

IO₄-산화 전분 변형 β-아밀라아제의 안정성 및 α-Cyclodextrin의 영향

安龍根·南浦能至*

충청전문대학 식품영양과

*大阪市立大學 理學部 生物學科

A Study of β-Amylase Modified IO₄-Oxidized Soluble Starch —Effects of α-Cyclodextrin—

Yong-Geun Ann and Noshi Minamiura

Dept. of Food Nutrition, Chungcheong Junior College, Gangnae, Cheongwon, Chungbuk, R. O. Korea

*Lab. of Enzyme Chemistry, Dept. of Biology, Faculty of Science,

Osaka City University, Sugimoto 3-3-138, Sumiyoshi, Osaka, 558, Japan

Abstract

pH stability of sweet potato β-amylase modified with IO₄-oxidized soluble starch was increased at pH 3, 5~9 and 11. And optimum pH was 3 and 5 for modification. Thermal stability of the enzyme modified with IO₄-oxidized soluble starch was increased at 60°C for 15min. pH stability of barley β-amylase modified with IO₄-oxidized soluble starch was increased at 3~4 and 8~11, and more increased at pH 3 and 8~11 in the presence of α-cyclodextrin.

Key words : sweet potato β-amylase, IO₄-oxidized soluble starch, α-cyclodextrin.

서론

β-Amylase는 글리코젠, 전분 등의 α-1,4-글루칸의 비환원 말단부터 차례대로 가수분해하여 β-maltose를 생산하는 효소이다. 대부분의 β-아밀라아제는 분자량 5만 전후의 모노머인데 반해 고구마 β-아밀라아제는 분자량 55,707의 동일 서브유닛으로 형성된 테트라머이다¹⁾. 그러나, 서브유닛 구조의 기능은 밝혀져 있지 않고, 시약^{2,3)}이나 고도회석⁴⁾으로 해리된 서브유닛은 매우 불안정하여 바로 실활되기 때문에 모노머는 활성을 갖지 않는 것으로 알려져 왔다. 그러나, 본 연구자 등은 알칼리 pH에서 고구마 β-아밀라아제를 서브유닛으로 해리하여 산화 전분 및 말토올리고당으로 변형시켜 안정하고, 활성을 나타내는 모노머 조제에 성공하였다. 나아가 α-cyclodextrin이 안정성을 증가시킨다는 사실도 밝혔다⁵⁻¹⁰⁾.

이 변형방법은 효소입체구조의 해석, 효소 서브유

닛 구조의 해석, 불안정한 효소의 안정화, 의약학 분야에서 단백질성 의약의 면역완화에 의한 약효의 상승 등에 적용할 수 있다. 공업적으로 사용하는 효소는 안정성이 요구되지만 경제적, 효과적인 방법은 적고, 있어도 사용대상이 매우 한정적인 경우가 많다.

본 연구는 고구마 β-아밀라아제 및 보리 β-아밀라아제에 이 방법을 적용시켜 효소의 안정성이 증가하는 것을 확인한 결과이다.

재료 및 방법

1. 효소

고구마 β-아밀라아제는 전보의 방법^{5,6)}을 약간 변형하여 정제하였다. 즉, 고구마 착즙액을 60°C에서 10분간 열처리한 다음 아세톤 25%를 가해 원심분리하여 생성된 침전을 버리고, 상정액에 아세톤을 45% 되도록 가해 원심분리하여 생성된 침전을 Sephadex

G-200의 겔 크로마토그래피, DEAE-Sephadex A-50의 이온교환 크로마토그래피로 정제한 다음 증류수 중에서 투석 결정화시켜서 사용하였다. 정제효소는 1,518unit/mg의 비활성을 나타냈다.

보리 β -아밀라아제는 阪急バイオ(株)의 Himaltosin GL(10,000unit/ml)을 사용하였다.

2. 산화 전분의 조제

전분의 방법⁵⁾에 따라 0.2M NaIO₄ 용액에 가용성 전분 2%를 현탁시켜 4℃에서 23시간 반응시킨 다음 투석후 동결건조하여 조제하였다.

3. 활성 측정

0.1M 아세트산 완충액(pH 5.0) 중의 2% 가용성 전분과 0.2ml에 효소액 0.2ml를 가해 37℃에서 10분간 반응시킨 다음 Somogyi-Nelson법¹¹⁾으로 생성된 환원당을 정량하여 활성을 산정하였다. 1 unit는 1분간 1 μ mol의 말토오스를 유리하는 효소력으로 하였다.

4. pH에 따른 변형

0.15M 각 pH의 Britton-Robinson 완충액 0.2ml 중에서 5% IO₄ 산화 가용성 전분과 β -아밀라아제 10unit를 40℃에서 10분간 반응시킨 다음 0.1M 아세트산 완충액(pH 5.0)으로 20배 희석하여 활성을 측정하였다.

5. pH 안정성

방법 1(비환원) : 0.15M Britton-Robinson 완충액(pH 3 및 pH 5) 0.5ml 중에서 5% IO₄ 산화 가용성 전분과 β -아밀라아제 60unit를 40℃에서 10분간 반응시킨 다음 물로 6.7배 희석하여 0.1M 아세트산 완충액(pH 5.0)으로 20배 희석하여 활성을 측정하였다.

방법 2(환원) : 0.15M Britton-Robinson 완충액(pH 5) 0.25ml 중에서 5% IO₄ 산화 가용성 전분과 β -아밀라아제 30unit를 40℃에서 15분간 반응시킨 다음 물로 6.7배 희석하여 0.1M 아세트산 완충액(pH 5.0)으로 20배 희석하여 활성을 측정하였다.

보리 β -아밀라아제 : 0.25M Tris-HCl(pH 8.0) 0.4ml에 산화전분 2.4mg, 효소 300unit, α -cyclo-dextrin 2%를 함유, 또는 함유하지 않은 반응액을 37℃에서 10분간 반응시킨 다음 50 μ l를 각 pH의 0.1M Britton-Robinson 완충액 0.95ml에 가해 37℃에서 2시간 항온시킨 다음 100배 희석하여 잔존활성

을 측정하였다.

6. 열 안정성

방법 1(비환원) : 0.15M Britton-Robinson 완충액(pH 3 및 pH 5) 0.25ml 중에서 5% IO₄ 산화 가용성 전분과 β -아밀라아제 30unit를 40℃에서 10분간 반응시킨 다음 0.1M 인산 완충액(pH 6.8)으로 10배 희석하여 30℃에서부터 70℃까지 각 온도에서 15분간 항온한 다음 0.1M 완충액(pH 5.0)으로 14.5배 희석하여 활성을 측정하였다.

방법 2(환원, 온도변화) : 0.15M Britton-Robinson 완충액(pH 3 및 pH 5) 0.25ml 중에서 5% IO₄ 산화 가용성 전분과 β -아밀라아제 30unit를 40℃에서 15분간 반응시킨 다음 NaBH₄를 0%, 0.5%, 1.4%, 4% 첨가하여 40℃에서 10분간 환원시킨 다음 0.2M 인산 완충액(pH 6.8)으로 10배 희석하여 30℃에서부터 70℃까지 각 온도에서 30분간 항온한 다음 0.1M 완충액(pH 5.0)으로 14.5배 희석하여 활성을 측정하였다.

방법 3(환원, 온도고정) : 0.15M Britton-Robinson 완충액(pH 5) 0.25ml 중에서 5% IO₄-산화 가용성 전분과 β -아밀라아제 30unit를 40℃에서 15분간 반응시킨 다음 50% NaBH₄를 1.4% 첨가하여 40℃에서 10분간 환원시켜서 0.2M 인산 완충액(pH 6.8)으로 10배 희석하여 60℃에서 15분간 항온한 다음 0.1M 완충액(pH 5.0)으로 14.5배 희석하여 활성을 측정하였다.

결 과

1. 산화 전분

NaIO₄로 산화한 가용성 전분 및 말토올리고당은 FPLC 분석으로 Fig. 1과 같은 결과를 나타냈다. 전분이 산화되면 알데히드기가 생성되어 280nm에서 흡광한다. 산화 전분은 UV에서 피크(Fig. 1 A)를 나타냈기 때문에 산화 전분에 알데히드기가 생성된 것으로 확인된다. 당의 굴절을 검출(Fig. 1 B)에서는 UV 검출과 달리 당의 피크가 둘로 나누어져 있다. 그리고, 산화시키지 않은 전분보다 분자량이 작은 것으로 나타난 것은 산화로 α -1,4-결합이 분해되어 작아졌거나 알데히드기가 Superose 12와 친화력을 나타내기 때문으로 보인다.

2. 변형 pH

각 pH의 완충액을 사용하여 pH별로 IO₄-산화 전

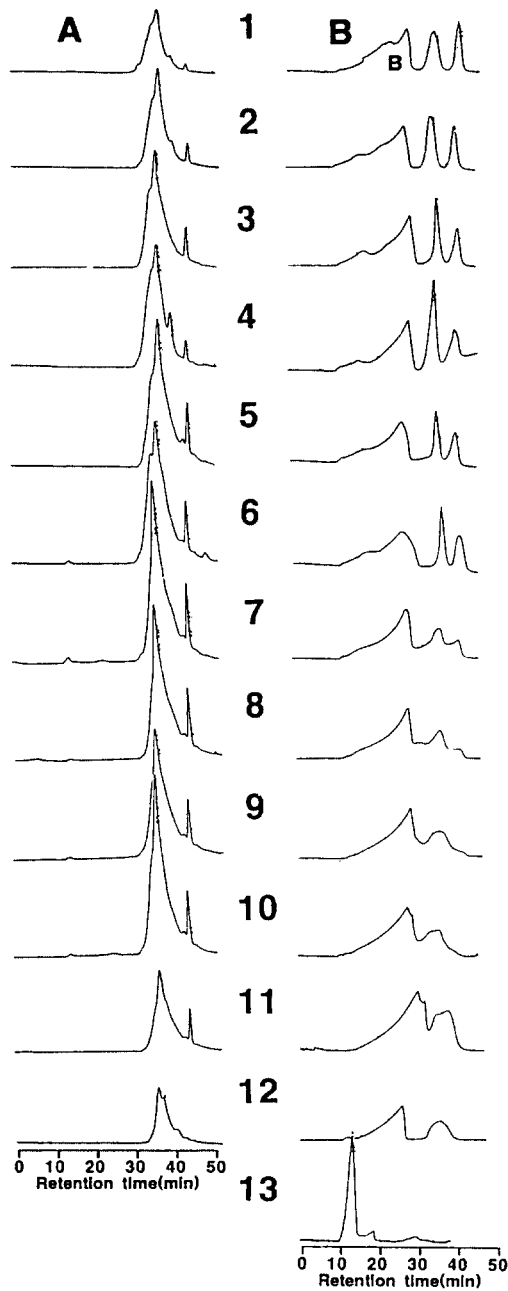


Fig. 1. FPLC of IO₄-oxidized starch and maltohexaose. Two % of suspension of glucan was reacted with 0.2M sodium periodate at 4°C for ; 1, 20min ; 2, 40min ; 3, 6hour ; 5, 48hour ; 6, 72hour ; 4, 7-11, 20 hour : 1-6, soluble starch ; 7, potato starch ; 8, sweet potato starch ; 9, wheat starch ; 10, amylopectin ; 11, corn starch ; 12, maltohexaose ; 13, native soluble starch : Detect, UV (A) and RI (B) ; column, Superose 12 (1×30cm) ; elute, 0.1M phosphate buffer(pH 6.8) containing 0.2M NaCl (A) and distilled water (B), flow rate, 0.5ml /min ; B, buffer.

분으로 고구마 β-아밀라아제를 변형하여 활성을 측정 한 결과 Fig. 1과 같이 알칼리 측에서는 비변형 효소 보다 활성이 저하하였으나 pH 3과 5에서는 활성이 증가하였다. 이 결과에 따라 pH 3과 5에서 변형하여 pH 안정성과 열 안정성을 측정하였다(Fig. 2).

3. pH 안정성

pH 3 및 5 변형의 경우, 환원시키지 않은 효소는 Fig. 3 및 Fig. 4와 같이 비변형 효소보다 안정성이 낮았다. 원인은 pH 9 이상에서 변형하는 경우 효소는 모노머로 해리되어 알칼리에 의해 변성되기 때문이다. 또, 산화 전분이 효소의 활성부위 가까운 곳에 결합하여 활성을 일부 저해하는 데에도 원인이 있는 것으로 보인다(Fig. 3, Fig. 4).

그러므로 활성부위를 저해하지 않을 때 반응을 멈추기 위하여 NaBH₄로 환원시킨 다음 pH 안정성을 측정한 결과 Fig. 5와 같이 pH 3, 5~9, 11에서 변형 효소가 약간 높은 안정성을 나타냈다. 그러나 pH 9 에서 잔존 활성이 낮아져서 깊은 골을 보이고 있다. 이 골은 Fig. 2~4 모두 나타나지만 차이가 적다. 이것은 pH에 따른 효소의 해리 회합과 관계가 있는 것으로 보인다(Fig. 5).

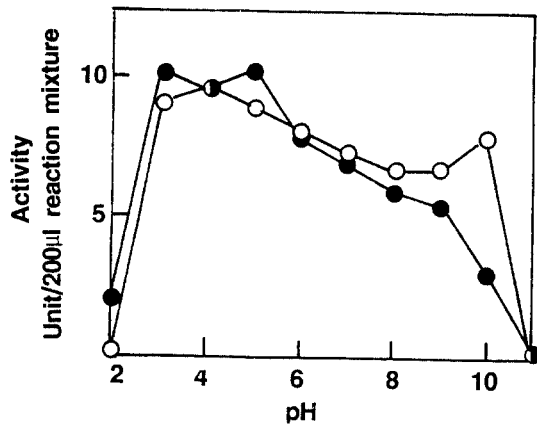


Fig. 2. pH stability of sweet potato β-amylase under modification with IO₄-oxidized soluble starch. The enzyme (10 unit) was reacted with 5% of oxidized soluble starch in 200µl of 0.15M Britton-Robinson buffer (each pH) at 40°C for 15min, and diluted with 0.1M acetate buffer(pH 5.0) to 40 fold and its activity was assayed. The native enzyme was treated in the same conditions in the absence of oxidized soluble starch. ○, native enzyme ; ●, modified enzyme.

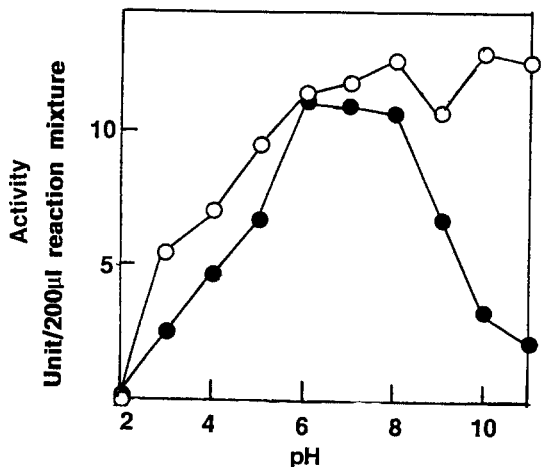


Fig. 3. pH stability of sweet potato β -amylase modified with IO_4 -oxidized soluble starch at pH 3. The enzyme (60 unit) was reacted with 5% of oxidized soluble starch in 0.5ml of 0.15M Britton-Robinson buffer (pH 3.0) at 40°C for 15min, and reacted at 40°C for 10min and it was diluted with water to 6.6 folds. Then, 200 μ l of the mixture added on 100 μ l of 0.5M Britton-Robinson buffer (each pH) and incubated at 37°C for 1 hour and its activity was assayed. The native enzyme was treated in the same conditions in the absence of oxidized soluble starch. ○, native enzyme ; ●, modified enzyme.

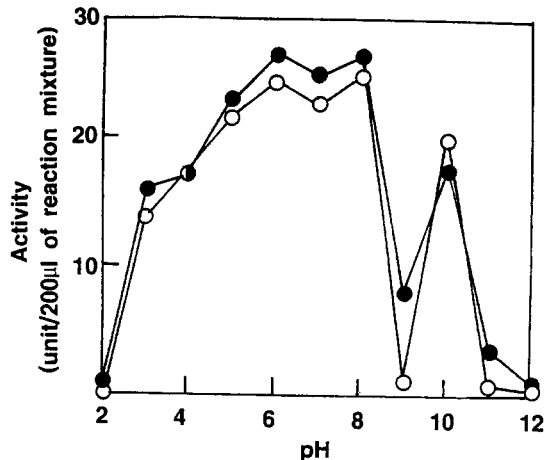


Fig. 5. pH stability of sweet potato β -amylase modified with IO_4 -oxidized soluble starch. The enzyme (30 unit) was reacted with 5% of oxidized soluble starch in 0.25ml of 0.15M Britton-Robinson buffer (pH 5.0) at 40°C for 15min. And 7 μ l of 50% $NaBH_4$ was added on the mixture, and reacted at 40°C for 10min and it was diluted with water to 6.6 folds. Then, 100 μ l of the mixture added on 50 μ l of 0.5M Britton-Robinson buffer (each pH) and incubated at 37°C for 3 hour and its activity was assayed. The native enzyme was treated in the same conditions in the absence of oxidized soluble starch. ○, native enzyme ; ●, modified enzyme.

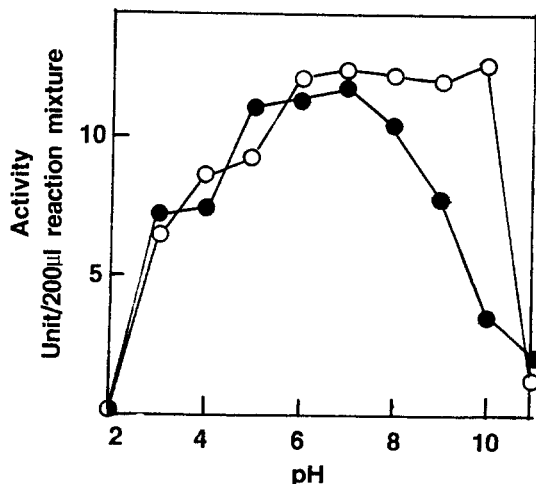


Fig. 4. pH stability of sweet potato β -amylase modified with IO_4 -oxidized soluble starch at pH 5. Reaction conditions were the same as Fig. 3 except modified at pH 5. ○, native enzyme ; ●, modified enzyme.

4. 열 안정성

효소를 IO_4 -산화 전분으로 변형한 다음 $NaBH_4$ 농

도별로 환원시켜서 열안정성을 측정한 결과는 Fig. 6 과 같이 농도에 따른 차이는 크지 않았으나 4% $NaBH_4$ 로 환원한 경우의 안정성이 가장 높았으며, 60°C에서의 차이가 가장 컸다(Fig. 6). 그래서 변형 효소를 $NaBH_4$ 4%로 환원시켜서 60°C에서 시간 경과에 따른 안정성을 측정한 결과 변형, 비변형 효소 모두 5분에 급격히 실활되지만 변형효소는 15분까지 비변형 효소보다 안정성이 높았다.

5. α -Cyclodextrin의 pH 안정성에 대한 작용

보리 β -아밀라아제를 IO_4 -산화전분으로 변형한 결과 산성 및 알칼리성의 넓은 범위에 걸쳐서 pH 안정성이 증가하였고, α -cyclodextrin은 안정성을 더 증가시켰다. 이 결과는 α -cyclodextrin은 고구마 β -아밀라아제의 안정성만을 증가시키는 것이 아니고 α -cyclodextrin을 저해제로 하는 아밀라아제는 모두 안정화시킬 수 있는 결과를 나타내고 있다(Fig. 8).

고 찰

이상과 같이 IO_4 -산화전분은 고구마 β -아밀라아제

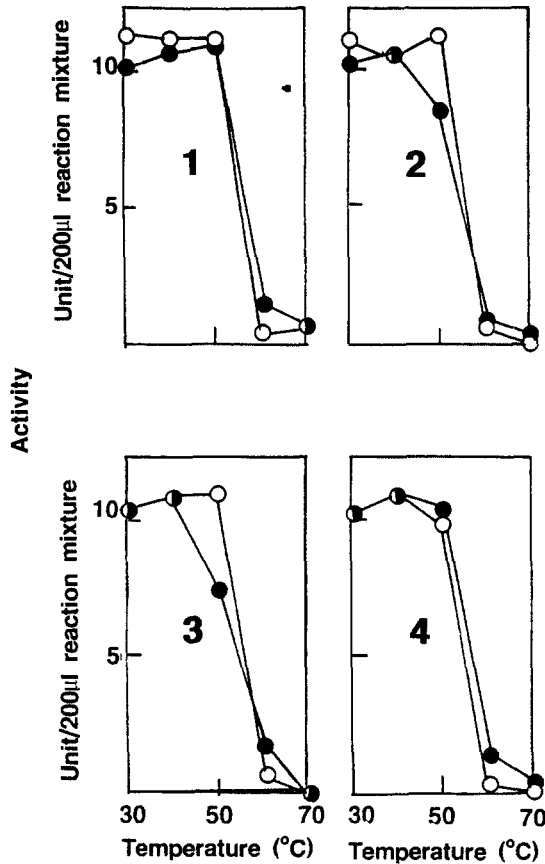


Fig. 6. Thermal stability of sweet potato β-amylase modified with IO₄-oxidized soluble starch. The enzyme (30 unit) was reacted with 5% of oxidized soluble starch in 0.25ml of 0.15M Britton-Robinson buffer (pH 5.0) at 40°C for 15min. And each % of NaBH₄ was added on the mixture and reacted at 40°C for 15min and the mixture was diluted with 0.2M phosphate buffer (pH 6.8) to 10 folds. Then, 200μl of the mixture incubated at each temperature for 30min and its activity was assayed. The native enzyme was treated in the same conditions in the absence of oxidized soluble starch : NaBH₄ ; 1, 1.4% ; 2, 0.45% ; 3, 0% ; 4, 4% ; ○, native enzyme ; ●, modified enzyme.

의 안정성을 증가시켰다. 전보^{5~10)}에서는 활성을 갖는 모노머를 얻기 위하여 pH 9.7에서 반응시켰으나 본 연구에서는 안정성 증가를 위하여 pH 3 및 5에서 반응시킨 점이 다르다. 현재까지 IO₄-산화전분은 이외에도 많은 아밀라아제와 단백질 가수분해효소를 안정화시키는 결과를 확인하였다. 이어지는 논문은 이에 대한 결과이다.

한편 고바야시 등은 본 연구자의 결과와 비슷한 방법으로 텍스트란을 산화시켜서 trypsin을 안정화시

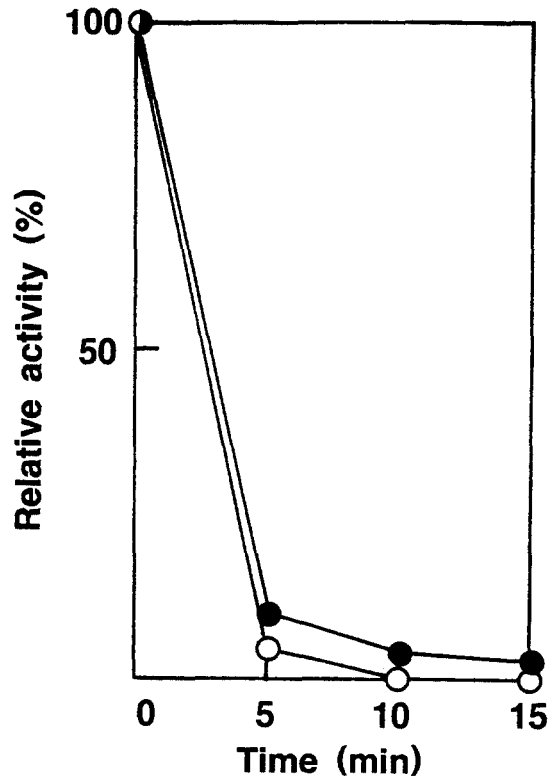


Fig. 7. Thermal stability of sweet potato β-amylase modified with IO₄-oxidized soluble starch. Reaction conditions were the same as Fig. 6 except reduction with 4% of NaBH₄ and incubation at 60°C for 30min, for heat stability. ○, native enzyme ; ●, modified enzyme.

킨 결과¹²⁾를 발표하였다.

요 약

고구마 β-아밀라아제를 NaIO₄-산화 가용성 전분으로 변형하여 안정성을 측정하였다. 그 결과, 최적 안정 pH는 3 및 4를 나타냈고, pH 3, 5~9, 11에서 비변형 효소보다 높은 안정성을 나타냈다. 60°C에서 15분동안 변형효소는 비변형 효소보다 안정성이 증가하였다. 변형 보리 β-아밀라아제는 전체 pH에 걸쳐서 넓은 pH 안정성을 나타냈고, α-cyclodextrin은 이를 더욱 증가시켰다.

감사의 글

본 연구는 한국학술진흥재단의 1996년도 대학교수 해외파견 사업에 따른 지원으로 大阪市立大學 理學部 生物學科에서 수행하였다. 이에 감사드린다.

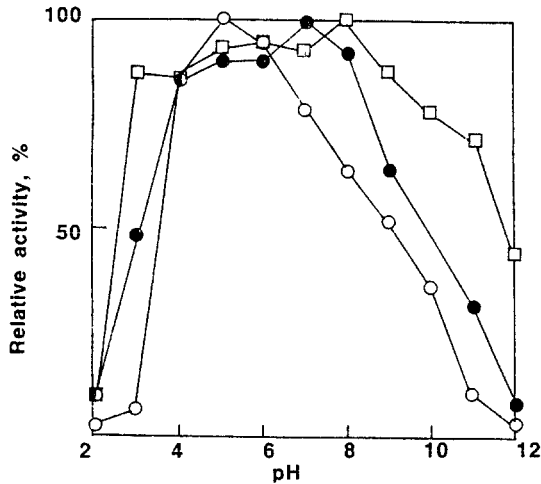


Fig. 8. pH stability of barley β -amylase modified with IO_4 -oxidized soluble starch.

The enzyme (300unit) was reacted with 2.4mg of oxidized soluble starch in 0.4ml of 0.25M Tris-HCl (pH 8.0) at 37°C for 10min. Then, 50 μl of the mixture was added on 0.95ml of 0.1M Britton-Robinson buffer (each pH) and incubated at 37°C for 2 hour and the mixture diluted with 0.1M acetate buffer (pH 5.5) to 100 folds and its activity was assayed. The native enzyme was treated in the same conditions in the absence of oxidized soluble starch. \circ , native enzyme ; \bullet , modified enzyme ; \square , modified enzyme in the presence of α -cyclodextrin.

참고문헌

1. 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).
2. Weintraub, B. D., Hamilton, D. A., Hensahw, C. and Chase, A. M. : An analysis of the inhibition of β -amylase by urea, *Arc. Biochem. Biophys.*, 107, 224-238 (1964).

3. Takeda, Y., Hizukuri, S. and Shimada, J. : Structural change of sweet potato β -amylase by sodium dodecyl sulfate, *Nippon Nogeikagakuishi*, 7, 367-371 (1972).
4. Bernfeld, P., Berkeley, B. J. and Bieber, R. E. : Reversible dissociation of enzymes of high dilutions and their inhibition by polyanions, *Arc. Biochem. Biophys.*, 111, 31-38 (1965).
5. 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, 3109-3110 (1989).
6. 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.*, 54, 769-774 (1990).
7. Ann, Y. G., Iizuka, M., Minamiura, N. and Yamamoto, T. : Active monomer of sweet potato β -amylase : Stabilization and an improved preparation method using α -cyclodextrin, *J. Ferment. Bioeng.*, 70, 75-79 (1990).
8. Minamiura, N., Ann, Y. G., Adachi, T., Ito, K., Iizuka, M. and Yamamoto, T. : Function of subunit structure of sweet potato β -amylase, *Microbial Utilization of Renewable Resources*, 7, 18-24 (1990).
9. 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, 153-157 (1991).
10. 南浦能至, 安龍根, 伊藤和央, 飯塚勝 : 糖修飾による酵素蛋白の安定性附與 - 甘藷 β -アミラーゼの活性單量體の調製-, 農林水産先端技術産業振興センターマテリアルイノベーション事業部會編, 食品化學新聞社, p. 69-84 (1997).
11. Nelson, N. : A photometric adaption of the Somogyi method for determination of glucose, *J. Biol. Chem.*, 153, 375-379 (1944).
12. Kobayashi, M. and Takatsu, Koichiro, K. : Cross-linked stabilization of trypsin with dextran-dialdehyde, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 275-278 (1994).

(1998년 1월 26일 접수)