

Hansenula polymorpha 알코올 산화효소의 기질특이성 및 안정성 분석

제갈향 · 조현영 · 김은호 · 공광훈*

중앙대학교 자연과학대학 화학과

(2003. 11. 20 접수, 2003. 12. 5 승인)

Analysis on the Substrate Specificity and Stability of *Hansenula polymorpha* Alcohol Oxidase

Jegal Hyang, Hyun-Young Cho, Eun-Ho Kim and Kwang-Hoon Kong*

Department of Chemistry, Chung-Ang University, Seoul, 156-756, Korea

(Received Nov. 20, 2003, Accepted Dec. 5, 2003)

요약 : 효모 *Hansenula polymorpha*로부터 탄소원으로 0.5% 메탄올을 이용하여 알코올 산화효소를 대량 유도 발현하였다. 발현 유도된 *Hansenula polymorpha* 알코올 산화효소는 두 단계의 컬럼 크로마토그래피를 통하여 전기영동에서 단일밴드로 정제하였다. 정제한 효소는 주로 일차 지방족 알코올을 산화시키며, 에탄올에 대해 가장 높은 기질특이성을 보였다. 이 효소가 촉매하는 에탄올 산화반응의 최적 pH는 8.5 이었으며, 최적 온도는 50 °C를 나타내었다. 효소의 T_m 값은 약 52 °C 이었으며, 65 °C에서도 완전히 불활성화 되지 않았다. 또한 효소는 변성제와 쥘간의 비교적 장기간 보전에 대해서도 안정하였다. 이 효소는 알코올 측정을 위한 효소학적 방법 및 알코올과 알데히드의 공업적 생산에 이용될 수 있다.

Abstract : An alcohol oxidase from *Hansenula polymorpha* was strongly induced when cells were grown with 0.5% methanol supplementation as the carbon source. The induced *Hansenula polymorpha* alcohol oxidase was purified to electrophoretic homogeneity by using DEAE-Sephacel and Mono Q column chromatographies. The enzyme oxidized mainly primary aliphatic alcohols and exhibited high substrate specificity towards ethanol and methanol. The activity of the enzyme optimally proceeded at pH 8.5 and 50 °C. The midpoint of the temperature-stability curve for the enzyme was approximately 52 °C and the enzyme was not completely inactivated even at 65 °C temperature. The enzyme showed resistance toward detergents and highly stable over 7 weeks of storage condition. This *Hansenula polymorpha* alcohol oxidase may be useful for the enzymatic determination of alcohol and for the industrial production of alcohols and aldehydes.

★ Corresponding author

Phone : +82+(0)2-820-5205 Fax : +82+(0)2-825-4736

E-mail : khkong@cau.ac.kr

Key words : alcohol oxidase, *Hansenula polymorpha*, inducible expression, substrate specificity, stability

1. 서 론

알코올 산화효소 (alcohol oxidase, EC 1.1.3.13)는 생체 내 알코올 대사에 중요한 효소로, 가역적으로 저급 알코올을 산화하여 알데히드와 과산화수소를 생성하는 반응을 촉매한다.¹² 이 효소는 보조인자로써 flavin adenin dinucleotide (FAD)를 포함하고 있는 flavoprotein으로 생리적 기능은 메탄올의 산화이지만, 사슬이 짧은 다른 저급 알코올도 산화시킬 수 있다.

미생물 중 탄소 공급원으로 메탄올을 이용하는 것에 *Pseudomonas sp. AM1*, *Pseudomonas sp. PRL-W4*, *Pseudomonas sp. M27*, *Hypomicrobium unigare*, *Methanomonas methanooxidans*, *Pseudomonas methanica*, *Methlococcus capsulatus* 등이 있으며 박테리아에서 가장 먼저 발견되었다. 탄소 공급원으로 메탄올을 이용하는 효모에는 *Kloeckera sp.*, *Candida N-16*, *Candida boidinii*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, *Torulopsis candida* 등이 있으며, *Hansenula polymorpha* 와 *Pichia pastoris* 및 *Candida boidinii* 유래 알코올 산화효소 유전자의 염기서열들이 밝혀져 있다.^{3,5} 이러한 연구에도 불구하고 지금까지 알코올 산화효소의 생화학적 특성과 안정화 기구에 관해서는 거의 밝혀진 것이 없다.

알코올 산화효소는 그 촉매 기능에 기인하여 다양한 분야에 응용되고 있다. 알코올을 산화하는 효소의 활성화는 식품공업에서 향신 첨가물로 사용되는 아세트알데히드 등 각종 알데히드의 생전환에 이용되고 있으며, 음주 운전의 규제, 의료분야 공업공정 및 식품제조 공정 등에서 요구되는 알코올 측정을 위한 바이오센서에도 이용되고 있다. 특히 알코올 산화효소를 고정화한 막과 과산화수소 또는 산소전극을 조합한 센서가 연구되고 있다.^{6,8} 또한 알데히드를 환원하는 효소의 촉매기능은 키랄 알코올을 비롯한 각종 알코올의 생공업적 생산 등에 이용될 수 있다. 이러한 연구는 *Candida boidinii*의 알코올 산화효소에서 많은 연구가 보고되고 있다.^{9,10} 특히 포름알데히드와 아세트알데히드는 화학공업에서 가장 기본적인 화합물로 매년 세계적으로 상당량 생산되고 있다. 이들 화합물을 생산하는 화학합성에서는 고온(500~600 °C)과 고압을 필요로 하기 때문에 최근에는

생리적 온도에서 합성시키는 발효 공정 및 효소를 이용한 생합성이 보다 친환경적이기 때문에 주목을 받고 있다.¹¹ 그러나 생합성 과정의 주체인 알코올 산화 효소의 가격이 비싸며 효소자체가 안정하지 못해 쉽게 활성을 잃어버리는 중대한 문제점이 있다. 따라서 각종 알코올 및 알데히드의 생공업적 생산과 알코올 바이오센서에 알코올 산화 효소를 적용하기 위해서는 효소의 발현 양을 최대로 할 수 있는 발현조건과 정제 방법을 설정하는 연구 및 효소에 대한 기질특이성과 안정성 조사는 필요하다.

본 연구에서는 *H. polymorpha*로부터 알코올 산화효소를 대량 발현을 유도하였으며, 발현된 효소를 간단히 정제할 수 있는 정제법과 정제된 효소의 기질특이성 및 안정성을 상세히 조사하였다.

2. 실험재료 및 방법

2.1. 사용 균주 및 실험재료

H. polymorpha (ATCC 26012)는 한국 미생물 보존센터로부터 동결 건조된 상태의 분말상태로 분양 받아 사용하였다. Yeast extract와 Bacto[®] peptone은 Difco Laboratories (Detroit, USA)의 제품을, 2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), horseradish peroxidase (1000 U), DL-dithiothreitol은 Sigma사 (St. Louis, USA)의 제품을 구입하여 사용하였다. DEAE (Diethylaminoethyl)-Sephacel 음이온 교환수지와 Mono Q HR 5/5는 Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden)의 제품을 사용하였으며, Coomassie brilliant blue R-250는 Polyscience Inc. (Warrington, USA)의 제품을 사용하였다. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 분자량 marker는 Bio-Rad사 (Richmond, USA)에서 구입하여 사용하였다. 그 외 모든 시약들은 일급 및 특급 시약을 사용하였다.

2.2. *H. polymorpha* alcohol oxidase의 유도 발현 및 정제

H. polymorpha 를 멸균된 액체 YNB배지로 37 °C에서 16~24시간 배양하였다. YNB 배지의 조성은 0.7% yeast nitrogen base without amino acid, 0.1% yeast extract,

0.05% bacto peptone 이었다 알코올 산화효소의 대량발현을 유도하기 위하여 메탄올의 양 (0.5~2%)을 변화시켜 배양하였다. 배양된 *H. polymorpha* 세포를 4 °C에서 10,000 g로 10분 동안 냉동 원심 분리하여 집균하였다. 집균한 세포는 우선 효소 처리법을 하기 위하여 50 mM tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 1 M sorbitol, 30 mM DL-dithiothreitol을 포함하는 zymolyase 완충용액 (세포의 동량)에 15분간 담구어 둔다. 세포를 포함한 완충용액은 4 °C에서 15,000 g로 5분 동안 냉동 원심 분리하여 집균한 후, 세 배의 zymolyase 완충용액에 다시 15분간 담구어 방치하였다. 이 용액에 효소 zymolyase (200 U)를 첨가하고 30 °C에서 40분간 50 rpm으로 혼합하였다. 효소 (zymolyase)로 처리한 용액을 초음파 파쇄기를 이용하여 30~40 watts, 12% amplitude의 실험조건으로 4 °C에서 15~20분간 세포막을 파괴한 다음, 4 °C에서 20,000 rpm으로 60분 동안 원심분리하여 그 상층액을 얻어 crude extract로 하였다. Crude extract는 DEAE-Sephacel 컬럼 크로마토그래피법과 Mono Q 컬럼 크로마토그래피법에 의하여 정제하였다. DEAE-Sephacel 음이온 교환수지를 컬럼 (16×400 mm)에 충전시킨 후, 50 mM potassium phosphate 완충용액 (pH 7.5)으로 여러 번 세척하고 평형을 시켰다. 평형시킨 컬럼에 원심 분리한 조효소를 흡착시켰다. 불필요한 단백질을 제거하기 위해 같은 완충용액으로 충분히 세척한 다음, 1 M NaCl을 이용하여 linear gradient 방식으로 용출하였다. 이 때 유출속도는 0.25~0.75 mL/min으로 하였고, 용출액은 5 mL씩 100개의 시험관에 받았다. 용출된 분획 중 알코올 산화효소 활성을 갖는 분획을 모아서 50 mM potassium phosphate 완충용액 (pH 7.5)에 3회 투석하였다. 투석한 활성 분획을 50 mM potassium phosphate 완충용액 (pH 7.5)으로 평형시킨 Mono-Q HR 5/5 컬럼에 흡착시켰다. 같은 완충용액으로 컬럼을 충분히 세척한 다음, 0-500 mM NaCl을 이용하여 linear gradient 방식으로 0.5 ml/min의 속도로 용출하였다. 활성 분획만을 모아 50 mM potassium phosphate 완충용액 (pH 7.5)으로 투석하였다. 이렇게 정제된 효소는 효소학적 특성 실험에 사용되었다. 정제된 효소의 순수도는 SDS-PAGE로 확인하였다. 모든 정제과정은 4 °C 또는 얼음 위에서 실시하였다.

2.3. 효소의 활성 측정

알코올 산화효소의 활성도 측정은 Tani 등의 방법¹¹에 따라 실시하였다. 표준 활성 반응물인 2 mM ABTS,

0.003% hydrogen peroxide, 1% methanol, 250 U peroxidase를 포함한 100 mM potassium phosphate 완충용액 (pH 7.5)과 정제된 효소를 넣어 1 mL가 되도록 하였다. 효소 활성 반응의 생성물인 H₂O₂의 양을 UV/VIS Spectrophotometer를 이용하여 405 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. ABTS의 molar absorbance coefficient는 36,800 M⁻¹·cm⁻¹이며, 알코올 산화효소 활성의 1 unit은 표준 활성 반응 조건에서 분당 1 μmol의 H₂O₂ 생성을 촉매하는 효소의 양으로 정의하였다. 단백질 농도는 Bradford 방법¹²에 의해 측정하였다. Bovine serum albumin을 표준단백질로 사용하여 595 nm에서의 흡광도를 측정하여 단백질의 농도를 계산하였다.

2.4. 효소의 기질 농도의 영향

표준 활성 반응 혼합물에 ethanol의 최종농도를 0.5 mM부터 50 mM까지 변화시켜, 정제된 효소에 대한 기질 농도의 영향을 조사하였다. Michaelis-Menten 상수 (K_m)와 최대속도 (V_{max})는 Lineweaver-Burk plot에 의하여 결정하였다.

2.5. 기질 특이성

Methanol, ethanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, isoamyl alcohol, cetyl alcohol 및 2,2,2-trichloroethanol을 기질로 사용하여 효소의 기질 특이성을 조사하였다. 표준 활성 반응 혼합물에 각각의 최종농도가 4 mM이 되게 하여 표준활성 측정방법에 따라 정제된 효소에 대한 활성을 측정하였다.

2.6. 최적 pH와 최적 온도

효소 활성에 미치는 pH의 변화의 영향을 측정하기 위하여 pH 3.5~5.5 범위는 sodium acetate 완충용액을, pH 5.5~7.5 범위는 potassium phosphate 완충용액을, pH 7.5~8.5 범위는 tris-HCl 완충용액을, 그리고 pH 8.5~10.5 범위는 sodium carbonate-bicarbonate 완충용액을 조절하여 사용하였다. 표준활성 반응조건에서 100 mM potassium phosphate (pH 7.5) 완충용액 대신에 각각의 pH의 완충용액을 최종 농도가 20 mM이 되도록 가하여 활성을 측정하였다. 효소 활성에 대한 온도의 효과를 알아보기 위하여 표준활성 반응조건에서 항온기를 이용하여 온도를 30 °C에서 80 °C까지 변화시키면서 활성을 측정하였다.

2.7. 효소의 안정성

효소의 열에 대한 안정성을 조사하기 위하여 효소 액을 30 °C에서 80 °C까지 각각의 온도에서 30 분 동안 가열하고 얼음에서 1분 동안 냉각한 후 표준활성 반응조건에서 효소의 남아 있는 활성을 측정하였다. 변성 시약에 대한 효소의 영향을 조사하기 위해 urea, guanidine hydrochloride를 사용하여 이 들 시약들에 대한 효소의 안정성을 조사하였다. 효소 액에 각각의 농도로 제조한 변성시약을 첨가하여 1시간이 경과한 후, 표준 활성 반응 조건으로 효소에 남아 있는 활성을 측정하였다.

또한 효소를 장기간에 걸쳐 보관하면서 안정성을 조사하였다. 효소를 50 mM potassium phosphate 완충용액 (pH 7.5)에 각각 20% glycerol을 넣은 것을 장기간 보관하면서 남아 있는 효소의 활성을 측정하였다. 동일한 효소를 준비하여 4 °C와 25 °C에 같은 조건으로 보관하면서 남아 있는 활성을 측정하였다.

2.8. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

Laemmli의 방법¹³에 따라 12.5% SDS-polyacrylamide 겔을 사용하여 전기영동을 하였으며, Coomassie brilliant blue R-250 (Sigma, St. Louis, USA)으로 염색하였다. 이때 분자량 marker 단백질로 phosphorylase B (92.5 kDa), bovin serum albumine (66.2 kDa), ovalbumin (45.0 kDa), soybean trypsin inhibitor (21.5 kDa) 및 lysozyme (14.4 kDa)을 포함하고 있는 SDS 분자량 표준마커 (Bio-Rad, USA)를 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. *H. polymorpha* 알코올 산화효소의 정제

효모 균주 *H. polymorpha*를 YNB배지에 37 °C에서 약 16~24시간 전배양하였다. 전배양한 1%의 균주와 0.5~2%의 메탄올로 유도하여 대량 발현의 조건을 조사한 결과 0.5%의 에탄올로 배양시킨 균주에서 알코올 산화효소가 가장 높게 유도되었다. 발현 유도된 *H. polymorpha* 알코올 산화효소는 SDS-PAGE와 활성 측정으로 판단할 때, 세포 단백질의 약 50% 이상을 차지할 정도로 매우 높게 발현되었다. Veenhuis 등의 발표된 논문¹⁴에 의하면 알코올 산화효소는 발현 유도에 의해 세포 단백질의 30~40% 이상을 차지할 정도로 발현될 수 있다고 하였다. 따라서 본 연구의 유도 발현 결과는 유도 발현의 최적 조건을 검토함으로써 지금까지의 연구

들보다 10~20% 정도 알코올 산화효소를 더 많이 발현하였다. 대량 발현된 균체를 zymolase로 처리 후 세포 파쇄기 (30~40 watt, 12% amplitude)로 4 °C에서 15~20분 동안 세포막을 파괴하였다. 이 세포액을 4 °C에서 20,000 rpm으로 20분간 원심 분리하여 얻은 상등액인 세포 추출액을 crude extract로 하였다. *H. polymorpha* 알코올 산화효소의 정제 결과를 Table 1에 나타내었다. Crude extract는 DEAE-Sepharose 컬럼 크로마토그래피와 Mono Q 컬럼 크로마토그래피로 전기영동에서 단일밴드로 정제하였으며 비활성은 10.23 U/mg으로 약 9배 증가하였으며, 수율은 약 30%를 나타내었다 (Table 1).

Table 1. Purification of an alcohol oxidase from *H. polymorpha*

Purification step	Total activity (Unit)	Total protein (mg)	Specific activity (Unit/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Crude extract	1036	900	1.15	100	1
DEAE-Sepharose	405	53	7.64	39	7
Mono Q	307	30	10.23	30	9

(kDa)

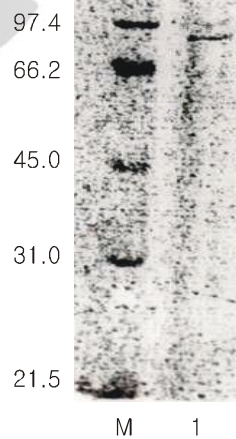


Fig. 1. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis analysis of the *H. polymorpha* alcohol oxidase under denaturing conditions. Denaturing SDS-PAGE was carried out using the method of Laemmli in 12.5% gel. Coomassie brilliant blue R-250 was used for staining. Lane M, molecular weight standard marker; lane 1, the purified alcohol oxidase.

정제된 효소의 알코올에 대한 비활성은 *Kloeckera* 에서 정제된 알코올 산화효소 (11.00 U/mg)의 비활성과 유사하였다.² 정제된 효소의 분자량은 SDS-polyacrylamide 겔 전기영동에서 75 kDa으로 확인되었다 (Fig. 1).

3.2. *H. polymorpha* 알코올 산화효소의 기질특이성 및 생화학적 특성 분석

여러 가지 종류의 알코올에 대한 효소의 기질 특이성을 Table 2에 나타내었다. *H. polymorpha* 알코올 산화효소는 에탄올과 메탄올에 대해서 높은 활성을 보인 반면, 다른 알코올에 대한 활성은 매우 낮거나 측정되지 않았다. 즉 *H. polymorpha* 알코올 산화효소는 사슬이 짧은 일차 알코올에 대해 높은 활성을 보인 반면에, 긴 사슬의 일차 알코올이나 불포화 알코올에서는 낮은 활성을 보였으며 가지 사슬 알코올이나 이차 알코올은 기질이 되지 못한다는 사실을 알 수 있었다. 이러한 사실은 *H. polymorpha* 알코올 산화효소의 기질 결합 부위는 적은 pocket 으로 이루어져 있어 큰 알코올에 대한 결합이 어렵다는 사실을 시사한다.

Table 2. Substrate specificity of the *H. polymorpha* alcohol oxidase

Substrate	Specific activity (Unit/mg)	Relative activity (%)
1-Butanol	0.04±0.002	0.4±0.02
2-Butanol	ND ^a	-
3-Butanol	ND ^a	-
Crotyl alcohol	0.68±0.03	6.6±0.29
Ethanol	10.23±0.51	100.0±4.99
Isoamyl alcohol	0.02±0.001	0.2±0.01
Methanol	9.48±0.32	92.7±3.12
1-Propanol	0.21±0.02	2.1±0.20
2-Propanol	0.01±0.001	0.1±0.01
2,2,2-Trichloroethanol	0.02±0.002	0.2±0.02

ND^a, not detected.

The values are shown as means ±S.D.

H. polymorpha 알코올 산화효소 활성에 대한 기질농도의 효과는 상온에서 조사되었다. 에탄올에 대한 *H. polymorpha* 알코올 산화효소의 Michaelis-Menten 상수와 최대 속도는 Lineweaver-Burk plot에 의해 결정하였다 (Fig. 2). 에탄올에 대한 *H. polymorpha* 알코올 산화효소

의 K_m 값은 6.66 mM이며, V_{max} 값은 17.24 U/mg이었다. 에탄올에 대한 다른 종 알코올 산화효소의 K_m 값은 *Kloeckera* 알코올 산화효소의 에탄올에 대한 K_m 값은 2.5 mM로 *H. polymorpha* 알코올 산화효소의 K_m 값보다 낮아 에탄올에 대한 친화력이 *H. polymorpha* 알코올 산화효소보다 컸다.² 반면에 *Basidiomycete* 알코올 산화효소의 에탄올에 대한 K_m 값은 10 mM로 *H. polymorpha* 알코올 산화효소의 K_m 값보다 높아 에탄올에 대한 친화력이 *H. polymorpha* 알코올 산화효소보다 작았다.¹

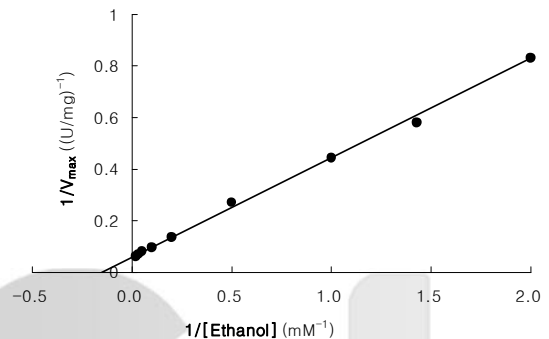


Fig. 2. Lineweaver-Burk plot of ethanol oxidation by the *H. polymorpha* alcohol oxidase. The concentration of ethanol was varied in the range of 0.5 ~50 mM. Michaelis-Menten constant (K_m) and the maximum velocity (V_{max}) of the alcohol oxidase were determined Lineweaver-Burk plot.

H. polymorpha 알코올 산화효소의 에탄올 산화반응에 대한 pH의 효과를 조사하였다 (Fig. 3). *H. polymorpha* 알코올 산화효소의 최적 활성은 pH 8.5에서 나타났다. 반면에 pH 3.5 이하에는 활성이 나타나지 않았으며, pH 10에서도 최대 효소 활성의 80%를 나타내었다. 따라서 이 효소는 낮은 pH에서 보다는 높은 pH에서 활성이 높게 나타남을 알 수 있었다. 이 효소의 최적 pH는 *Kloeckera* 알코올 산화효소 (pH 8.0)의 효소와 유사하였다.² 반면에 *Basidiomycete* 알코올 산화효소에서는 6.5 ~ 9.0의 넓은 최적 pH를 보인다고 보고되었다.¹⁵ 효소 활성에 대한 온도의 효과를 알아보기 위하여, 효소활성을 30 °C에서 80 °C까지 조사한 결과를 Fig. 4A에 나타내었다. *H. polymorpha* 알코올 산화효소의 최적 온도는 50 °C에서 나타났다. *H. polymorpha* 알코올 산화효소는 30 °C에서도 효소 활성의 약 42%를 나타낸 반면에 75 °C

이상에서는 10% 이하의 활성을 나타내었다.

K C I

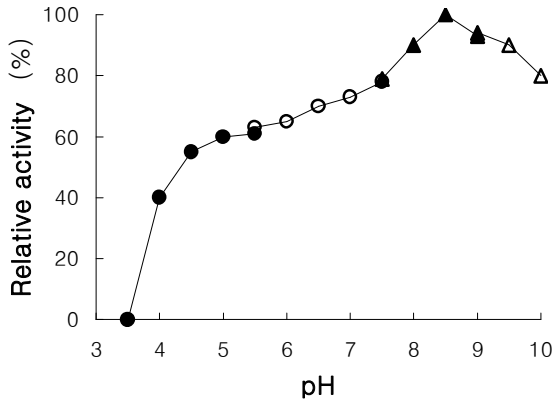


Fig. 3. Effect of pH on the activity of the *H. polymorpha* alcohol oxidase. Optimum pH of the enzyme was determined by using the following buffers: pH 3.5~5.5, 100 mM sodium acetate (●); pH 5.5~7.5, 100 mM potassium phosphate buffer (○); pH 7.5~9.0, 100 mM Tris-HCl (▲); pH 9.0~10.0, 100mM sodium carbonate-bicarbonate buffer (△). The maximum activity (10.23 Unit/mg) was expressed as 100%.

3.3. *H. polymorpha* 알코올 산화효소의 안정성

H. polymorpha 알코올 산화효소의 열안정성 실험결과를 Fig. 4B에 나타내었다. 효소의 T_m 값은 약 52 °C이었다. 이 효소는 45 °C에서는 30분까지도 활성을 그대로 유지하였으며, 50 °C부터 서서히 감소하기 시작하여 55 °C부터는 급격히 감소 (60% 감소)하였다. 65 °C에서도 10% 정도의 활성이 남아있었으며, 75 °C에서조차도 완전히 활성을 잃지 않았다. 이상의 결과로부터 *H. polymorpha* 알코올 산화효소는 비교적 열에 안정하다는 사실을 알 수 있었다.

H. polymorpha 알코올 산화효소의 변성제인 urea에 대한 안정성 실험에 대한 결과는 Fig. 5A에 나타내었다. 0~0.1 M의 urea를 첨가한 경우 효소 활성에 영향을 미치지 않을 정도로 90%이상의 효소 활성을 보였으나 0.1 M 보다 높은 농도의 urea에서는 효소 활성이 급격히 감소하더니, 약 0.32 M에서는 본래 활성의 50% 정도였다. 한편 *H. polymorpha* 알코올 산화효소의 guanidine hydrochloride에 대한 안정성 실험에 대한 결과는 Fig. 5B에 나타내었다. 0~2 M의 농도에서는 효소 활성이 서서히 감소하나 약 2 M 이상의 농도부터는 효소 활성이 급격히 감소하였다. *H. polymorpha* 알코올 산화효소의 활성이 50%로 줄어든 guanidine hydrochloride의 농도는 약 2.35 M이었다.

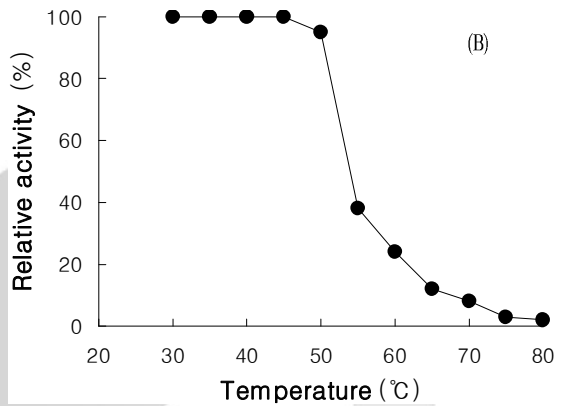
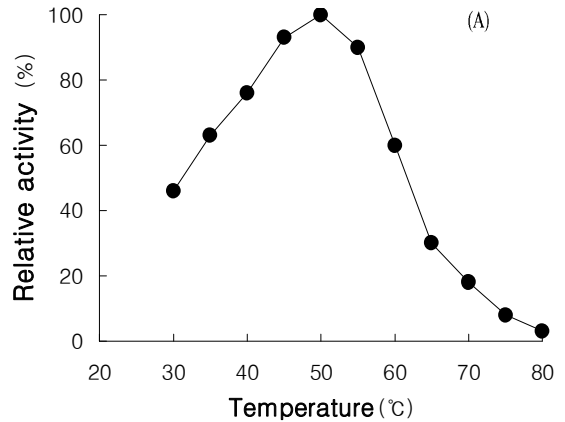


Fig. 4. Effects of temperature on the activity of the *H. polymorpha* alcohol oxidase. (A) Optimum temperature. In order to understand the effect of temperature, various temperature range, from 30 to 80 °C, of reaction mixture were investigated. (B) Heat stability. Thermal stability was determined by using the enzyme with a protein concentration of 0.1 mg/mL. Remaining alcohol oxidase activities were assayed after incubation for 10 min at each temperature.

알코올 바이오 센서 등에 이용하기 위해서 효소는 장기간 보관이 가능하여야 한다. 효소를 장기간에 걸쳐서 보관하면서 잔존활성을 측정된 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 4 °C와 25 °C에서 각각 2가지의 보관 조건으로 7주간 보관하면서 활성을 측정하였다. 그 결과 4 °C에서 50 mM potassium phosphate 완충용액 (pH 7.5)에 효소를 보관한 경우에는 7주 후에도 80% 이상의 활

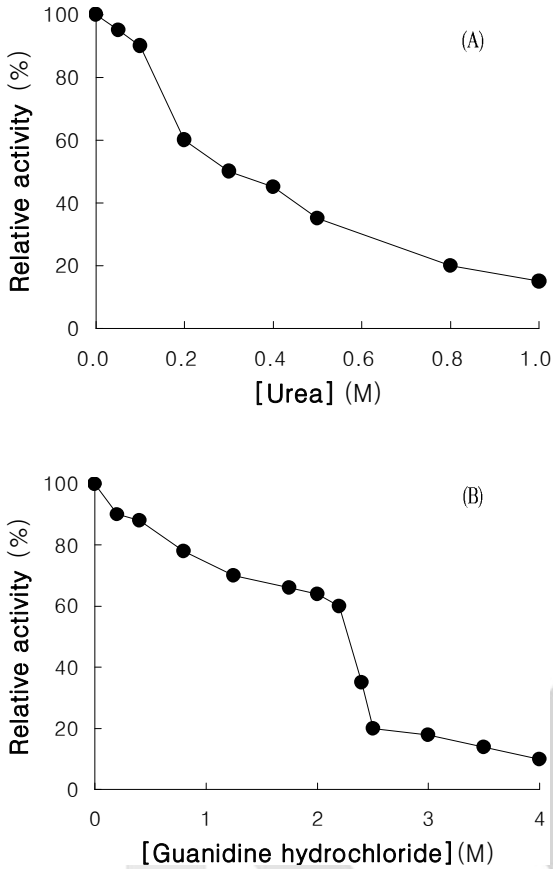


Fig. 5. Tolerance of the *H. polymorpha* alcohol oxidase towards denaturing agents. (A) Effect of urea on enzyme activity. The activity was assayed with the indicated concentrations of urea. (B) Effect of guanidine hydrochloride on enzyme activity.

성을 보여주었다 (Fig. 6A). 그러나, 20% glycerol을 첨가한 완충용액에서 보관한 효소는 7주째의 활성이 80% 이하로 떨어졌으며, 7주째는 약 60% 정도의 활성을 유지하였다. 한편 25 °C에서 완충용액에 효소를 보관한 경우에는 3주째까지 80% 이상의 높은 활성을 보였으나, 3주가 지나자 20% 정도밖에 활성을 나타내지 못하였다 (Fig. 6B). 25 °C에서 20% glycerol을 첨가한 완충용액에서 보관한 효소는 2주가 넘자 이미 50% 정도의 활성을 보였고, 5주째부터는 12% 이하의 활성을 보이며 더 이상 감소하지 않았다. 결론적으로 상온에서보다는 4 °C에서 보관하는 것이 더 안정하며 glycerol을 첨가하지 않은 완충용액에 효소를 보관했을 때가 장기간 안정하였다.

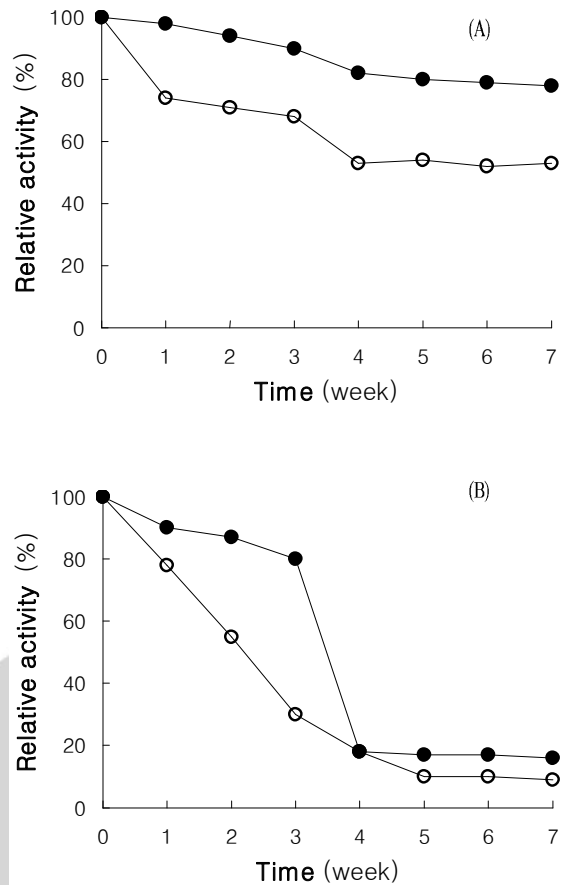


Fig. 6. Stability of the *H. polymorpha* alcohol oxidase over 7-weeks. The enzyme was incubated at a protein concentration of 0.1 mg/ml in 50 mM potassium phosphate buffer (●) and 50 mM potassium phosphate buffer containing 15% glycerol (○), respectively. The remaining activity was assayed at each time period. (A) The enzyme was incubated at 4 °C. (B) The enzyme was incubated at 25 °C.

4. 결 론

이상의 결과로부터 본 연구에서는 효모 균주인 *Hansenula polymorpha*로부터 알코탄소원으로 0.5% 메탄올을 이용하여 세포 단백질의 50% 까지 대량 유도 발현시켰다. 발현된 *H. polymorpha* 알코올 산화효소는 DEAE-Sphacel 과 Mono Q 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 30%의 높은 수율로 정제법을 확립하였다. 정제

한 효소는 에탄올에 상대적으로 가장 높은 활성을 나타내었으며, 이 효소는 열과 변성제에도 안정하였으며, 7 주간의 비교적 장기간 보관에도 안정하였다. *H. polymorpha* 알코올 산화효소는 알코올 바이오 센서 및 알코올과 알데히드의 공업적 생산에 응용할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2003년도 중앙대학교 학술연구비 지원에 의한 것임.

참고 문헌

1. F. W. Janssen and H. W. Ruelius, *Biochim. Biophys. Acta*, **151**, 330-338(1968).
2. T. R. Hopkins and F. Muller, *Proceedings of the 5th International Symposium on Microbial Growth on CI Compounds*, Dordrecht: Martinus Nijhoff. 150-157(1987).
3. A. M. Ledeboer, L. Edens, J. Maat, C. Visser, J. W. Bons and C. T. Verrips, *Nucleic Acids Research*., **13**, 3063-3042(1985).
4. Y. Sakai and Y. Tani, *Gene*, **114**, 67-73(1992).
5. P. Koutz, G. R. Davis, C. Stillman, K. Barringer, J. Cregg and G. Thill, *Yeast*, **5**, 167-177(1989).
6. T. J. Ohara, M. S. Vreeke, F. Battglini and A. Heller, *Electroanalysis* , **5**, 825-831(1993).
7. G. Markovarga, K. Johansson and L. Gorton, *J. Chromatogr.* , **660**, 153-167(1994) .
8. A. R. Vijayakumar, E. Csoregi, A. Heller and L. Gorton, *Anal. Chim. Acta.*, **327**, 223-234(1996).
9. Y. Sakai and Y. Tani, *J. Biol. Chem.*, **51**, 2617-2620(1987).
10. Y. Sakai and Y. Tani, *Appl. Environ. Microbiol.* , **54**, 485-489(1988).
11. Y. Tani, Y. Sakai, and H. Yamada, *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 2699-2706(1985).
12. M. M. Bradford, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254 (1976).
13. U. K. Laemmil, *Nature*, **227**, 680-685(1970).
14. M. Veenhuis, J. P. van Dijken, and W. Harder, *Adv. Microb. Physiol.*, **24**, 1-82(1983).