

하이드록시아파타이트 표면에서의 플럭토즈 전이효소의 결합 특성

장기효[†] · 박영민¹

경희대학교 동서의학대학원

¹여주대학 치위생과

The Binding Properties of Fructosyltransferase on the Surface of Hydroxyapatite

Ki-Hyo Jang[†] and Young Min Park¹

Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

¹Department of Dental Hygiene, Yeojoo Institute of Technology(YIT) Kyo-ri 454-5, Yeojoo-up, Yeojoo-gun, Kyunggi-do 880-705, Korea

ABSTRACT The fructan-producing enzyme, fructosyltransferase (FTF), was immobilized on the surface of 4 different hydroxyapatites by simple incubation. Among the resins, the Type I (20 μm) hydroxyapatite gave the highest yield in terms of immobilization yield and enzyme activity. The fructan synthesis activity of the immobilized FTF was similar with that of the free enzyme, and were about 70-80% on fructose basis with substrate at 100~200 g/L. The binding time between the hydroxyapatite and FTF was terminated within 2 h, and the binding capacity of the Type I (20 μm) hydroxyapatite was above 60 U of FTF/g of the resin. By immobilization, the FTF stability against proteolysis, was greatly improved by approximately 3-4 fold. Thus, the present study demonstrated that immobilization of FTF on the surface of the hydroxyapatite occurs in simple reaction and the binding strength is strong enough to produce the fructan.

Key words Fructan, Hydroxyapatite, Fructosyltransferase, Dental biofilm

서 론

치면세균막은 치아우식증과 치주질환을 유발하는 주요 인자로 알려져 있다¹⁾. 치면세균막은 미생물, 단백질, 다당류 등의 복합체의 형태로 법랑질과 상아질의 표면에 단단한 구조를 형성한다^{2,3)}. 한편, 플럭토즈 전이효소(fructosyltransferase, FTF)는 다양한 구강미생물에서 생성되며 생성된 효소는 균체밖으로 분비되어 구강내에서는 주로 프라그와 결합한 형태로 존재하는 것으로 알려져 있다⁴⁾. 구강내에서 FTF는 음식에 존재하는 자당을 분해하여 플라탄과 글루코즈를 생성한다. 이때 생성되는 플라탄은 구강미생물의 에너지원으로 작용하거나 또는 이들 미생물이 치아의 표면에 부착할 수 있도록 도와주는 작용을 한다⁵⁻⁸⁾. FTF는 타액내에서 유리된 형태로 작용하는 것은 미비한 반면, 치아의 표면에 결합된 형태로 구강의 건강에 영향을 미치는 것이 큰 것으로 인식된다⁸⁾. 최근의 연구 결과에 의하면 치아에 결합된 효소는 구강내에 존재하는 효소와 특성이 매우 다른 특성을 나타낸다⁹⁾. 예를들면, *Streptococcus mutans*에서

생성된 글루칸 생성효소(glucosyltransferase, GTF)는, 용액상에서 존재할 때와 hydroxyapatite의 표면에 결합하는 경우에 효소작용으로 생성되는 글루칸을 형성하는 포도당과 포도당의 결합이 달라진다⁹⁾.

최근, GTF와 FTF의 DNA 및 단백질 수준에서의 연구 결과에 의하면 두 효소간에서의 매우 유사한 특성 즉, 기질에 대한 특이성, 효소의 반응부위의 아미노산의 구성, DNA 염기의 높은 homology 등이 알려지고 있다¹⁰⁻¹¹⁾. *Bacillus subtilis*에서 유래된 FTF를 hydroxyapatite에 결합시키면 효소의 반응속도가 변화하고 생성된 플라탄의 분자량이 감소되어 물성이 달라지는 것으로 보고되었다¹²⁾. *S. mutans*의 FTF는 hydroxyapatite에 결합되면 FTF-FTF의 결합된 형태로 존재하며, 생성되는 플라탄의 성질도 변화되는 것이 알려지고 있다. 또한 구강질환을 유발하는 여러 구강 미생물에서(*Streptococcus sorbinus*, *S. mutans*, *S. gordonii*, *Actinomyces viscosus*) FTF의 생성이 알려져 있으나, GTF에 비하여 FTF에 대한 연구보고는 상대적으로 낮은 실정이다¹³⁻¹⁴⁾. 본 연구에서는, FTF가 구강에서 치아에 미치는 영향을 조사하기 위해 hydroxyapatite를 모델시스템으로 이용하여 FTF의 결합력에 미치는 인자들에 대한 특성을 비교함으로써, 구강내에서의 FTF와 치아와의 상관관계를 규명하였다.

[†]Corresponding author

Tel: 02-961-0506

Fax: 02-961-9214

E-mail: kihyojang@hotmail.com

재료 및 방법

1. 재료

효소결합실험에 사용한 4가지의 hydroxyapatite는 Bio-Rad 사 제품을 사용하였으며, 이 중에서 단백질 결합력이 뛰어난 특성을 갖는 Type I으로는 20 μm (Cat. No. 157-0021), 80 μm (Cat. No. 157-0041)의 레진을, 상대적으로 단백질 결합력이 낮은 Type II에는 20 μm (Cat. No. 158-2200)와 80 μm (Cat. No. 158-8200)의 레진을 사용하였다. 한편, FTF는 *Zymomonas mobilis* 유래의 효소를 사용하였다¹⁵⁾.

2. FTF-hydroxyapatite 결합실험

분리정제된 FTF (2 U, 5 mg/ml)와 100 mg hydroxyapatite를 50 mM 인산완충용액 (pH 6)에 혼합한 후 4°C에서 90분 동안 천천히 반응시켰다. 반응 후, 반응액을 원심분리(8,000 rpm, 10분, 4°C)하여, 상등액(결합이 안되었거나 느슨하게 결합된 효소)과 침전물(hydroxyapatite에 결합된 FTF)로 분리하였으며, 침전물에 다시 동량의 완충용액을 가한 후, 재차 원심분리하여 상등액과 침전물을 분리하였다. 동일 방법을 3차례 반복하여, 최종적으로 얻은 침전물을 hydroxyapatite에 결합한 FTF로 사용하였다.

3. FTF-hydroxyapatite 결합체의 효소활성조사

100 mg의 FTF-hydroxyapatite 결합체를 10% 자당용액-50 mM potassium phosphate buffer (pH 6) 1 ml과 혼합후 2-4시간 반응시켰다. HPLC를 사용하여 반응물(포도당, 과당, 폴리락토 올리고당, 플라ktan)의 생성량을 정량분석하거나¹⁶⁾, 자당의 효소적 분해로 생성되는 포도당의 양을 정량분석하였다. 반응물 중의 플라ktan의 분자량은 GPC 칼럼을 장착한 HPLC를 사용하여 분석하였다¹⁶⁾.

4. FTF의 활성도 측정 및 단백질 정량법

FTF의 활성도 측정은 자당분해력과 플라ktan의 생성능으로 비교하였다. 효소의 활성도(U)는 분당 1 micromole의 포도당을 생성하는데 필요한 효소량으로 정의하였다. 단백질 함량 측정을 위하여, Bio-Rad사의 protein assay 키트를 사용하였다. 플라ktan의 정량분석을 위하여 반응액에 3배의 에탄올을 가하여 침전시킨 침전물에 1% 염산을 가하여 121°C에서 10분간 열처리하여 단당류로 분해하였다. 산기수분해물을 NaOH를 가하여 중화시킨후에 0.45 μm 여과막으로 여과하였다. 여액 20 μl 를 고속액체크로마토그래피(HPLC, Beckman, USA)에 주입하여 정량하였다¹⁶⁾. 과당, 포도당 등 각 표준당을 각 농도별로 20 μl loop에 주입하여 검출하였으며, 각 농도별 peak 면적을 이용하여 표준곡선을 작성하였다.

결과 및 고찰

1. 생성된 플라ktan의 물성적 특성

Hydroxyapatite-FTF를 10% 자당용액에 반응시켜서 얻어진 반응산물에 3배의 에탄올을 가하여 침전시켜서 회수한 플라ktan의 평균분자량은 3백만 달톤으로(data not shown), 완전 분해 시에는 과당과 극소량의 포도당으로만 이루어져 있었다. 플라

ktan의 점도는 온도가 증가함에 따라 감소하는 일반적인 다당류의 특성을 나타내었으며¹¹⁾, 플라ktan 농도 7% 이하에서는 수용액상으로 그리고 7% 이상에서는 겔 상태로 존재하였다¹⁶⁾. 따라서, 7% 이상의 플라ktan은 구강에서 쉽게 타액에 의한 정화작용으로 제거되지 않는 특성을 보이는 것으로 판단된다.

2. Hydroxyapatite-FTF 결합력 분석

본 실험에 사용한 hydroxyapatite는 표면의 특성이 다른 2가지, 그리고 각각 20 μm 와 80 μm 의 크기의 구형의 hydroxyapatite를 사용하였다. 본 실험에서 사용한 Type I은 다른 단백질에 대한 결합력이 높은 것으로 알려진 반면(>25 mg of lysozyme/g), Type II는 단백질결합력이 상대적으로 낮은 것으로 알려져 있다(>12.5 mg of lysozyme/g). 위의 4가지의 성질과 크기가 서로 다른 4가지 hydroxyapatite(10 mg)와 0.5 U의 FTF를 2 ml의 완충용액(pH6.0)에 혼합하였다. 360도 회전하는 장치를 이용하여, 혼합물을 포함한 tube를 90분간 천천히 회전시켜서 hydroxyapatite와 FTF의 결합을 유도한 후, 원심분리법으로 상등액과 침전물을 분리하여 각각 unbound FTF와 bound FTF로 사용하였다. 4가지의 hydroxyapatite와 FTF의 결합은 60-80%로 매우 높았으며, 특히 Type 1(20 μm)의 hydroxyapatite를 사용하였을 때 가장 높은 결합력을 보였다(Table 1). FTF의 hydroxyapatite에 대한 결합력을 분석하기 위하여 hydroxyapatite와 FTF를 반응시킨 후, 원심분리법을 통해 상등액을 취한 후 결합이 안된 효소의 양을 정량분석하였다. 이때 실험조건은 hydroxyapatite (10 mg)를 2 ml의 완충용액(pH6.0), 2 U의 FTF에 결합시킨 후에 90분간 천천히 반응시켰다(Fig. 1). 실험결과에 의하면, hydroxyapatite에 결합된 FTF 효소의 양은 Type I(20 μm)>Type II(20 μm)>Type I(80 μm)<Type II(80 μm) 순으로 높았다. 결합된 hydroxyapatite-FTF 복합체를 세척한 후에 원심분리하여 회수한 상등액과(1차 세척액), 침전물에 다시 동량의 완충용액을 가하여 세척하여 원심분리한 상등액(2차 세척액)으로부터 FTF 효소활성을 측정 한 결과 1차 세척액에서는 사용한 전체활성의 2.7-3.1%, 2차 세척액에서는 0.1% 이하의 효소활성을 각각 나타내었다. 따라서, 본 연구결과는 실험에 사용한 hydroxyapatite의 크기와 종류에 큰 차이없이 hydroxyapatite와 FTF 효소 사이의 결합이 매우 강하게 나타남을 보여주었다. 한편, 4가지의 hydroxyapatite 중에서 Type I(20 μm)이 FTF와 가장 높은 결합력을 보이는 것으로 나타났는데, 이는 작은 크기의 hydroxyapatite가 가장 높은 표면적을 제공하기 때문인 것으로 판단된다. Type 1/20 μm 의 hydroxyapatite에 결합할 수 있는 FTF의 양은 매우 높아서, 1 g hydroxyapatite에 결합할 수 있는 FTF는 60 U 이상이었으며(data not shown) 첨가된 효소와 hydroxyapatite의

Table 1. Effect of hydroxyapatite properties on the binding yields of the fructosyltransferase onto the hydroxyapatites

Hydroxyapatites	Activity added	Activity in washing	Activity immobilized	
			Theoretical	Actual
Type I(20 μm)	100	25.3	74.7	86.1
Type I(80 μm)	100	35.1	64.9	69.9
Type II(20 μm)	100	35.9	64.1	65.9
Type II(80 μm)	100	38.2	61.8	62.6

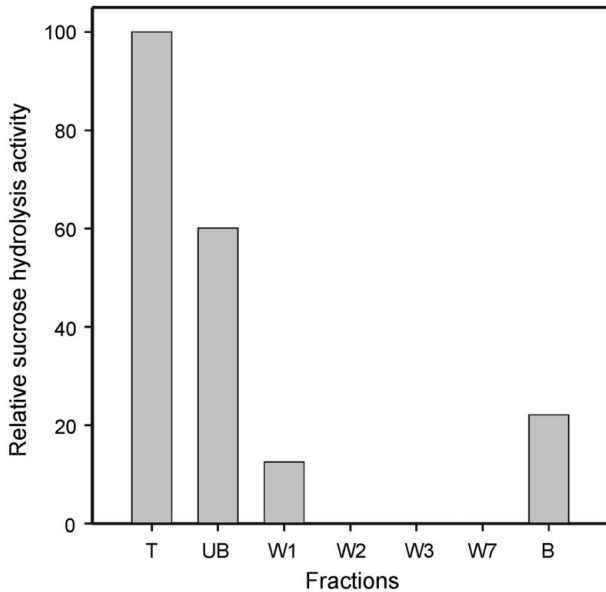


Fig. 1. Residual fructosyltransferase activity during immobilization and following washing procedures. Abbreviations: T, total activity; UB, unbound-; W1, W2, W3 and W7, 1st-, 2nd-, 3rd and 7th washing; B, bound fraction.

결합에 필요한 시간은 매우 짧아서 반응 후 30분에는 첨가된 효소의 40%, 2시간에는 90% 이상의 효소가 결합하였다(data not shown).

3. Hydroxyapatite-FTF 결합체의 플라کت산 생성능 분석

4가지 Hydroxyapatite에 0.5-2.0U의 FTF를 가하여 생성된 결합체를 이용하여 결합된 FTF의 효소활성을 측정하였다. 이때, hydroxyapatite가 제거된 효소를 대조실험군으로 이용하였다. 효소활성은 초기 효소활성 측정을 위하여 Qp 값(specific initial glucose production rate)을, 그리고 최종 효소활성 측정을 위하여 기질인 자당으로부터 포도당으로의 전환율(conversion efficiency)로 측정하였다. 대조군에서는 사용한 효소의 양이 0.5 U에서 2.0 U으로 증가할수록 Qp 값과 conversion efficiency는 증가하여, 2 U의 효소 사용시, Qp 값은 0.188, conversion efficiency는 95%를 나타내었다(Table 2). 한편 실험군에서는, Type I(20 μ m)의 hydroxyapatite를 사용시에 가장 높은 효소활성을 나타내었다. 1.5-2.0 U의 효소를 사용한 경우, 대조군에서 사용한 효소에 비해 약 70%의 효소활성을 보였다(Table 3). 본 실험결과에 선행연구자들에^{4,8)} 의하여 보고된 FTF가 hydroxyapatite의 표면에 결합하였다는 결과를 뒷받침하는 결과로 본 실험에서 확인된 FTF-hydroxyapatite의 효소활성이 FTF와 크게 다르지 않는 것은 hydroxyapatite의 특성상 FTF가 hydroxyapatite의 표면에 결합하는 것에서 기인한다.

4. Hydroxyapatite-FTF 결합체의 단백질분해효소에 대한 안정성

일반적으로 구강내에는 단백질 분해효소를 포함한 많은 소화 효소가 포함되어 있다. 단백질 분해효소에 의한 hydroxyapatite-FTF 결합체의 안정성을 비교하기 위하여 hydroxyapatite-FTF 결합체와 FTF를 각각 chemotrypsin, proteinase K 등의 단백질

Table 2. Effect of the enzyme concentration on the sucrose hydrolysis activity of fructosyltransferase bound to the hydroxyapatites

Amount of enzyme ¹	Qp/CE ²	Free enzyme	Immobilized enzyme with;			
			Type I (20 μ m)	Type I (80 μ m)	Type II (20 μ m)	Type II (80 μ m)
0.5U	Qp	0.074	0.042	0.04	0.04	0.04
	CE	85	71	43	43	51
1.0U	Qp	0.120	0.067	0.068	0.068	0.052
	CE	86	75	63	63	63
1.5U	Qp	0.175	0.133	0.123	0.123	0.083
	CE	90	84	81	81	79
2.0U	Qp	0.188	0.143	0.140	0.138	0.133
	CE	95	90	90	91	88

¹For immobilization, 0.5-2U of fructosyltransferase were added to the 10 mg of 4 hydroxyapatites.

²Qp; specific initial glucose production rate: g of glucose/(0.5 g of sucrose X hours). CE(conversion efficiency) were obtained from 22h incubation samples.

Table 3. Effect of proteases treatment on the relative activities of hydroxyapatite-fructosyltransferase and free fructosyltransferase

Incubation time (min)	Chemotrypsin		Proteinase K	
	FTF ¹	HA-FTF	FTF	HA-FTF
0	100 ²	100	100	100
10	70	91	64	85
30	20	74	11	65
50	0	55	0	36

The reaction mixture contained 1U of the enzyme and 10 μ g of each protease in 0.5 ml potassium phosphate buffer (pH6.0). Digestion was carried out at 37°C for up to 50 min, then the residual enzyme activity was determined.

¹Abbreviations: FTF, fructosyltransferase; HA-FTF, Hydroxyapatite Type I (20 μ m)-fructosyltransferase.

²The relative sucrose hydrolysis activity of fructosyltransferase was determined.

분해효소와 1시간 반응시킨 후에 남아 있는 효소활성을 측정한 결과, hydroxyapatite에 결합되지 않은 효소에서는 효소활성이 완전히 제거된 반면에 hydroxyapatite-FTF 결합체에서는 효소활성이 40-50% 정도 남아 있었다(Table 3). Hydroxyapatite에 결합된 FTF 나 GTF 효소의 활성과 특성(최적 pH, 최적온도) 변화에 대한 기존의 연구 결과에 따르면, 결합체의 형성은 기질에 대한 특이성을 변화시키거나 혹은 pH 변화에 대한 민감도를 감소시켜, 궁극적으로는 액상에서의 효소반응과 다른 결과를 나타낸다¹²⁾. 본 연구에서는, FTF가 hydroxyapatite에 결합시에 효소의 3차원적인 구조가 변형되어서 구강내의 단백질 분해효소의 공격에서도 활성을 나타내는 것으로 판단된다.

요 약

본 연구에서는 구강미생물에서 발견되는 FTF 효소의 hydroxyapatite에 대한 친화도와 상호간의 결합에 영향을 주는 요소들을 비교하였으며, hydroxyapatite에 결합된 FTF 효소의 효소활성은 매우 안정적으로 높은 효소활성을 보였다. 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. FTF는 치아를 대신하여 사용한 hydroxyapatite에 매우 빠르고 강하게 결합하였으며 이러한 결합은 hydroxyapatite의 표면상태와 표면적에 영향을 받는 것으로 나타났다.
2. Hydroxyapatite에 결합된 FTF는 높은 플라크 생성능을 보여, 비결합 FTF와 비교시, 약 70%의 효소활성을 나타내었다.
3. 결합된 FTF는 비결합 FTF와 비교시, 단백질분해효소의 분해작용에 대한 높은 저항성을 보여, hydroxyapatite에 결합된 효소에서는 3차원적인 구조적 변화가 나타나는 것으로 판단된다.

참고문헌

1. Steinberg D: Studying plaque biofilms on various dental surfaces, In, Handbook of Bacterial Adhesion: Principles, Methods, and Applications, An, Y.H. and Friedman, R.J. (eds) Humana Press, Totowa, N.J., pp. 353-370, 2000.
2. Listgarten MA: The structure of dental plaque. Periodontol 5: 52-65, 1994.
3. Marsh PD, Bradshaw DJ: Dental plaque as a biofilm. J Ind Microbiol, 15: 169-175, 1995.
4. Rølla G, Ciardi JE, Eggen KH, Bowen WH, Afseth J: Free glucosyl- and fructosyltransferase in human saliva and adsorption of these enzymes to teeth in vivo, In, Glucosyltransferases, Glucans, Sucrose and Dental Caries. Special Supplement. Chemical Senses, Doyle, R.J. and Ciardi, J.E.(eds) IRL Press, Washington, D.C., pp. 21-30, 1983.
5. Munro C, Michalek SM, Macrina FL: Cariogenicity of *Streptococcus mutans* V 403 glucosyltransferase and fructosyltransferase mutants constructed by allelic exchange. Infection and Immunol, 59: 2316-2323, 1991.
6. Burne RA: Oral ecology disasters: The role of short-term extracellular storage polysaccharides, In, Cariology for the Nineties Bowen, W.H. and Tabak, L.A. (eds) University of Rochester Press, Rochester, N.Y., pp. 351-364, 1993.
7. Colby SM, Russell RRB: Sugar metabolism by mutans streptococci. J Appl Microbiol 83 (Suppl.): 80S-88S, 1997.
8. Rozen R, Bachrach G, Bronshteyn M, Gedalia I, Steinberg D: The role of fructans on dental biofilm formation by *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus gordonii* and *Actinomyces viscosus*. FEMS Microbiol Lett, 195: 205-210, 2001.
9. Kopec LK, Vacca-Smith AM, Bowen HW: Structural aspects of glucans formed in solution and on the surface of hydroxyapatite. Glycobiol, 7: 929-934, 1997.
10. Song KB, Seo JW, Rhee SK: Transcriptional analysis of levU operon encoding saccharolytic enzymes and two apparent genes involved in amino acid biosynthesis in *Zymomonas mobilis*. Gene. 232: 107-114, 1999.
11. Rhee SK, Song KB, Kim CH, Park BS, Jang EK, Jang KH: Levan, In, Biopolymers. Vol 5. De Baets, S., Vandamme, J., Steinbuechel, A.(eds), Wiley-VCH Verlag GmbH, Germany, pp. 351-377, 2002.
12. Chambert R, Petit-Glatron MF: Immobilisation of levansucrase on calcium phosphate gel strongly increases its polymerase activity. Carbohydr Res, 244: 129-136, 1993.
13. Venkitaraman AR, Vacca-Smith AM, Kopec LK, Bowen WH: Characterization of glucosyltransferaseB, GtfC, and GtfD in solution and on the surface of hydroxyapatite. J Dent Res, 74: 1695-1701, 1995.
14. Wunder D, Bowen WH: Action of agents on glucosyltransferases from *Streptococcus mutans* in solution and adsorbed to experimental pellicle. Archives of Oral Biol, 44: 203-221, 1999.
15. Han YW: Microbial levan. Adv Appl Microbiol, 35: 171-194, 1990.
16. Jang KH, Song KB, Kim CH, Chung BH, Kang SA, Chun UH, Choue RW, Rhee SK: Comparison of characteristics of levan produced by different preparations of levansucrase from *Zymomonas mobilis*. Biotechnol Lett, 23: 339-344, 2001.

(Received November 25, 2002; Accepted December 17, 2002)

