△ 0.1% SDS, E. ○-○ 0.1M DTT ; □-□ 0.1M DTT + 0.2% SDS △-△ 0.1M DTT + 0.1% SDS, F. ○-○ 5% 2-ME ; □-□ 5% 2-ME + 0.2% SDS ; △-△ 5% 2-ME, 0.1% SDS.

5. SDS, 2-ME, DTT의 영향

Fig. 5도 Fig. 4와 비슷한 결과이지만 여기서는 pH를 9.0으로 고정화시켜서 SDS, 2-ME, DTT의 복합작용을 검토하였다. 이 결과에서도 Fig 4와 마찬가지로 SDS가 저해작용을 하지만, 2-ME와 DTT는 SDS의 저해작용을 억제하는 것으로 나타났다. 2-ME와 DTT는 단순히 활성부위의 SH기의 산화방지 역할만 하는 것이 아니라 서브유니트 구조를 형성하는 데 필요한 잔기의 작용기를 보호하고 있기 때문으로 보인다.

요약

여러 시약에 의한 고구마 β -아밀라아제의 안정화 작용을 검토하였다. 0.04% bovine serum albumin, Triton X-100, 2-mercaptoethanol 등은 고구마 β -아밀라아제를 안정화시켰다. 그 중 bovine serum albumin의 안정화 작용이 가장 강하였다. 또, 반응용액을 탈기하면 고구마 β -아밀라아제의 안정성이 증가하였다. 알칼리 pH에서 글리세롤은 농도가 높을수록 효소 안정성을 증가시켰다. 그래서 pH 11, 37°C에서 15시간 후 글리세롤이 존재하지 않을 때는 0%, 20% 글리세롤에서는 25%, 40% 글리세롤에서는 50%의 활성이 남았다. SDS는 효소를 저해하였고, 2-mercaptoethanol과 dithiothreitol은 안정화시켰다.

참고문헌

- Balls, A. K., Walden, M. K. and Thompson, R. R. : A crystalline β -amylase from sweet potato, *J. Biol. Chem.*, 173, 9~19(1948).
- Gertler, A. and Birk, Y. : The role of sulphhydryl groups in soybean β -amylase, *Biochim. Biophys. Acta*, 118, 98~105(1966).
- Kneen, E. and Sandstedt, R. M. : Betaamylase activity and it's determination in germinated and ungerminated cereals, *Cereal Chem.*, 18, 237~252 (1941).
- Weill, C. E. and Caldwell, M. L. : A study of the essential groups of β -amylase I ~ II, *J. Am. Chem. Soc.*, 67, 212~217 (1945).
- 相原茂夫, 森田雄平 : ダイコンおよびダイズ β -アミラーゼ, 植物酵素蛋白質研究法, 共立出版, 438~437(1976).
- Takasaki, Y. : Purification an enzymatic properties of β amylase and pullanase from *Bacillus cereus* var. *mycoides*, *Agric. Biol. Chem.*, 40(8) 1523~1530(1976).
- Robyt, J. and French, D. : Purification and action of an amylase from *Bacillus polymyxa*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 104, 338~345(1964).
- Higashihara, M., Okada, S. : Studies on β -amylase of *Bacillus megaterium* strain No. 32, *Agric. Biol. Chem.*, 38(5), 1023~1029(1974).
- Shinke, R., Nishira, H. and Mugibayashi, N. : Isolation of β -amylase producing microorganism, *Agric. Biol. Chem.*, 38(3) 665~666(1974).
- Toda, H., Nitta, Y., Asanami, S., Kim, J. P. and Sakiyama, F. : Sweet potato β -amylase, primary structure and identification of the active-site glutamyl residue, *Eur. J. Biochem.*, 216, 25~38(1993).
- Ann, Y. G., Iizuka, M., Minamiura, N. and Yamamoto, T. : Evidence for the existence of an active monomer of sweet potato β -amylase, *Agric. Biol. Chem.*, 53(11), 3109~3110(1989).
- Ann, Y. G., Iizuka, M., Minamiura, N. and Yamamoto, T. : Preparation and some properties of active monomer of sweet potato β -amylase, *Agric. Biol. Chem.*, 53(4), 769~774(1990).
- Ann, Y. G., Iizuka, M., Yamamoto, T. and Minamiura, N. : Active monomer of sweet potato α -amylase : Stabilization and an improved preparation method using α -cyclodextrin, *J. Ferment. Bioeng.*, 70(2), 75~79(1990).
- Minamiura, N., Ann, Y. G., Adachi, T., Ito, K., Iizuka, M., and Yamamoto, T. : Function of subunit structure of sweet potato tetrameric β -amylase, *Mic. Util. Ren. Res.*, 7, 18~24(1990).
- 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 Kagaku*, 38(2), 153~157(1991).
- Englard, S., Sorof, S. and Singer, T. P. : Intramolecular nature of the oxidative inactivation of crystalline β -amylase, *J. Biol. Chem.*, 189, 217~226(1951).
- Ito, M. and Yoshida, S. : Sulphydryl groups in crystalline sweet potato β -amylase, *Bull. Agr. Soc. Japan*, 22(5) 287~293(1958).
- Thoma, J. A., Kosland, D. E., Jr., Shinke, R. and Ruscia J. : Influence of sulphydryl groups on the activity of sweet potato β -amylase, *Biochem.*, 4(4) 714~722(1965).
- Spradlin, J. and Thoma, J. A. : β -Amylase thiol groups, *J. Biol. Chem.*, 245(1) 117~127(1970).
- 竹田青史, 會作進, サツマイモ β -アミラーゼ, 植物酵素蛋白質研究法, 共立出版, 438~443(1976).
- 三上文三, 野村啓一, 馬島肇一, 森田雄平, ダイズ β -アミラーゼの構造とSH基の反応性, 濃粉科學, 36(2), 67~72 (1989).
- 안용근, 이석진 : 고구마 β -아밀라아제의 안정성에 관한 연구(1), 한국식품 영양학회지, 9(3), 247~252(1996)
- Nelson, N. : A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose, *J. Biol. Chem.*, 153, 375~379(1944).
- 안용근, 효소단백질 정제법, 양서각, 74-77(1994).
- Takeda, Y. and Hizukuri, S. : Effect of Triton X-100 on sweet potato β -amylase, *Biochim. Biophys. Acta*, 268, 175~183(1972).

(1996년 8월 10일 접수)