

碩士學位論文

親和性 크로마토그래피에 의한
大豆 β -amylase의 精製 및 特性에 관한 研究

濟州大學校 大學院

農 化 學 科



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

李 東 恩

1991年 12月 日


親和性 크로마토그래피에 의한
大豆 β -amylase의 精製 및 特性에 관한 研究

指導教授 康 順 善

李 東 恩

이 論文을 農學 碩士學位 論文으로 提出함

1991年 12月

 제주대학교 중앙도서관
李東恩의 農學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 ㉠

委 員 ㉠

委 員 ㉠


濟州大學校 大學院

1991年 12月 日

STUDIES ON PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF
SOYBEAN β -AMYLASE BY AFFINITY CHROMATOGRAPHY

Dong-Eun Lee

(Supervised by Professor Soon-Suon Kang)

 제주대학교 중앙도서관
A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIRMENTS FOR THE DEGREE
OF MASTER OF AGRICULTURE

DEPARTMENT OF AGRICULTURAL CHEMISTRY
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

1991. 12.

目 次

Summary

I. 結 論	2
II. 材 料 및 方 法	4
1. 材 料	4
2. 脫脂大豆粕 調製	4
3. β -amylase의 精製	4
4. 酵素의 活性 測定 및 蛋白質 定量	6
5. 反應生成物의 分析	7
6. 蛋白質의 SDS-polyacrylamide gel 電氣泳動	7
7. 酵素의 反應特性	8
8. 酵素의 K_m 및 V_{max} 의 값	9
III. 結 果 및 考 察	11
1. 大豆 β -amylase의 精製	11
2. 酵素活性 維持 方法	16
3. 蛋白質의 SDS-PAGE	17
4. 反應生成物의 分析	19
5. 酵素의 反應特性	21
6. 酵素의 K_m 및 V_{max} 의 값	26
IV. 要 約	28
V. 參 考 文 獻	29

Summary

Soybean β -amylase [β -1.4-glucan maltohydrolase EC 3.2.1.2] has been purified from defatted soybean meal by fractional precipitation with ammonium sulfate, ion exchange chromatography on CM-Toyoperal 650M, affinity chromatography on α -CD-sepharose column, and some physico-chemical properties of the enzyme were investigated.

The purified enzyme showed 50.5 folds of purification, 1,136 unit/mg protein of specific activity and 36 % of yield, respectively, compared to the crude extract.

The enzyme showed a single band on Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, and its molecular was estimated to be 58,000 daltons by SDS-PAGE.

The purified enzyme was identified as homogenous by HPLC analysis and maltose activity assay.

The optimum pH and temperature was 5.6 and 55 °C, respectively.

The enzyme was stable below 60 °C, but was very labile over 65 °C.

The enzyme was most stable at pH 5.0 - 6.0, and was more stable in the acidic region than in neutral region.

From the Hanes-Woolf plot, the K_m value for soluble starch was calculated as 0.05 % and V_{max} value was $1.3 \times 10^2 \mu\text{mol maltose} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$.

I. 緒 論

β -Amylase [α -1,4-glucan maltohydrolase EC 3.2.1.2]는 多糖類의 β -1,4-glucan을 非環元性 末端에서 차례대로 加水分解하여 β -anomer maltose를 생산하는 exoenzyme으로 Kuhn(1925)과 Ohlsson(1930)에 의해 β -amylase로 命名된 酵素로서 물엿, maltose의 제조에 이용되는 유용한 酵素이다(Thoma et al., 1971).

α -amylase가 生物界에 널리 분포하는데 비해서 β -amylase는 高等 植物界에 한정되어 있는 것으로 알려져 왔다. 그러나 1974년 Higashihara와 Okada는 *Bacillus megaterium*이 β -amylase을 分泌하는 것을 발견하였으며 그 이후 *Bacillus*屬, *Pseudomonas*屬, *Streptomyces*屬의 β -amylase 生産菌이 계속해서 보고되어 公業적 이용이 주목 받게 되었다(Higashihara and Okada, 1974; Shinke et al., 1974, 1975). 그러나 현재 대두 또는 보리 등의 高等植物의 β -amylase를 이용하는 것은 微生物 기원의 β -amylase에 비하여 耐熱性이 강하기 때문이다.

β -amylase 構造의 특성을 연구할 목적으로 여러 종류의 植物組織으로부터 이 酵素의 精製가 이루어져 현재까지 大豆(Gertler and Birk, 1965; Morita et al., 1976), 밀(Tkachuk and Tipples, 1966), 무우(Morita, 1974), 쌀(Matsui et al., 1977), 보리(Shinke and Mugibayashi, 1971), 수수(Botes et al., 1967)등의 精製酵素는 分子량이 50,000 - 60,000 daltons 정도의 單量體酵素(monomeric enzymes)이나 高구마 β -amylase(Balls et al., 1946; England and Singer, 1950)는 分子량이 50,000 daltones의 subunit가 4 개로 구성된 4 量體酵素(tetrameric enzymes)이다. 무우의 β -amylase는 活性이 대단히 不安定하며, 보리, 밀 등의 β -amylase도 쉽게 酸化重合하여 不活性인 多量體를 형성한다.

그러나 대두의 β -amylase는 酸性 pH 범위에서 비교적 안정하며 내열성도 다른 효소와 비교하여 강하다는 것으로 알려져 있다.

지금까지 maltose는 물엿의 主成分(maltose 함량 약 40 %)으로써 널리 食品工業, 酵素工業에 이용될 뿐만 아니라 澱粉의 酵素糖化法으로 maltose 함량이 높은 시럽의 제조가 가능하게 되어 그 수요가 급속히 증가하고 있다.

더우기 최근 純度가 높은 maltose를 제조하는 방법이 개발되어 醫藥品工業에 있어서 지금까지의 포도당 주사 대신에 maltose 주사액(純度 99 %, maltose 10 - 30 %)의 사용이 증가하므로써 그 중요성이 날로 높아져 가고 있고, 특히 maltose 제조에 필수적인 효소로 β -amylase의 수요는 증가하고 있다.

최근에 蛋白質工學(protein engineering)에 의한 대두 β -amylase의 내열성과 活性이 강한 酵素의 개발과 活性中心部位의 아미노산 殘基를 동정하기 위하여 여러 종류의 아미노산 置換變異酵素(mutants)를 조제하고, 大腸菌에서의 發現에 관해 보고하고 있다(Fukazawa et al., 1989; Kim et al., 1991). 이러한 경우 大腸菌體內에 發現量이 낮아 극히 소량 존재하는 酵素는 여러 가지 分離操作을 거쳐 정제하는 동안 活性이 극히 저하 하거나 收率이 매우 낮아지게 된다. 따라서 지금까지의 정제처럼 여러 조작단계를 거치지 않고 단시간에 高純度로 정제할 수 있는 새로운 精製方法이 요구되고 있다.

本 研究에서는 이러한 문제들을 해결하기 위해 α -CD(cyclodextrin)-sepharose affinity chromatography에 의해 脫脂大豆로 부터 短時間에 高純度 대두 β -amylase를 精製하였으며, 精製된 酵素의 특성등에 대해서 연구하였다.

II. 材料 및 方法

1. 材料

本實驗에 사용한 大豆는 1990 년 12 월 濟州大學校 附屬農場에서 收穫된 “힐” 品種(*Glycine max*)을 사용하였다. epoxy-activated Sepharose 6 B는 Pharmacia Fine Chemicals(Sweden), CM-Toyopearl 650 M(44 - 88 μm)은 Tosoh 社(Japan)에서 구입하였다. 그 외 實驗에 사용한 試藥들은 모두 特級 生化學實驗用을 사용하였다.

2. 脫脂 大豆粕의 調製

大豆 200 g을 蒸溜水에 12 시간 동안 沈漬(5 °C)시킨 다음 10 mM acetate buffer(pH 5.4)용액을 加하여 mixer에서 1 - 2 분간 마쇄한 후 가제를 4 겹으로 하여 濾過하였다. 이 濾過液에 acetone 濃度가 60 %가 되도록 加하여 1 시간 동안 攪拌 후 遠心分離하였다. 沈澱物에 다시 100 % acetone을 加하고 교반하여 다시 원심분리하였다. 침전물에 diethylether을 加한 후 교반, 원심분리하여 침전물을 desiccater에서 乾燥 후 酵素精製의 試料로 사용하였다.

3. β -amylase의 精製

조제된 脫脂大豆粕으로 부터 모든 精製過程은 4 °C에서 실시하였으며 정제 과정에 사용한 모든 緩衝溶液에는 3.5 mM mercaptoethanol, 1 mM EDTA, 0.02 % sodium azide를 安定劑로 첨가하였다.

1) 酸 抽出

탈지대두박 10 g을 50 mM acetate buffer(pH 5.4) 100 ml에懸濁시키고, 그懸濁液을 2 시간 동안攪拌시킨 후,遠心分離(10,000 rpm, 5 °C, 10 min)하여상등액을 얻었다.

2) 熱處理

酸抽出液에 3.5 mM mercaptoethanol, 1 mM EDTA, 0.02 % sodium azide을添加한 뒤, 60 °C 恒溫水槽에서 교반하면서 20 분간 열처리하여 급냉시킨 후 熱變性蛋白質을 원심분리하여 제거하였다.

3) Ammonium sulfate 分劃

熱處理 溶液에 ammonium sulfate를 소량씩 溶解하여 25 %로 飽和시킨 후 1 시간동안 교반하여 원심분리 시켰다. 그 상등액에 다시 60 %가 되도록 ammonium sulfate로 포화시켜 1 시간 동안 교반 후 원심분리하여 침전물을 10 mM acetate buffer(pH 5.0)에 용해하여 4 °C에서 10 mM acetate buffer(pH 5.0)용액을 3 시간마다 교환하며 24 시간 이상 透析하였다.

4) CM-Toyopearl 650 chromatography

透析液을 원심분리하여 그 상등액을 10 mM acetate buffer(pH 5.0)로 平衡시킨 CM-Toyopearl 650 column (2.6 x 35 cm, bed vol. 100 ml)에 吸着시킨 다음 같은 완충용액으로 충분히 세척하면서 효소의 吸着與否를 확인하였다. 완전히 흡착된 효소는 0.5 M NaCl을 포함한 10 mM acetate buffer(pH 5.0) 용액으로 gradient 하여 溶出된 각 分劃마다 活性을 측정하여 活性 分劃을 모았다.

5) Cyclodextrin의 固定化 및 α -CD-Sepharose affinity chromatography

(1) cyclodextrin의 固定化

Epoxy-activated Sepharose 6 B 4 g을 蒸溜水에 懸濁하여 1 시간 동안 放置하고, glass filter에서 濾過한 gel를 0.1 M NaOH 용액에 懸탁한 후 즉시 여과했다. 이 gel를 300 mg cyclodextrin이 녹아 있는 0.1 M NaOH 12 ml에 45 °C, 16 시간 동안 진탕항온수조에서 반응시켰다. 이 반응액을 glass filter에서 증류수, glucose (25 mg/ml, H₂O)용액으로 각각 30 분간 세척 후 다시 증류수로 30 분간 세척하고 50 mM acetate buffer(pH 4.8)로 2 시간 세척하여 column(1.6 x 35 cm)에 채운 후 50 mM acetate buffer(pH 5.4)로 평형시켰다.

(2) α -CD-Sepharose affinity chromatography

이온교환으로 얻어진 大豆 β -amylase 分劃液 1 ml 당 0.15 g의 ammonium sulfate를 첨가하여 완전히 용해시킨 후 β -cyclodextrin으로 흡착된 α -CD-Sepharose affinity column(1.6 x 35 cm, bed vol. 20 ml)에 흡착시키고 50 mM acetate buffer(pH 5.4) 1 ml 당 0.15 g 용해되어 있는 완충용액으로 충분히 세척한 후, 50 mM acetate buffer(pH 5.4)로 溶出시켜 얻은 각 分劃의 活性을 측정하여 活性分劃을 모았다.

4. 酵素의 活性 測定 및 蛋白質 定量

1) 酵素의 活性 測定

β -amylase 活性은 0.02 * BSA가 함유되어 있는 50 mM acetate buffer(pH 5.4)에 酵素液을 稀釋하여 0.25 * 可溶性 澱粉를 基質로 40 °C에서 정확히 20 분간 反應시켜 생성된 還元糖을 Somogyi-Nelson 法(Hedge, 1962)으로 定量하였다.

즉, 反應液(1 ml)에 1 ml Somogyi 試藥을 넣어 反應을 停止시킨 뒤 沸騰浴에서 20 分間 가열하여 흐르는 물에 냉각시킨 뒤 Nelson 試藥 1 ml를 加한 후 증류수 10 ml를 添加하여 20 分間 실온에 방치한 후 520 nm에서 吸光度를 측정하고 maltose의 標準曲線에 의하여 生成糖을 구하였다.

1 分 동안에 1 μ mol의 maltose를 生成하는 酵素의 量을 1 unit로 하였다.

2) 蛋白質 定量

단백질은 Bio-Rad 社의 染料試藥을 사용하여 Bradford 法(1976)으로 단백질을 定量하였다. 標準蛋白質로서는 bovine gamma globulin을 사용하였다.

5. 反應生成物의 分析

50 mM acetate buffer에 0.25 %로 稀釋한 可溶性 澱粉을 基質로 정제된 酵素液(110 μ g/ml)을 40 °C에서 24 時間 동안 反應시킨 후 Waters 社의 HPLC를 사용하여 反應生成物을 分析하였다. HPLC의 조건은 μ -Bondapak C₁₈ reverse-phase column을 이용하여 溶媒 acetonitrile - water (80 : 20)를 流速 1.0 ml/min에서 溶出하고 RI detector에서 分解生成物을 檢出하였다.

6. 電氣泳動

각 精製過程에 따른 大豆 β -amylase의 純도와 精製 大豆 β -amylase의 分子量을 측정하기 위하여 Laemmli의 方法(Laemmli et al, 1970)에 따라 SDS-polyacrylamide gel 電氣泳動을 실시하였다. 10 % separation gel과 3 % stacking gel에 정제 단백질을 loading 한 다음 20 mA의 電流로 실온에서 5 - 6 時間 泳動한 후 coomassie brilliant blue R로 染色한 후 7 % acetic acid로 脫色 시켰다.

이때 SDS-PAGE로 분자량을 구하기 위해 사용된 molecular marker로는 Sigma社의 Kit를 사용하였으며 標準蛋白質로는 Triosephosphate Isomerase(26,000), Lactic Dehydrogenase(36,500), Fumarase(48,500), Pyruvate Kinase(58,000), Fructose-6-phosphate Kinase(84,000), β -Galactosidase(116,000)를 사용하여 이동도(Rf 치)와 분자량의 관계로부터 분자량을 算出하였다.

7. 酵素의 反應特性

1) 最適溫度

정제한 효소의 最適溫度를 조사하기 위하여 0.02% BSA가 포함된 50 mM sodium acetate buffer(pH 5.4) 450 μ l 용액에 효소액 50 μ l와 0.5% 可溶性 澱粉 500 μ l의 혼합물(1 ml)을 加한 후 酵素 反應 溫度를 5 $^{\circ}$ C 간격으로 40 - 80 $^{\circ}$ C 까지 10 분간 반응시켜 酵素活性을 측정하고 相對活性으로 표시하였다.



2) 熱安定性

정제된 효소의 熱安定性을 조사하기 위하여 기질을 제외한 반응액의 조성을 모두 첨가하여 35 - 80 $^{\circ}$ C 까지 5 $^{\circ}$ C 간격으로 15 분 동안 처리한 효소액(26 μ g) 500 μ l에 0.5% 가용성 전분 500 μ l을 가하여 殘存하는 효소를 相對活性으로 표시하였다.

3) 最適 pH

정제효소의 最適 pH를 검토하기 위하여 50 μ l 효소액과 0.5% 가용성 전분 500 μ l를 0.02% BSA가 포함된 50 mM acetate buffer(pH 3.6 - 5.6), 50 mM Phosphate buffer(pH 6.0 - 8.0), 50 mM sodium carbonate buffer(pH

9.0 - 10.0) 용액으로 pH 3.6에서 pH 10.0 까지 조절한 혼합용액(1 ml)을 40 °C에서 10 분간 반응시켜 酵素活性를 측정하고 相對活性으로 표시하였다.

4) pH 安定性

정제된 효소의 pH 安定性은 효소용액(26 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 0.02 % BSA가 포함된 50 mM acetate buffer(pH 3.6 - 5.6), 50 mM Phosphate buffer(pH 6.0 - 8.0), 50 mM sodium carbonate buffer(pH 9.0 - 10.0)로 pH를 조절한 혼합액에 pH 0.5 간격으로 40 °C에서 1 시간 반응하여 0.5 % 가용성 전분을 첨가하고 40 °C에서 15 분간 반응 후 잔존하는 효소를 상대활성으로 표시하였다.

8. 酵素의 K_m 및 V_{max} 의 값

정제한 大豆 β -amylase의 基質에 대한 親和力을 조사하기 위하여 50 mM sodium acetate buffer(pH 5.4)에서 기질을 濃度別(0.05, 0.1, 0.15, 0.25 %)로 稀釋하여 일정한 濃度(26 $\mu\text{l}/\text{ml}$)의 효소액과 40 °C에서 20 분간 반응시켜 活性를 측정하여 Lineaver-Burk 方程式을 變形한 Banes-Woolf plot에서 K_m 값과 V_{max} 을 구하였다.

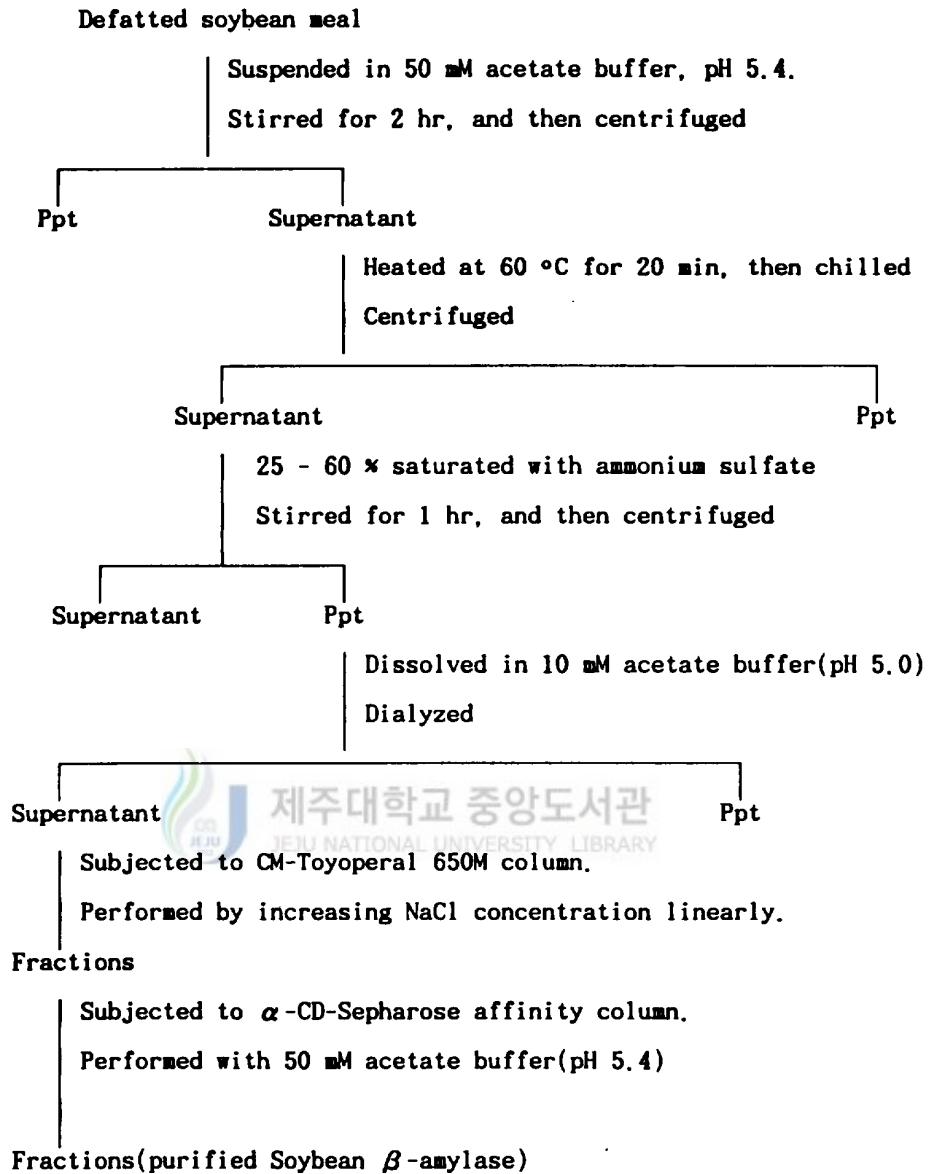


Fig.1. Scheme for the Purification of Soybean β -amylase

III. 結果 및 考察

1. 大豆 β -amylase의 精製

모든 정제과정은 4 °C에서 실시하였으며 Fig. 1의 정제 순서에 따라 수행하였다.

酸 抽出 및 熱 處理 : 脫脂된 大豆粕에 50 mM acetate buffer(pH 5.4)로 懸濁하여 교반 원심분리 하였다. 이 상등액을 60 °C에서 20 분간 진탕수조에서 熱 處理하여 熱 變性蛋白質을 원심분리시켜 제거하였다. 이 때 β -amylase의 比活性은 22.9 U/mg protein 이었다.

ammonium sulfate 25 - 60 % 分劃 및 透析 : 이 효소액을 ammonium sulfate(25 - 60 % 포화)로 沈澱, 10 mM acetate buffer(pH 5.0)에서 24 시간 이상 透析, 원심분리하여 酵素蛋白質을 회수하였으며 比活性은 67 U/mg protein으로 精製度는 약 3 배로 증가시켰다.

CM-Toyopearl 650 M chromatography : 원심분리하여 회수한 효소액을 10 mM acetate buffer(pH 5.0)로 미리 平衡化시킨 CM-Toyopearl 650 column에 흡착시킨 다음 같은 완충용액으로 충분히 세척하면서 효소의 흡착 여부를 확인하였다. 완전히 흡착된 효소는 0 - 0.5 M NaCl 완충용액을 직선으로 gradient 시키면서 tube 당 7.7 ml 씩 分劃하였으며 이 蛋白質 分劃을 280 nm에서 吸光度를 측정한 결과 얻은 각 peak에서 β -amylase 活性은 Fig.2와 같이 分劃 64 - 74 tube에서만 나타났으며, 이 活性分劃을 모아 부분정제된 효소액을 얻었다.

따라서 모아진 活性分劃의 比活性은 315 units/mg protein으로 精製度를 약 14 배로 증가시켰다.

α -CD-Sepharose affinity chromatography : 이온 교환으로 얻은 효소액 1 ml 당 ammonium sulfate 0.15 g 되도록 첨가하면서 완전히 용해 할 때까지 교반하였다. 그리고 epoxy-activated sepharose 6 B에 α -cyclodextrin 으로 흡착된 affinity column에 活性分劃을 흡착시킨 다음, 50 mM acetate buffer (pH 5.4) 1 ml 당 ammonium sulfate 0.15 g이 용해된 완충용액으로 충분히 세척시켜 완전히 흡착된 효소는 50 mM acetate buffer(pH 5.4)로 溶出시켜 tube 당 3.3 ml 씩 分劃하였다. 이렇게 모은 각 단백질 分劃을 280 nm에서 흡광도를 측정하여 얻은 단백질 peak의 酵素活性을 측정한 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 重疊된 단백질 peak와 효소활성은 거의 대칭적인 peak을 나타내며(Fig. 3), 최종적으로 정제도가 50 배로 SDS-PAGE 결과 순수한 β -amylase로 정제 되었음을 확인하였다.

각 정제과정에서 얻어진 分劃의 酵素 精製度와 收率등은 Table 1과 같으며 최종적으로 정제된 酵素蛋白質이 比活性은 1,136 units/mg protein으로 酸抽出 方法으로 부터 약 50 배의 정제도를 얻었다. 그러나 이러한 결과는 Morita(1975)등의 약 40 배의 정제도의 보고와 비교하여 본 실험의 정제방법에 의해 정제된 β -amylase는 순수하게 정제 되었음을 보여주고 있다.

收率은 36 %로 다른 연구자(Morita et al., 1975)들의 결과와 비교하여 높게 나타났다.

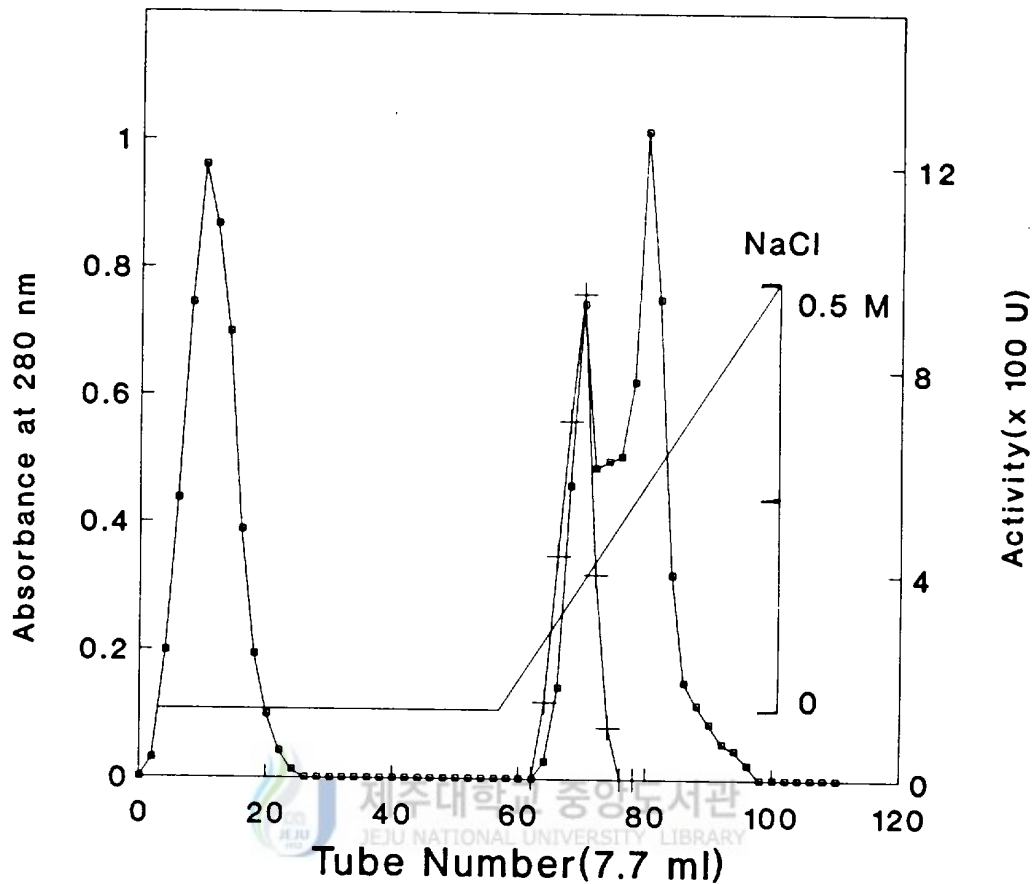


Fig. 2. Elution profile of soybean β -amylase by CM-Toyopearl 650 chromatography.

—●— absorbance at 280 nm : —+— activity of β -amylase :
 —○— concentration of NaCl in the elution buffer.

The column(2.6 x 35 cm) was equilibrated with 10 mM acetate buffer, pH 5.0, containing 3.5 mM mercaptoethanol, 1 mM EDTA and 0.02 % sodium azide. After the enzyme solution was put onto the column, the column was washed with 500 ml of the buffer and elution was performed by increasing the NaCl concentration linearly from 0 to 0.5 M in the same buffer. The fraction peak as shown by a horizontal bar were collected.

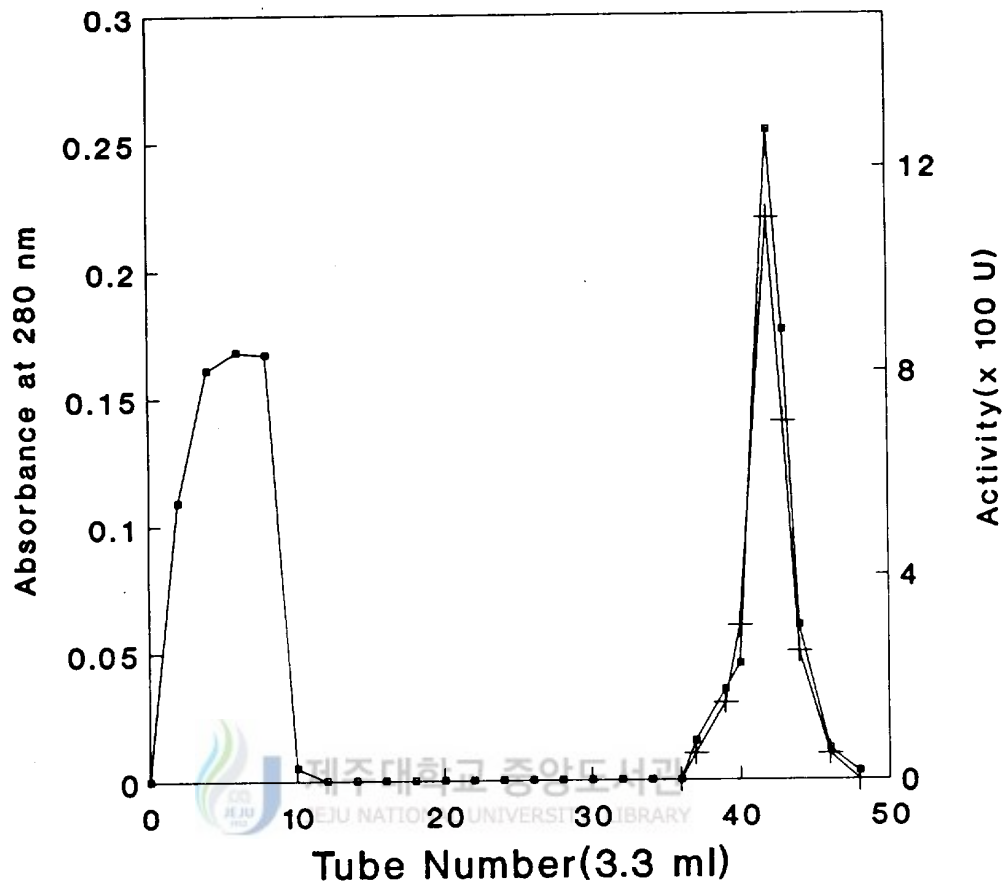


Fig. 3. Elution profiles of soybean β -amylase by α -CD-Sepharose affinity chromatography.

—●— absorbance at 280 nm ; —+— activity of β -amylase.

The column(1.6 x 35 cm) was equilibrated with 50 mM acetate buffer(pH 5.4) containing 0.15 g/ml ammonium sulfate, 3.5 mM mercaptoethanol, 1 mM EDTA, and 0.02 % sodium azide. After the enzyme solution was put onto the column, the column was washed with 300 ml of the buffer, and elution was performed by 50 mM acetate buffer, pH 5.4.

Table 1. Purification of the soybean β -amylase

Step	Total Activity volume (ml)	Protein (mg/ml)	Specific activity (U/mg protein)	Total activity (U) (*)	Yield	Purification fold
Acid extract	82	144	6.4	22.5	11,808	100
Heat treatment	78	142	6.2	22.9	11,076	94
25-60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	58	134	2	67	7,772	66
CM-Toyopearl 650M	66	107	0.34	315	7,062	60
α -CD-Sepharose	34	125	0.11	1,136	4,256	36
						50.5

2. 酵素活性 維持 方法

효소의 遊離 SH 基가 酸化에 의한 酵素의 重合이 일어나고 活性의 低下되는 일이 있기 때문에 mercaptoethanol과 같은 還元劑를 넣어 효소를 언제나 還元狀態로 遊離하는 것이 중요하며, 또 혼입해 있는 微量의 重金屬이온에 대해 EDTA를 공존시켜 효소와의 mercaptaide의 형성을 막았으며(Kamogawa et al.,1974, Morita et al.,1975), 微生物의 오염을 방지하기 위해 sodium azide을 사용하였다. 이처럼 사용되는 모든 완충용액에 安定劑를 첨가하여 일정한 활성을 유지시켰다. 그리고 효소활성을 측정할 때는 최종적으로 낮은 효소용액을 사용하기 때문에 측정 직전에 稀釋 하더라도 활성에 손실이 따른다. 특히 Morita 등(1975)은 효소용액을 너무 稀釋(10 μg protein/ml 이하)하면 활성이 저하된다고 보고 하였다. 이러한 문제를 방지하기 위해 본 실험에서는 여러가지 豫備實驗을 통하여 Table 2와 같이 완충용액에 0.02 % 되게 BSA를 첨가함으로써 低濃度 酵素液이 일정한 상태의 활성을 유지할 수 있었다.



Table 2. Activity of soybean β -amylase in the presence of BSA

Enzyme Conc.	Activity (units/ml)	
	55 $\mu\text{g}/\text{ml}$	5.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$
BSA*	123	126
BSA ⁻	107	48

* BSA* : 0.02 % BSA, BSA⁻ : without BSA

3. SDS - Polyacrylamide Gel Electrophoresis

정제된 효소의 純度를 확인하기 위하여 여러 精製 段階別로 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 수행하였다. 정제 효소 SDS-PAGE 형태는 Fig. 4와 같이 單一 band로 나타나 單量體 蛋白質은 물론 β -amylase가 순수하게 정제 되었음을 확인하였다.

정제된 大豆 β -amylase의 分子량을 측정하기 위하여 分子量 26,000 - 116,000의 分子量을 marker로 하여 SDS-PAGE를 실시한 결과는 Fig. 5와 같았다. 나타난 marker protein과 정제된 효소의 band의 Rf 치를 계산한 결과 分子量은 약 58,000 daltons 정도로 추정된다.

이러한 결과 Morita(1976)등이 SDS-PAGE에 의해 측정한 결과와 Mikami(1988)등이 DNA 鹽基配列로 결정된 分子量과 잘 일치하고 있었다.



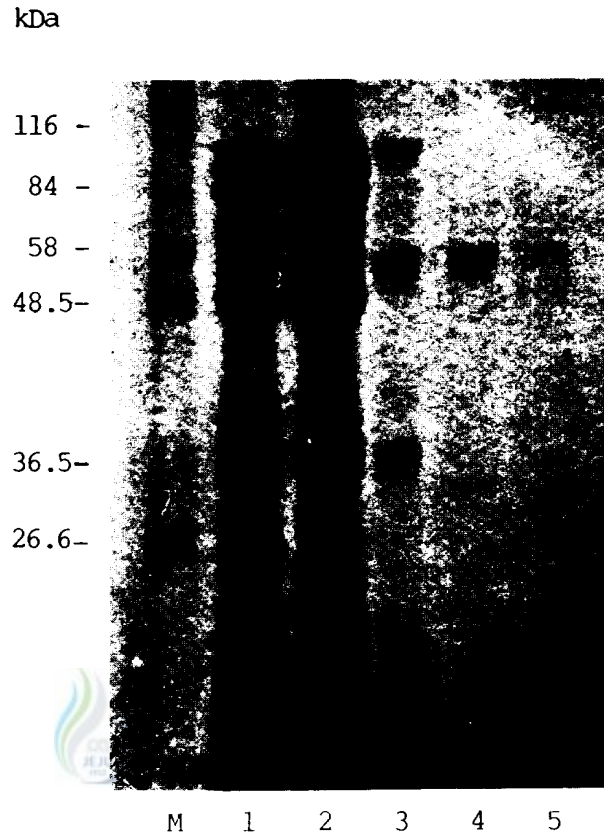


Fig. 4. SDS-PAGE analysis of β -amylase samples at different stages of the purification.

Lane M, molecular weight markers; Lane 1, acid extract; Lane 2, heat treatment; Lane 3, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 25 - 60 % satn.; lane 4, CM-Toyopearl 650 M chromatography; lane 5, α -CD-sepharose affinity chromatography. The numbers on the left denote molecular weights of marker.

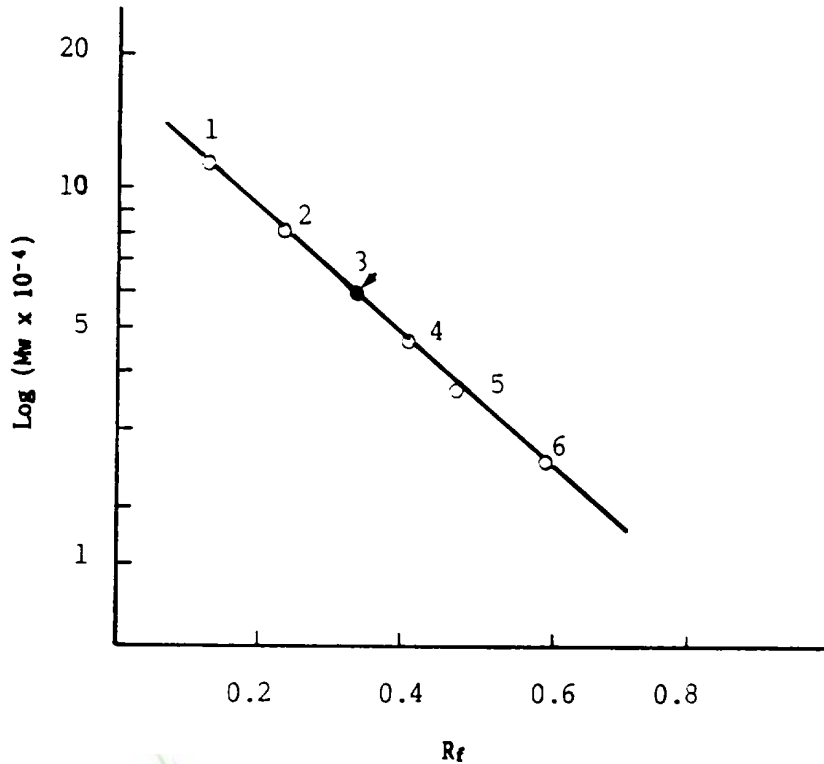


Fig .5. Determination of molecular weight of soybean β -amylase by SDS-PAGE.

Standard Protein: 1. β -Galactosidase(116,000), 2. Fructose-6-phosphate Kinase(84,000), 3. Pyruvate Kinase(58,000), 4. Fumarate Kinase(48,500), 5. Lactic Dehydrogenase(36,500), 6. Triosephosphate Isomerase (26,600). \rightarrow Purified soybean β -amylase.

4. 酵素 - 基質 反應生成物의 分析

정제 효소와 基質과의 反應生成物을 확인하기 위하여 가용성 전분을 기질로 하여 반응시킨 후 HPLC로 分析한 分解生成物은 Fig. 6과 같이 maltose만이 생성되었다. 따라서 β -amylase는 maltose 생성에 特異性을 갖는 효소로서 大豆에서 부터 순수하게 분리되어 α -amylase나 glucosidase의 영향을 받지 않은 것으로 판단된다.

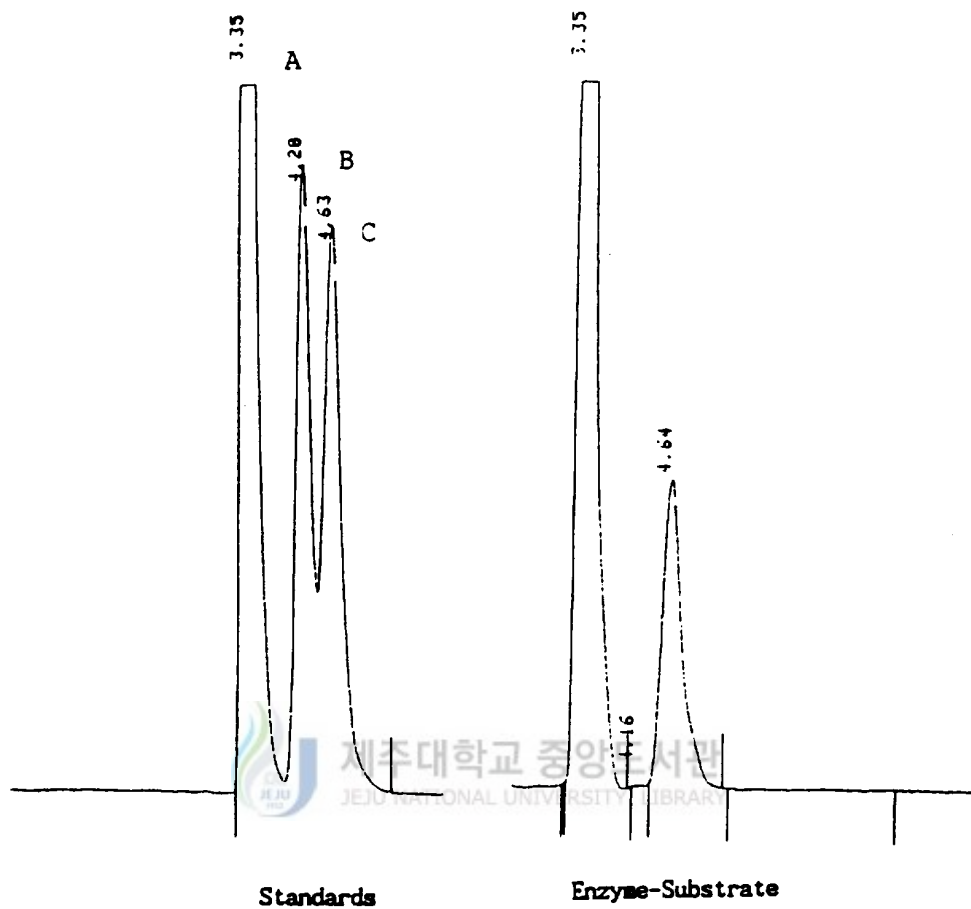


Fig. 6. Elution profiles of standards and production of purified enzyme-substrate reaction.

A: water. B: glucose. C: maltose. Enzyme concentration: 0.2 mg/ml. Soluble starch concentration: 0.25%. Reaction Time: 24 hr. Buffer: 50 mM acetate buffer(pH 5.4). Temperature: 40 °C. HPLC: Waters, Mobile phase: acetonitrile-water(80:20), Column: μ -Bodapak C₁₈ reverse-phase column, Flow rate: 1.0 ml/min, Sensitivity: 8x, Detector: Ri detector.

4. 酵素의 反應特性

1) 最適溫度

정제된 大豆 β -amylase의 最適溫度를 측정한 결과 Fig. 7에서와 같이 55 °C에서 最大活性을 보였으며 50 °C에서 96 % 이상의 활성과 65 °C에서 97 %의 활성을 보였으나, 그 이상의 溫度에서는 활성이 현저히 저하되었다. 특히 75 °C에서는 효소가 완전히 變性되어 不活性 됨을 알 수 있었다.

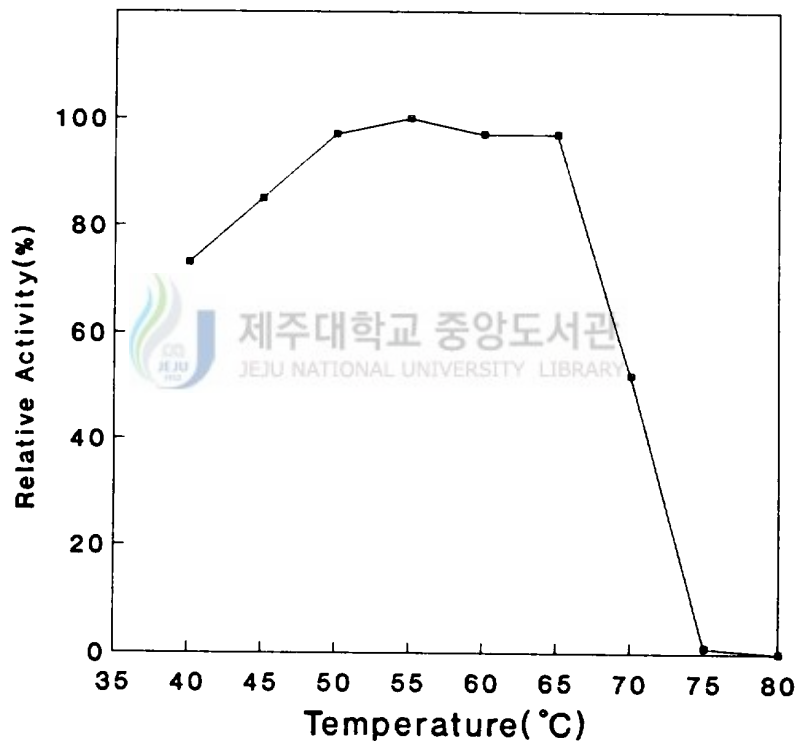


Fig. 7 Effect of temperature on the activity of soybean β -amylase. The enzyme activity was measured at various temperature for 10 min at pH 5.4.

2) 熱安定性

정제된 효소액을 각 온도(35 - 80 °C)에서 15 분동안 前處理한 후 殘存活性을 조사한 결과 Fig. 8에서 보는 바와 같이 35 - 60 °C에서 安定하였으며 그 이상에서는 溫度上昇과 더불어 활성이 급격히 감소하였다.

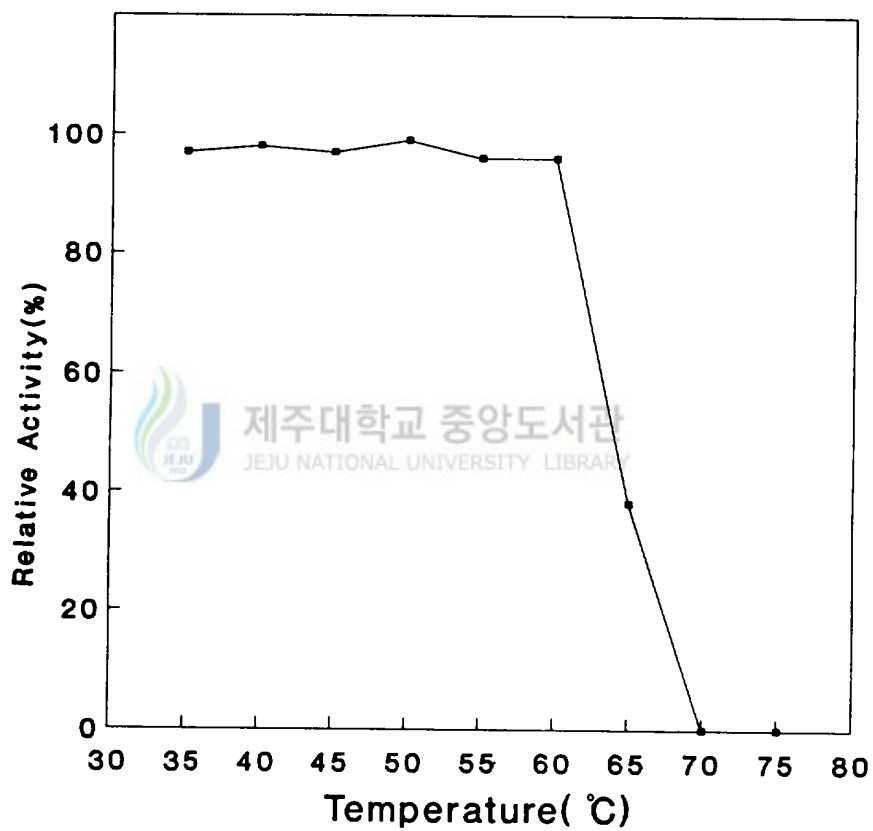


Fig. 8. Effect of temperature on the stability of soybean β -amylase. Each enzyme(26 μ g/ml) was incubated at various temperatures for 15 min at pH 5.4 and the residual activities was assayed at 40 °C.

3) 最適 pH

정제된 효소액을 pH 3.6 - 10.0 까지 기질과 반응시켜 활성을 측정한 결과 Fig. 9와 같이 pH는 5.6으로 酸性 範圍에서 비교적 안정하며 pH 7 이상에서는 급격히 활성이 감소되었다.

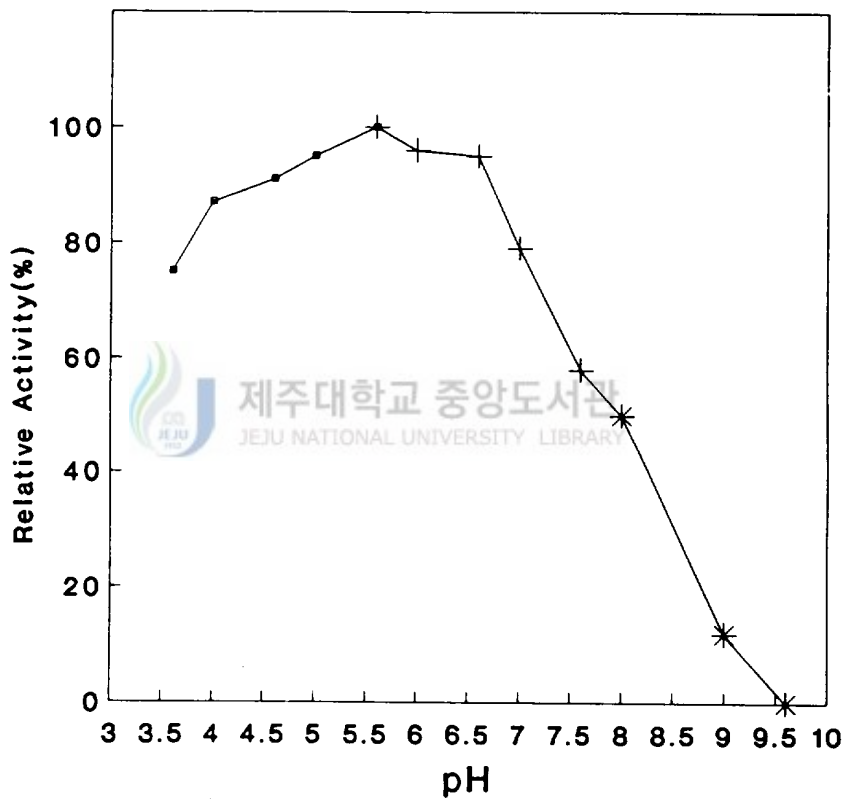


Fig .9. Effect of pH on activity of soybean β -amylase.

The enzyme activity was measured at various pH's and 40 °C for 10 min. Buffer solution used: 50 mM acetate buffer —●— , 50 mM Phosphate buffer —+— , 50 mM sodium carbonate —*— .

4) pH 安定性

각 pH 의 완충용액(pH 3.6 - 10.0)에 효소액을 넣어 40 °C에서 1 시간동안 前處理한 후 반응시켜 활성을 조사한 결과는 Fig. 10에서와 같이 pH 5.0 - 6.0에서 安定性を 나타냈으나 pH 6 이상에서는 극히 不安定하여 활성이 저하 되었으며 pH 8 이상에서는 활성을 나타내지 않았다.

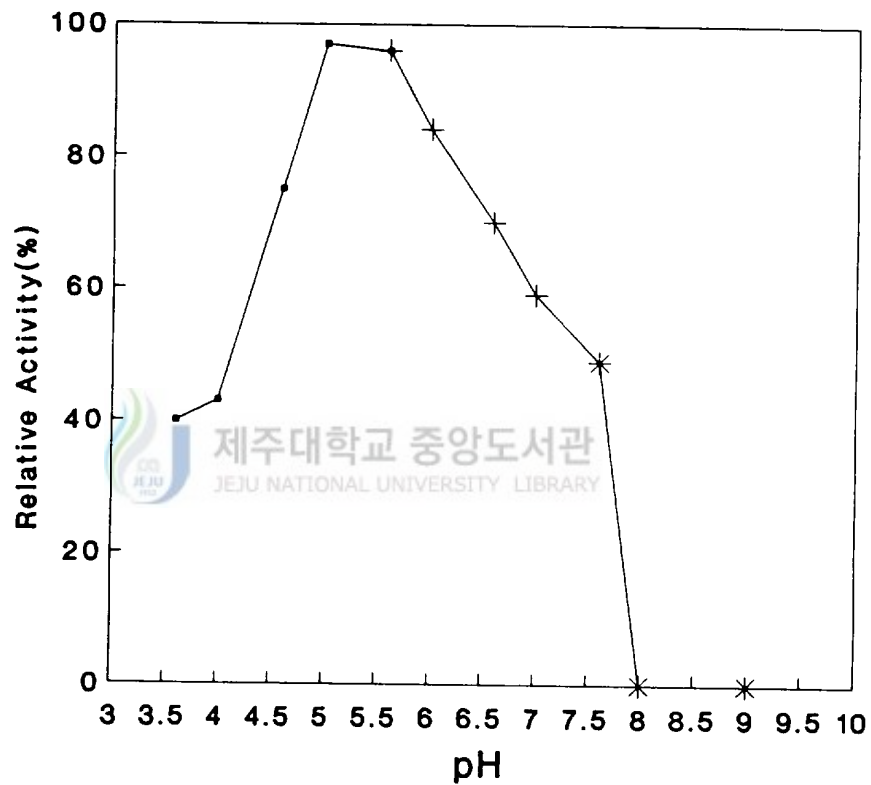


Fig. 10. Effect of pH on the stability of soybean β -amylase. Each enzyme solution(26 μ g/ml) was incubated at various pH' s for 1 hr at 40 °C and the residual activity was measured in the presence of 0.25 % soluble starch as substrate. Buffer solution used: 50 mM acetate buffer \bullet , 50 mM phosphate buffer $+$, 50 mM sodium carbonate buffer $*$.

이와같이 本 實驗에서 정제한 β -amylase의 일반적인 성질을 검토한 결과는 Morita 등(1975, 1976)의 정제한 大豆 β -amylase의 일반적인 성질과 잘 일치하였다.

또한 Table 3과 같이 大豆 β -amylase는 微生物 由來의 β -amylase와 비교한 결과 酸性 範圍에서 安定하였으며, 熱 安定性도 60 °C 정도로 비교적 강하였다(Murao et al., 1979).

Table 3. General Properties of Soybean β -amylase and Microbial β -amylases

	Soybean	<i>B. polymyxa</i> I, II ²⁷⁾	<i>B. megaterium</i> ²⁷⁾	<i>B. cereus var</i> <i>mycoides</i> ²⁸⁾
Optimum pH	5.6	7.5	6.5	7.0
pH stability	5.0-6.0	4.0-9.0	5.0-7.5	6.0-9.0
Optimum temp.	55°C	45°C		50°C
Thermal stability	below 60°C	below 40°C	below 55°C	below 50°C
Molecular weight	58,000	44,000		35,000±5,000
Enzymatic digest	Maltose	Maltose	Maltose	Maltose

5. 酵素의 K_m 및 V_{max} 의 값

본 효소의 기질에 대한 親和力을 조사하기 위하여 標準 反應條件下에서 기질의 농도 변화에 따른 反應速度의 변화를 조사하였다. 이 결과를 이용하여 Lineweaver-Burk 方程式을 변형한 Hanes-Woolf plot로 Michaelis-Menten 常數(K_m)와 最大反應速度(V_{max})를 측정된 결과 Fig. 11과 같이 본 효소의 K_m 값은 $0.05 \times$ 였으며 V_{max} 는 $1.3 \times 10^2 \mu\text{mol maltose} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 이었다.

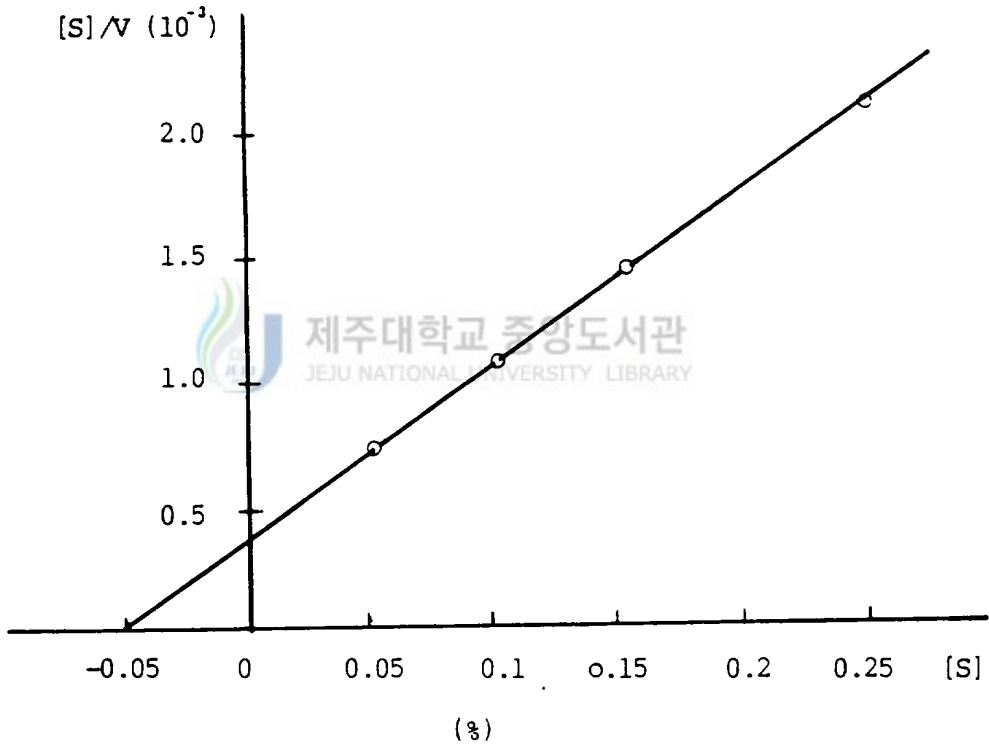


Fig. 11. Hanes-Woolf Plot of Starch Hydrolysis by β -amylase.

The reactions were performed at 40 °C for 10 min at various concentrations of soluble starch in 50mM acetate buffer(pH 5.4) with β -amylase.

大豆 β -amylase의 정제는 Morita(1975)등의 방법으로 acid extract, ammonium sulfate precipitation, dialysis, heat treatment, ammonium sulfate fractionation, ion-exchange chromatography(CM-sephadex, DEAE-sephadex chromatography), gel filtration 등과 같이 조작이 복잡하고 많은 시간이 소요되는 방법이다.

더우기 최근에 金 등(1991)이 蛋白質 工學(protein engineering)에 의한 耐熱性和 활성이 강한 효소를 개발하기 위한 기반을 확립하기 위해 site-directed mutagenesis에 의한 여러가지 β -amylase mutants 중에서 菌體內에 發現量의 낮은 變異酵素는 Morita(1975)등과 같은 방법으로 分離精製操作을 거치면 酵素活性의 극히 저하하거나 收率이 매우 낮아지게 된다.

따라서 生物學的으로 特異한 親和力에 의하여 대두 β -amylase를 分別精製 하는데 조작이 간편하고 特異性이 높아 收率이 높게 정제할 수 있는 affinity chromatography에 의한 정제방법이 요구되고 있다.

따라서 본 방법은 재래의 분리 정제방법(Morita, 1975)에 비하여 affinity chromatography 방법을 도입하므로써 대두에서 β -amylase를 쉽게 분리할 수 있었다.

IV. 要 約

脫脂된 大豆粕으로 부터 대두 β -amylase를 精製하고, 그 物理化學的 特性을 조사하였다.

최종적으로 정제된 大豆 β -amylase이 比活性은 1,136 units/mg protein로 酸 抽出方法으로 부터 약 50.5 배의 정제도와 36 %의 收率을 얻었다.

低濃度 정제 효소액의 활성 유지를 위해 緩衝溶液에 0.02 %가 되게 BSA를 첨가하여 일정한 상태의 활성을 유지시켰다.

정제된 효소액의 순도를 확인하기 위해 여러 단계별로 SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis를 수행한 결과 단일 band를 나타내어 單量體 蛋白質은 물론 β -amylase가 순수하게 정제되었음을 확인하였고, SDS-PAGE에 의해 subunit의 分子量은 58,000 daltons으로 추정된다.

HPLC에 의해 酵素-澱粉 反應生成物은 maltose 만이 遊離 됨을 확인하였다. 이 酵素의 最適 pH와 溫度는 각각 5.6 과 55 °C 이었다.

60 °C 이하에서 매우 安定하였지만 65 °C 이상에서는 不安定하였다.

그리고 pH 5.0 - 6.0에서 가장 安定하여 酸性範圍에서 비교적 安定하였다.

Lineweaver-Burk 方程式을 변형한 Hanes-Woolf plot로 부터 精製한 酵素의 可溶性澱粉에 대한 K_m 값은 0.05 % 이며 V_{max} 값은 $1.3 \times 10^2 \mu\text{mol maltose} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 이다.

V. 參考文獻

1. Ahn, J.H., Hwang, J.B. and Kim, S.H. 1990. Cyclodextrin Glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus*: Purification by Affinity Chromatography and Its Properties. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.* Vol. 18, No. 6. 585-590.
2. Aibara, S., Yamashita, H. and Morita, Y. 1984. Molecular Shape and Packing in crystals of Soybean β -amylase: *Agric. Biol. Chem.*, 48(6), 1575- 1579
3. Bernfeld, P. 1955. *Methods in Enzymology*, Academic press, Vol.1, 149 -158
4. Birte Svensson. 1991. Structure/Function Relationship in Starch Hydrolase and Related Enzymes. *Denpun Kagaku*. Vol. 38, No.2, p. 125 - 135
5. Bradford, M.M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding.
6. Byun, S.M., and Baik, O.R., 1978. Enzyme Purification Using Affinity Chromatographic Technique. *KOR. J. FOOD SCI. TECHNOL.* Vol.10, No. 2 269-277.
7. Chung, M.J., Hou, W.N., Jeong J.H. 1990. Studies on the Development and the Characteristics of the Powerful Raw Starch Digesting Enzyme. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.* Vol. 18, No. 3, 251-259.
8. Friedberg, F. and Rhodes, C. 1986. Cloning and Characterization of the β -amylase gene from *Bacillus polymyxa*: *J. Bacteriol.* 165, 819-824

9. Isoda, Y. and Nitta, Y. 1986. Affinity Labelling of Soybean β -amylase with α -Glucopyranoside: J. Biochem. 99, 1631-1637.
10. Ji E.S., Mikami, B., Kim, J.P. and Morita, Y. 1990. Position of Substituted Amino Acids in Soybean β -amylase Isozymes: Agric. Biol. Chem., 54, 3065-3067.
11. Kawazu, T., Nakanishi, Y., Uozumi, N., Sasaki, T., Yamagata, H., Tsukagoshi, N. and Udaka, S. 1987. Cloning and Nucleotide Sequence of the Gene Coding for Enzymatically active Fragments of the *Bacillus Polymyxa* β -amylase: J. Bacteriol. 169, 1564-1570.
12. Kim, J.p., Ann, Y.G., and Shim W.M. 1985. Studies on the Purification of Sweet Potato β -amylase. Korean Biochem. J. Vol. 18. No.3, p 290-296.
13. Kitamoto, N., Yamagata, H., Kato, T., Tsukagoshi, N. and Udaka, S. 1988 Cloning and Sequencing of the Gene Encoding Thermophilic β -amylase *Clostridium thermosulfurogenes*: J. Bacteriol. 170, 5848-5854.
14. Kreis, M., Williamson, M., Buxton, B., Pywell, J., Hejgaard, J. and Sevendsen, I. 1987. Primary Structure and Differential Expression of β -amylase in Normal and Mutant Barleys: Eur. J. Biochem., 169, 517-525.
15. Mikami, B., Aibara, S., and Morita, Y. 1980. Chemical Modification of Sulfhydryl Groups in Soybean β -Amylase: J. Biochem., 88, 103-111.
16. Mikami, B., Aibara, S. and Morita, Y. 1982. Distribution and Properties of Soybean β -Amylase Isozymes: Agric. Biol., 46, 943-953.
17. Mikami, B. and Morita, Y. 1983. Location of SH groups along the Polypeptide Chain of Soybean β -Amylase: J. Biochem., 93, 777-786.
18. Mikami, B. 1984. Studies on Structure and Function of Soybean β -

amylase by Chemical Modification of Sulfhydryl Groups.

19. Mikami, B., Nomura, K. and Morita, Y. 1986. N-Terminal Sequence of Soybean β -amylase: J. Biochem. 100, 513-516.
20. Mikami, B., Morita, Y. and Fukazawa, C. 1988. Primary structure and Function of β -amylase: Seigakaku(Tokyo) 60, 211-216.
21. Mikami, B., Nomura, K., Majima, K., and Morita, Y. 1989. Structure of Soybean β -amylase and the Reactivity of its Sulfhydryl Group: Denpun Kagaku, 36, p 67-72.
22. Mikami, B., Shibata, T., Hirose, M., Aibara, S., Sato, M., Katsube, Y., and Morita, Y., 1991. X-ray Crystal structure Analysis of Soybean β -amylase. Denpun Kagaku. Vol. 38. No.2. p.147-151.
23. Minamiura, N. Iizuka, M., Ito, K and Yamamoto, T., 1991. Preparation of an Active monomer from Sweet Potato Tetrameric β -amylase in the Presence of α -Cyclodextrin. Denpun Kagaku, Vol. 38, No. 2, p.153-157.
24. Morita, Y., Aibara, S., Yamashita, H., Fumio Yagi, F., Suganuma, T., and Hiromi, K., 1975. Crystallization and Preliminary X-ray Investigation of Soybean β -Amylase. J. Biochem., 77, 343-351.
25. Morita, Y. Yagi, F. Aibara, S. and Honami Yamashita. 1976. Chemical Composition and Properties of Soybean β -Amylase. J. Biochem., 79, 591-603.
26. Morita, Y and Yagi, F. 1979. Characterization of β -amylase Isozymes in Soybean Seeds by Isoelectric Focusing. Plant & Cell physiol. 20 (4), p. 797-802.
27. Murao, S., Ohyama, K. and Arai, M. 1979. β -amylases from *Bacillus polymyxa* No. 72. Agric. Biol. Chem., 43(4), 719-726.

28. Nanmori, T., Shinke, R., Aoki, K., and Nishira, H. 1983. Purification and Characterization of β -amylase from *Bacillus cereus* BQ10-SI Spo2. *Agri. Biol. Chem.*, 47(5), 941-947 .
29. Nitta, Y. and Isoda, Y. 1989. Catalytic Site of β -amylase and Affinity Labeling: *Denpun Kagaku*, 36, 77-85.
30. Nitta, Y. 1990. Active Site and Reaction Mechanism of α - and β -Amylase: *Seikagaku(Tokyo)* 62, 273-277.
31. Nitta, Y., Momita, K., Kohno, M., Nakashima, T. and Matsumoto, Y. 1991. pH-Dependence of Soybean β -amylase-mediated reactions: *Denpun Kagaku*, 38, 159-164.
32. Nomura, K., Mikami, B. and Morita, Y. 1986. Interaction of Soybean β -amylase with Glucose: *J. Biochem.*, 100, 1175-1183.
33. Nomura, K., Mikami, B. and Morita, Y. 1987. Partial Amino Acid Sequences around Sulfhydryl Group of Soybean β -amylase: *J. Biochem.* 102, 341-349
34. Nomura, K., Mikami, B., Nagao, Y. and Morita, Y. 1987. Effect of Modification of Sulfhydryl Group in Soybean β -amylase on the Interaction with Substrate and Inhibitors: *J. Biochem.* 102, 333-340.
35. Shinke, R., Nishira, H. and Mugibayashi, N. 1974. Isolation of β -amylase Producing Microorganisms: *Agric. Biol. Chem.*, 38, 665-666.
36. Thoma, J.A., Spradlin, J.E. and Dygert, S. 1971. Plant and animal amylase in the enzymes, vol.5(Boyer, P.D., ed.), academic press, New York and London, p.115-189.
37. Toda, H. 1989. Sequence Analysis of Sweet Potato β -amylase: *Denpun Kagaku*, 36, 87-101
38. Visuri, K. and Nummi, M. 1972. Purification and Characterization

- of Crystalline β -Amylase from Barley. Eur. J. Biochem. 28, 555-565.
39. Vretablád, P. 1974. Immobilization of Ligand for Biospecific Affinity Chromatography via their Hydroxyl Groups. The Cyclohexaamylase- β -Amylase System. FEBS LETTERS, vol.47, 86-89.
40. 金贊植 外 4 人. 1991. 日本農藝化學會大會要旨集
41. 相原, 雄平, 森田, 茂夫. 植物酵素. 蛋白質 硏究法(別冊: 蛋白質. 核酸. 酵素) 76:2 p.434-437.
42. 竹田, 檜作, 進, 靖史. 植物酵素. 蛋白質 硏究法(別冊: 蛋白質. 核酸. 酵素) 76:2 pp 448-443.
43. 井田, 正二. 植物酵素. 蛋白質 硏究法(別冊: 蛋白質. 核酸. 酵素) 76 : 2 p 187-195.



감사의 글

부족한 저에게 아낌없는 격려와 보살핌으로 본 논문이 완성될 수 있도록 이끌어 주신 강 순선교수님께 존경과 깊은 감사를 드립니다.

바쁘신 중에도 논문심사에 많은 시간과 조언을 해주신 고 정삼교수님과 논문심사는 물론 부족한 저에게 아낌없는 보살핌으로 실험을 지도해주신 김 찬식교수님께 감사 드립니다.

학문적 엄격함속에서도 지금까지 사랑과 격려로서 가르침을 주신 유 장걸 교수님, 미국에 계신 류 기중교수님, 그리고 언제나 자상한 염려와 격려를 주신 현 해남교수님께 깊은 감사드립니다.

그리고 지난 수년동안 실험실 생활에서 많은 조언을 해주신 고 정은선생님, 송 성준선생님께 감사드리며, 특히 어려울때 마다 저에게 많은 격려를 해주신 임 한철선배님과 실험이 진행되도록 협조해주신 김 영조선배님께 감사드립니다.

또한 함께 생활하며 고락을 같이한 박 광석선생님, 문 치택선생님, 식품영양학과의 김 기홍선생님께 이 글을 빌어 감사드립니다.

특히 본 실험 수행과정에서 큰 도움을 준 김 동건군과 논문편집에 도움을 준 김 양록씨에게 우정의 마음을 전합니다. 그리고 실험수행에 도움을 준 대학원 동료학우와 후배들에게 고마움을 드립니다.

끝으로, 한 없는 사랑으로 보살펴 주신 아버님, 어머님께 깊은 감사를 드리며 이 논문을 올립니다.