

용매 증발에 의한 유기용매내 Horseradish peroxidase의 재생

최 유 성 · †유 영 제

서울대학교 공과대학 응용화학부
(접수 : 1999. 6. 4., 게재승인 : 1999. 8. 14.)

Reactivation of Horseradish Peroxidase in Organic Media Using Solvent Evaporation

Yoo Seong Choi and Young Je Yoo†

School of Chemical Engineering, Seoul National University, Seoul, 151-742 Korea

(Received : 1999. 6. 4., Accepted : 1999. 8. 14.)

Horseradish peroxidase(HRP) in organic solvent can be reactivated by evaporation. In order to measure the evaporation effect, the enzyme solutions were obtained by evaporation and dilution of organic solvent, respectively. Although two situations were thermodynamically identical, the activity from evaporation was higher than that from dilution. From the UV absorbance and the fluorescence intensity measurements, it can be explained that reactivation of enzyme activity might be caused by reversible folding, and the enzyme obtained by evaporation was more refolded than that obtained by dilution.

Key Words : horseradish peroxidase, reactivation, evaporation, organic solvent, enzyme

서 론

효소반응은 기질특이성이 매우 뛰어나고, 상온에서도 매우 높은 활성을 가지고 있는 장점이 있지만, 유기용매에서는 상대적 인 안정성이 떨어지고, 값이 비싸다는 단점이 있으므로 효소의 안정성을 높이는 방안과 효소 재생에 대한 연구는 의미가 있다. 특히, 효소를 산업적으로 적용하기 위한 측면에서 볼 때, 이는 더욱 중요하다. 유기용매 효소반응에서 water-immiscible solvent의 경우, 비수계 효소반응을 수행할 때 용매가 효소의 활성에 별로 영향을 주지 않는 것으로 알려져 있으며, 효소의 회수는 단순히 물의 첨가에 의한 추출을 통해 가능하다(1). 하지만 water-miscible solvent를 사용하는 water/cosolvent mixture 효소반응 시스템에서는 추출에 의한 회수는 용이하지 않다. 또한, water-miscible organic solvent는 효소의 비활성화에 많은 영향을 끼치므로(1-4), water/cosolvent mixture 효소반응 시스템에서 효소의 회수는 단순히 효소를 회수하는 것 이외에 비활성화된 효소를 다시 활성화시키는 방법을 고려하여야 한다.

한편, 효소의 구조 분석에 대한 연구는 UV-spectrophotometer, spectro-fluorophotometer, Circular Dichroism, NMR 등의 방법으로 수행되어 왔다(5-8). 이러한 방법들을 통해 직접적인 효소의 구조에 대한 자료를 얻지 못하지만, 간접적으로 그

구조의 변화를 예측할 수 있다. 특히, HRP의 구조가 유기용매에 의해 어떻게 변하는지에 대한 연구는, HRP에 존재하는 tryptophan residue의 emission 파장을 측정하여 수행되어진다(8). 구체적으로 tryptophan을 갖는 단백질이 unfolding 될 때는 emission 파장이 이동하며, 동시에 intensity도 변화하므로(6) 이 변화되는 정도를 측정하여 unfolding의 정도를 측정할 수 있다.

본 연구에서는 효소 재생의 한 방법으로 water/cosolvent mixture system에서 사용되는 대부분의 용매가 물보다 상대적 휘발도가 매우 높다는 점에 착안하여(9), vacuum evaporation을 통해 유기용매를 제거하여 효소를 재생하고, 그 때의 활성변화와 evaporation효과에 대해 알아보았다. 또한 형광분석법(UV wavelength scan, fluorescence intensity 측정)을 통해 간접적으로 효소의 구조를 분석하였다.

재료 및 방법

실험 재료 및 장치

Horseradish peroxidase(HRP, EC 1.11.1.7)와 pyrogallol은 Sigma-Aldrich에서 구입하였고, 유기용매인 tetrahydrofuran, acetonitrile, acetone과, sodium dihydrogen phosphate, disodium hydrogenphosphate, 그리고 H₂O₂(30%)는 Junsei Chemical Co. (Japan)의 것을 사용하였다. 한편 실험장치로 UV-spectrophotometer(UVIKON-930, Tegi-menta, (Switzerland)), vacuum evaporator(EYEL4, Tokyo Rikakikai Co.), spectro-fluorophotometer (RF-5000, Shimadzu)를 이용하였다.

† Corresponding Author : School of Chemical Engineering, Seoul National University, Seoul, 151-742, Korea
Tel : 02-891-1659, Fax : 02-888-7295
e-mail : jyoo@su.ac.kr

HRP의 활성 측정

HRP의 활성 측정은 pyrogallol과 H₂O₂를 기질로 한 HRP assay법을 통해 수행되었다(10). 반응은 25°C, pH=7(0.1 M, sodium phosphate buffer)에서 이루어졌고, 이때 UV-spectrophotometer을 이용하여 λ_{max} = 420 nm에서 purfurogallin의 생성된 정도로 효소의 활성을 결정하였다. 구체적인 분석방법은 light path 1 cm cell에 0.5%(w/w) H₂O₂ 0.16 mL, 5.0%(w/v) pyrogallol solution 0.32 mL, 0.1 g/L의 HRP 용액 0.1 mL과 buffer solution 2.42 mL을 넣어 반응을 수행하였고, 1초 간격으로 흡광도의 변화를 측정하였다. 한편, 희석 실험에서는 효소의 농도를 맞추기 위해 희석된 효소 용액 2.52 mL을 넣어 효소의 활성을 측정하였다.

증발과 희석에 의한 water-miscible organic solvent의 제거와 효소 활성 측정

50% 유기용매(model solvents : acetone, acetonitrile, THF) 효소 용액 0.05 g/L를 준비하고 일정시간 간격으로 10 mL의 시료를 취하여 25°C에서 vacuum evaporation을 한 후, 다시 증류수를 첨가하여 용매가 거의 제거된 용액을 얻은 후 효소의 활성을 측정하였다. 동시에 50% 유기용매 효소 용액에서 0.5 mL의 시료를 취한 후 buffer를 넣어 희석하였다. 그리고 증발에 걸리는 시간 동안 희석한 효소용액을 25°C, 150 rpm의 항온조에 넣어둔 후 효소의 활성을 측정하였다.

한편 증발과 희석의 차이를 더 알아보기 위하여 각각 얻은 시료를 하루 동안 항온조에 보관한 뒤, 다시 효소의 활성을 측정하였다. 그리고 증발에 의해 재생된 효소의 유기용매에서 상대적 안정성을 측정하여 - 모든 동일한 조건에서 시간에 따른 효소의 활성 측정 - 재생처리하지 않은 효소의 상대적 안정성과 비교하였다.

UV-spectrophotometer를 통한 wavelength scan 및 fluorescence intensity 측정

시간에 따른 효소의 구조적 변형에 대한 간접적 확인 방법으로 UV-spectrophotometer와 spectrofluorophotometer를 사용하였다. UV wavelength scan은 190 nm에서 500 nm까지 수행하였으며, fluorescence intensity 측정은 295 nm에서 excitation시킨 뒤 300~500 nm에서의 emission되는 정도를 보았다.

H₂O₂첨가에 의한 효소의 불활성 및 효소의 재생

효소의 활성 측정방법은 위와 동일하고, 단지 유기용매를 첨가하지 않고 효소에 과산화수소 0.5%(w/w)와 효소 용액을 1:15의 비율로 준비하여, 시간에 따른 효소의 활성을 측정하였다. 그리고 활성이 떨어진 효소를 증발 처리하여 다시 활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

증발과 희석에 의한 HRP의 재생

Water-miscible solvent 모델로 50% 유기용매에서의 HRP 시스템을 적용하였다. water miscible solvent는, 상대적으로 효소의 활성에 크게 영향을 주지 않고 20% 내에서는 오히려 효소의 안정성을 증가시키는 것으로 알려져 있는 acetone(11), 상대

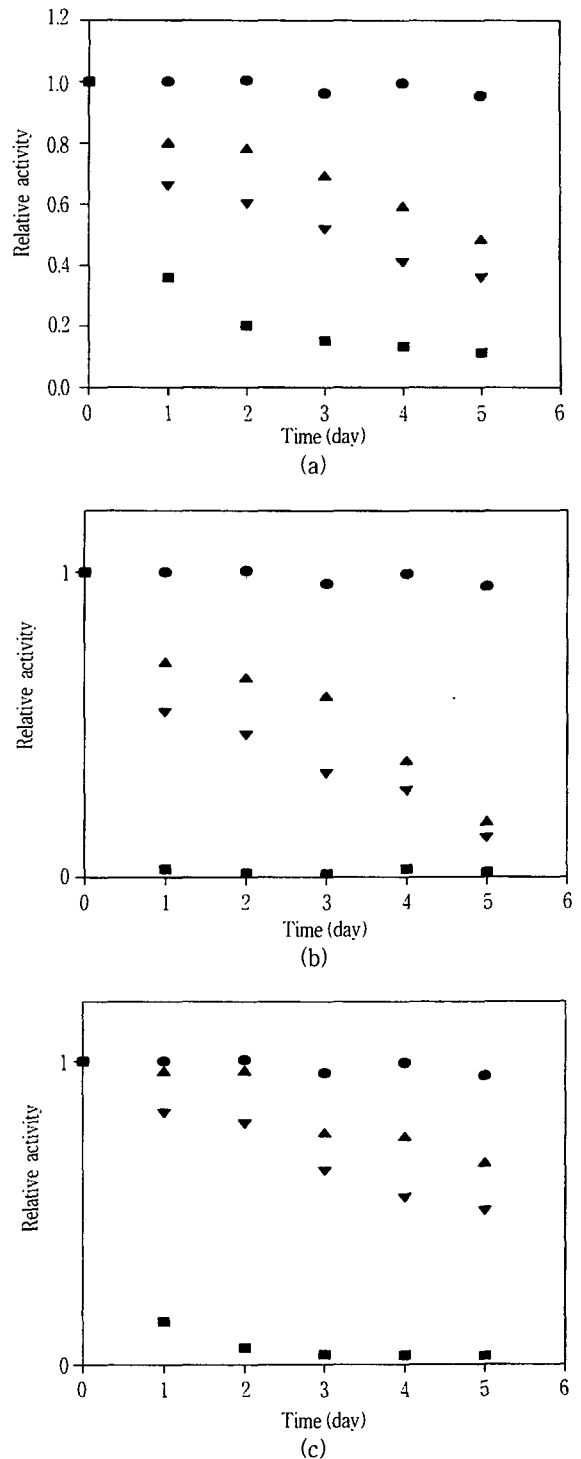


Figure 1. Activity profiles of Horseradish peroxidase after evaporation and dilution. (a) in 50% acetone-water system (● : HRP activity in water, ■ : HRP activity in 50% acetone-water, ▲ : HRP activity after evaporation, ▼ : HRP activity after dilution) (b) in 50% THF-water system (● : HRP activity in water, ■ : HRP activity in 50% THF-water, ▲ : HRP activity after evaporation, ▼ : HRP activity after dilution) (c) in 50% acetonitrile-water system (● : HRP activity in water, ■ : HRP activity in 50% acetonitrile-water, ▲ : HRP activity after evaporation, ▼ : HRP activity after dilution).

적으로 효소의 활성저하가 빨리 이루어지는 tetrahydrofuran, 그리고 많이 사용되는 대표적 용매인 acetonitrile을 모델로 선정하였다. Figure 1은 매일 시료를 취했을 때, 수용액에서의 효소활성, 50% 유기용매에서의 효소 활성과, 각 시료에 대해 증발과 회석에 의해 유기용매를 제거했을 때의 효소 활성을 나타내었다. Figure 1에서 보듯이 5일 동안 수용액에서 HRP의 활성은 일정하게 유지되고 있으나, 나머지 세 경우 모두 이틀정도 지났을 경우 용매 내에서의 효소활성은 거의 모두 떨어졌음을 알 수 있다. 그리고, 증발과 회석을 하였을 때 모두, 효소의 활성이 sample을 취했을 때마다 다르지만, 전체적으로 회복되는 경향을 볼 수 있었다. 하지만 증발처리를 한 경우 효소의 활성이 회석에 의한 방법보다 상대적으로 더욱 높게 나타났다. 두 경우 열역학적으로 같은 상황, 즉 동일한 상태의 용액을 얻었음에도 불구하고, 재생된 효소의 활성이 용매를 증발해서 재생하였을 때 더욱 높게 나타난 것으로 보아, 용매를 증발시키는 것 자체에 효소의 재생 효과가 있는 것으로 추측된다.

효소의 reactivation을 속도론적 측면으로 보았을 때, 위의 두 경우가 아직 열역학적 평형에 도달하지 못하여 활성이 차이가 발생할 수 있으므로 이에 대한 확인실험을 수행하였다. 즉, 증발과 회석에 의해 얻은 용액을 하루동안 25°C, 150 rpm의 항온조에 보관한 후 그때의 활성의 변화를 다시 측정하였다. Figure 2를 보았을 때, 두 경우 모두 초기(약 25분 정도 경과후)에 활성을 측정했을 때와 하루정도 두었다가 활성을 측정하였을 때 다소 활성의 차이는 보이지만, 전체적 경향을 볼 때, 증발이 회석보다는 더 높은 활성을 보임을 확인하였다. 따라서 증발이 효소 재생에 효과가 있음을 알 수 있었다. 한편, Figure 2를 볼 때, 하루 경과한 후 약간의 효소의 활성 증가는, Figure 1에서 실험을 수행하였을 때 아직 refolding이 완전히 이루어지지 않았기 때문으로 해석된다.

형광분석법을 이용한 효소 구조 변화 고찰

증발의 효과를 자세히 알아보기 위해 유기용매에서 효소의 구조 변화를 간접적으로 조사하였다. Acetone과 THF의 경우 fluorescence intensity를 측정할 때, 용매가 fluorescence intensity에 영향을 주어 acetonitrile에 대하여만 실험을 수행하였다. Figure 3은 UV spectrophotometer를 통하여 유기용매 효소용액과, 증발에 의해 얻어진 효소용액을 wavelength scan한 것이다. 50% 유기용매에서 효소의 전반적인 UV 흡광도를 보면 Figure 3-(a)에서와 같이, 3시간 이후부터 효소의 흡광도가 수용액에 존재하는 효소의 흡광도와 250~350 nm 사이에서 많은 차이를 보이고 있으며, 3시간 이후 유기용매 용액에서 효소의 UV 흡광도는 250~350 nm의 범위에서 올라가고 있지만 많은 차이는 보이지 않고 있다. 이를 통해 용매에 의해 효소가 구조적 변화되었음을 확인하였다. 하지만 증발에 의해 효소를 재생한 후 효소의 흡광도를 측정된 결과 Figure 3-(b)를 보면, 마찬가지로 시간에 따라 흡광도가 250~350 nm 사이에서 서서히 올라가는 경향을 보이지만 10시간 이전의 결과들은 수용액에서의 효소의 흡광도와 거의 차이를 보이지 않고 있으며, 그 이후의 결과도 전반적인 흡광도는 큰 차이를 보이지 않았다. 이를 통해 볼 때, 증발에 의해 효소가 원래의 접혀진 구조로 돌아오고 있음을 추론할 수 있었다. 이중 특히, 10 hr 이전의 경우에는 UV 흡광도가 수용액의 흡광도와 거의 흡사하여 초기의 효소 구

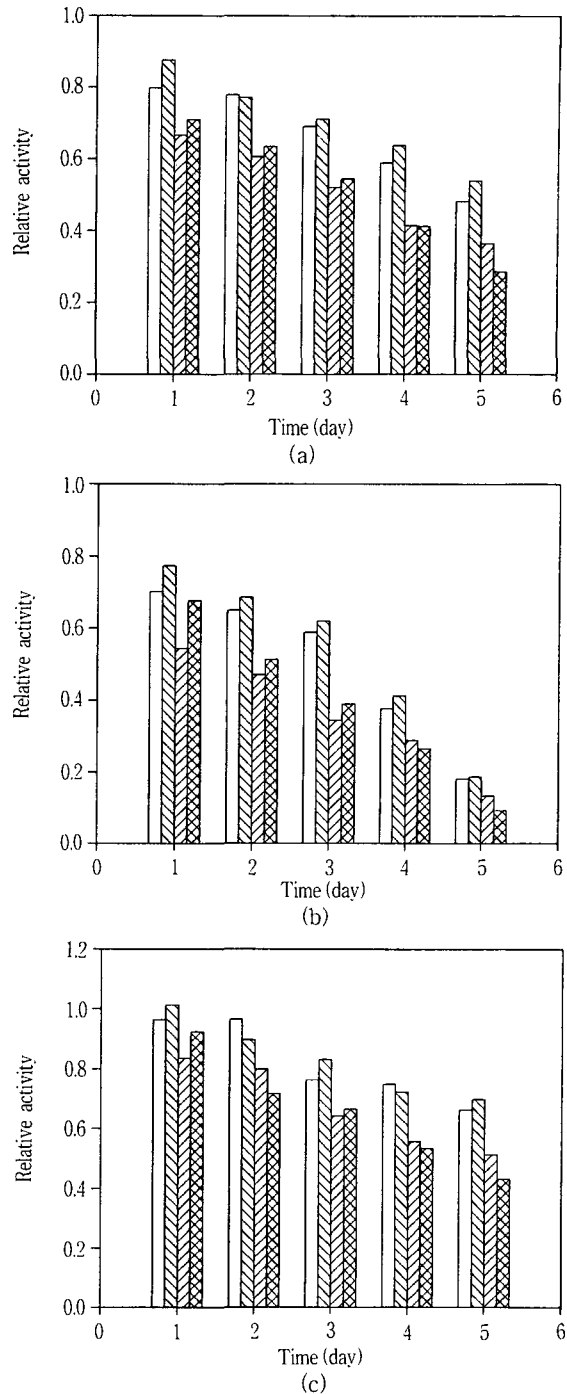


Figure 2. Activity profiles of Horseradish peroxidase after evaporation and dilution in 25 minutes and 1 day. (a) in 50% acetone-water system (b) in 50% THF-water system (c) in 50% acetonitrile-water system (□ : 25minutes after evaporation, ▨ : 1day after evaporation, ▩ : 25minutes after dilution, ▤ : 1day after dilution).

조로 거의 모두 돌아왔음을 유추할 수 있었다.

한편, spectrofluorophotometer를 이용하여 증발과 회석을 통해 얻은 효소의 구조를 간접적으로 분석하였다. 증발에 의해 효소를 재생하였을 때의 fluorescence 세기의 변화는 Figure 4-(a)에 나타내었고 회석에 의한 fluorescence 세기의 변화는

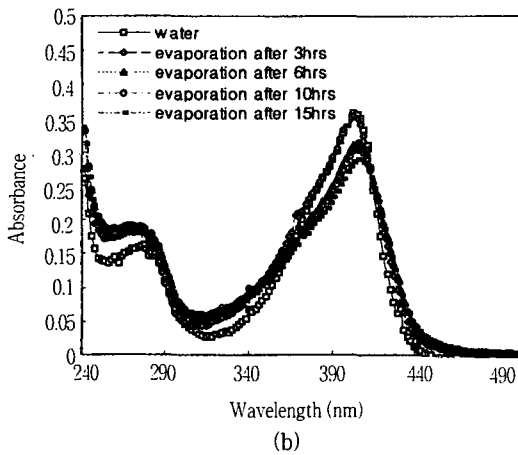
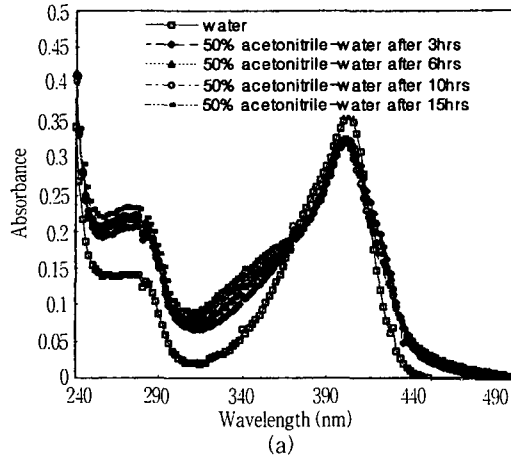


Figure 3. UV wavelength scans of HRP. (a) in 50% acetonitrile-water system (b) after evaporation.

Figure 4-(b)에 나타내었다. 시간에 따른 fluorescence 세기의 변화가, 증발에 의한 경우 회석에 의한 경우보다 변화정도가 적은 점을 바탕으로, 동일 조건에서 증발에 의해 효소를 재생하였을 때가 회석에 의해 효소를 재생하였을 때보다 구조적 변형이 적은 것을 알 수 있었다. 이는 효소의 활성이 증발의 경우가 회석에 의한 경우보다 높게 나온 실험 결과와도 일치한다. 다시 표현하면, 열역학적으로 동일한 상황이 되더라도 증발에 의한 효소 재생방법이, 효소의 구조적 변형이 적고, 활성이 더 높게 나온 것으로 보아 증발자체가 효소의 재생에 어떤 효과가 있음을 다시 확인할 수 있었다.

증발 효과에 대한 고찰

증발에 의한 효소 재생은 열역학적으로 볼 때, 용매의 양을 줄인다는 측면에서 회석에 의한 방법과 차이가 없지만, 앞의 결과들을 통해 회석과는 다른 효과가 있음을 알았다. 그래서 증발 효과에 대하여 고찰하였다. 효소의 비활성화를 공유결합적인 비활성화와 구조적인 비활성화로 구분할 때(12), 증발이 어떤 비활성화에 영향을 주는지 조사하였다. 모델로 H₂O₂에 의한 효소 비활성화를 생각하였다. H₂O₂는 O·, O₂⁻를 형성하여 Cys, Met, His, Trp 등의 아미노산과 반응하여 효소를 공유결합적으로 비활성화시키므로, H₂O₂에 의해 효소를 공유결합적으로 비활성화시킨 뒤 증발처리를 하였다. 그 결과 Table 1에서 보듯이 효소

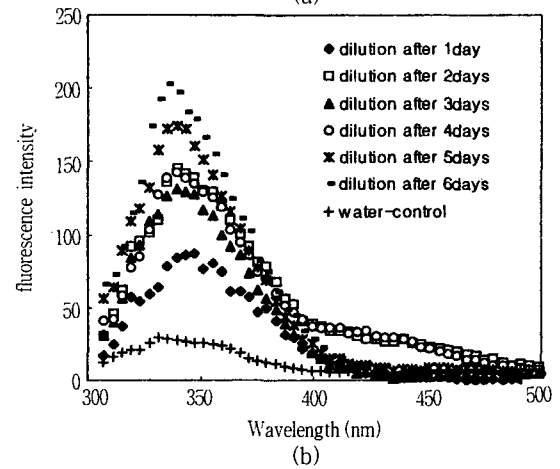
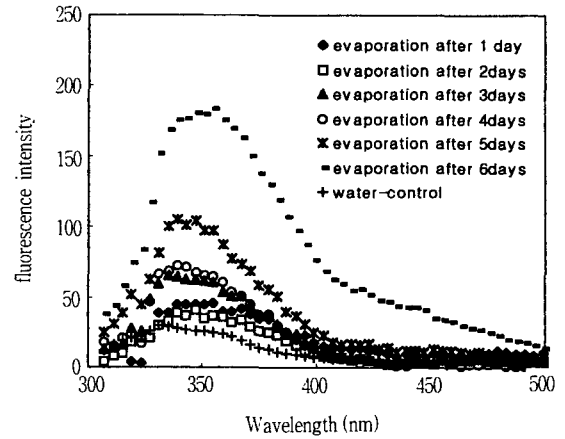


Figure 4. Fluorescence intensity of HRP. (a) after evaporation (b) after dilution.

Table 1. Effect of evaporation on HRP stability in H₂O₂ solution.

	Relative enzyme activity after 7hours
Enzyme solution before evaporation	1.3%
Enzyme solution after evaporation	1.2%

의 활성은 전혀 올라가지 않은 점을 볼 때, evaporation은 효소의 공유적인 비활성에 영향을 주는 것이 아니라 구조적인 비활성을 활성화시키는데 영향을 끼치는 것으로 짐작된다. 그리고, 비수계 효소반응에서 sonication에 의해 효소의 활성이 증가하였다는 보고(13)를 참고할 때, 구체적으로 증발이 unfolding된 효소를 refolding할 경우, 감압에 의한 용매 증발에 의해, aggregation되어 있는 효소를 풀어줄 것으로 생각되고, 이러한 상황에서 더 많은 효소 분자들이 다시 원래의 구조로 돌아갈 것으로 추측된다.

한편, evaporation에 의해서 재생된 효소에 대한 유기용매 내에서의 반응성은 효소를 재생해서 다시 사용할 경우 공정의 제

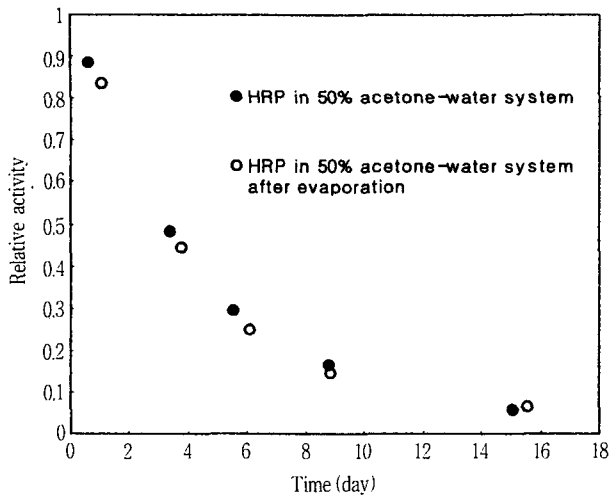


Figure 5. Activity profiles of HRP (purchased HRP vs. reactivated HRP)

어 측면에서 중요한 자료가 된다. 따라서 재생된 효소의 유기용매 내에서의 상대적 안정성을 측정하였다. Figure 5을 통해 볼 때, 재생된 효소의 반응성은 처음 사용하는 효소의 반응 경향과 동일함을 알 수 있었다.

요 약

Water/cosolvent mixture system에 사용된 활성을 잃은 효소를 증발을 통해 재생하였다. model system으로 HRP를 이용하였을 때, 활성을 잃은 효소를 증발과 회석을 통해 용매를 제거하였을 경우, 두 경우 모두 열역학적으로 동일한 상황임에도 불구하고 증발에 의해 재생된 효소의 활성이 더 높게 나타났으며, 이는 증발이 활성을 잃은 효소의 재생에 어떤 영향을 주는 것으로 여겨진다. 형광분석법을 이용하여 효소의 구조를 간접적으로 분석하였을 때, 증발에 의한 경우가 회석에 의한 경우보다 효소의 구조적 변형이 적었음이 관찰되었다. 이러한 결과들을 통해 증발에 의한 재생 효과는 구조적으로 비활성화된 효소의 활성을 일부 되살리는 기능을 하는 것으로 여겨진다. 한편 용매의 증발에 의해 재생된 효소는 초기 효소의, 유기용매 내에서의 상대적 안정성을 유지하였다.

참 고 문 헌

1. Yang, Z and Russel, A. J. (1996), Fundamentals of Non-aqueous Enzymology, Enzymatic Reaction in

Organic Media, Koskinen, A. M. P. and Klivanov, A. M. ed., pp. 43-69, Blackie Academic & Professional.

2. Laane, C., Boeren, S., Vos, K. and Veeger, C. (1987), Rules for Optimization of Biocatalysis in Organic Solvents, *Biotechnology & Bioengineering*, **30**, 81-87.

3. Gorman, L. A. S. and Dordick, J. S. (1992), Organic Solvents Strip Water off Enzymes, *Biotechnology & Bioengineering*, **39**, 392-397.

4. Carrea, G., Ottolina, G. and Riva, S. (1995), Role of Solvents in the Control of Enzyme Selectivity in Organic Media, *Trends in Biotechnology*, **13**, 63-70.

5. Kuwajima, K. (1995), Circular Dichroism, Protein Stability and Folding: Theory and Practice, Shirley, B.A. ed., pp. 115-135, Humana Press.

6. Schmid, F. X. (1989), Optical Spectroscopy to Characterize Protein Conformation and Conformational Changes, Protein Structure-a Practical Approach, Creighton, T. E. ed., pp. 261-296, IRL Press at Oxford University.

7. Baker, E. N. (1995), Solvent Interactions with Proteins as Revealed by X-ray Crystallographic Studies, Protein-Solvent Interaction, Gregory, R.B. ed., pp. 143-189, Marcel Dekker, Inc.

8. Ryu, K. and Dordick, J. S. (1992), How do organic solvents affect peroxidase structure and function?, *Biochemistry*, **31**, 2588-2598.

9. Perry, R. H. (1984), Perry's Chemical Engineers Handbook, 6th ed. p. 3-50, McGraw-Hill Book Company.

10. Joo, H., Yoo, Y. J., and Ryu, D. D. Y. (1996), A biosensor stabilized by polyethylene glycol for the monitoring of hydrogen peroxide in organic solvent media, *Enzyme Microbial Technology*, **19**, 50-56.

11. Schmid, R. D. (1979), Advances in Biochemical Engineering, T. K. Ghose, A. Fechter, and N. Blakebragh, eds., **12**, p. 41, Springer-Verlag, Berlin.

12. Fagain, C. O. (1995), Understanding and Increasing Protein Stability, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1252**, 1-14.

13. Vulfson, E. N., Sarney, D. B. and Law, B. A. (1991), Enhancement of subtilisin-catalysed interesterification in organic solvents by ultrasound irradiation, *Enzyme Microbial Technology*, **13**, 123-126.