**실험 제목 : 온도와 pH에 따른 효소 활성**

**1. 서론**

(1) 실험 목표

1. 온도 변화가 효소의 반응 속도에 미치는 영향을 설명할 수 있다.

2. pH 변화가 효소의 반응 속도에 미치는 영향을 설명할 수 있다.

(2) 실험 원리 또는 배경지식

1. 효소

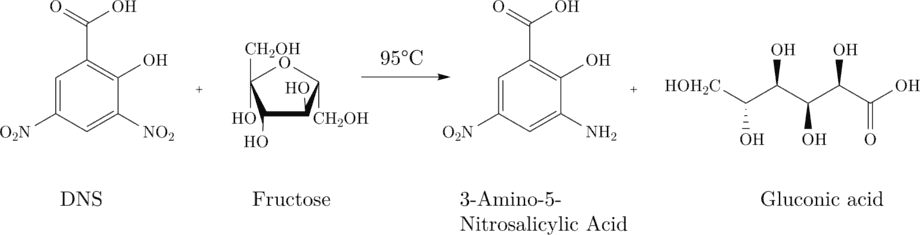
효소는 생체 내 반응에 촉매로서 작용하는 단백질로, 생체 내 화학 반응을 가속하는 역할을 가지고 있다. 효소가 작용할 수 있는 분자를 기질이라 칭하며, 기질을 생성물로 전환하는 과정을 주로 수행한다. 생체 내 거의 모든 화학 반응은 반응 속도의 통제를 위해 효소가 필요하다. 효소 역시 촉매의 일종이기 때문에 활성화 에너지를 낮추는 방법으로 반응 속도를 높이는데, 화학 반응에서 소모되지 않으며 반응의 평형에 영향을 주지도 않는다.[1]

2. DNS assay[2]

DNS는 환원당(Reducing sugar)와 반응하여 3-amino-5-nitrosalicylic acid를 구성한다. 그리고 이 과정에서 생성된 3-amino-5-nitrosalicylic acid는 540nm의 빛에 대한 흡광도가 높아 해당 파장 혹은 그 파장과 가까운 파장의 빛을 투과해 주어 흡광도를 측정한다면 반응 초기에 있던 환원당의 농도를 구해낼 수 있다. 이렇게 구해내는 과정을 DNS assay라 칭한다.

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |
| 3,5-Dinitrosalicylic acid(DNS) | 3-Amino-5-nitrosalicylic acid |

환원당과 DNS가 반응하는 과정은 DNS의 -NO2가 -NH2로 바뀌는 과정으로, 물과 환원당이 반응물로 사용된다. 아래 그림은 이 과정을 과당으로 예시를 들어 그린 결과이다.



**2. 실험 준비물 및 실험 방법**

(1) 실험 준비물

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 종류 | 수량 | 확인 |
| 마이크로파이펫(200μl, 1000μl)  팁, 팁 버리는 통  e-tube  e-tube rack  네임펜  96 well plate  α-amylase solution  1% starch solution  DNS solution  D.W.  pH 3, 5, 7, 9 buffer  Heat block  Plate reader  아이스 버켓(얼음 포함) | 1개씩(개인별)  1통씩(조별)  여러 개(조별)  1개(개인별)  2개(개인별)  1개(조별)  1병(e-tube)  1병(조별)  1병(조별)  1병(조별)  1병씩(조별)  5대(전체)  1대(전체)  1개(조별) | ■  ■  ■  ■  ■  ■  ■  ■  ■  ■  ■  ■  ■  ■ |

(2) 실험 방법

**1) 실험 1 - 온도에 대한 실험**

1. α-amylase 20μL를 3개의 e-tube에 넣고, 각각의 e-tube에 pH 7.0 buffer 90μL를 넣는다.

2. 1의 e-tube에 1% starch solution 90μL를 넣고 pipeting한다. (용액별로 팁 교체)

3. e-tube를 각각 0°C ice bucket과 37°C, 60°C heatblock에서 20분간 반응

4. 각 e-tube에 DNS solution 200μl를 첨가(pipetting), 95°C heatblock에서 5분간 반응

5. 각 e-tube에 DW 800μL를 첨가하여 희석(pipetting), 96 well plate에 200μL를 옮긴다.

6. plate reader를 이용하여 550nm의 흡광도를 측정한다.

**2) 실험 2 - pH에 대한 실험**

1. 4개의 e-tube에 각각 α-amylase 20μL와 pH 3.0, 5.0, 7.0, 9.0 buffer 90μL를 넣는다.

2. 1의 e-tube에 1% starch solution 90μL를 추가로 넣고pipeting한다. (용액별로 팁 교체)

3. e-tube를 60°C heatblock에서 20분간 반응시킨다.

4. 각 e-tube에 DNS solution 200μl를 첨가(pipetting), 95°C heatblock에서 5분간 반응

5. 각 e-tube에 DW 800μL를 첨가하여 희석(pipetting), 96 well plate에 200μL를 옮긴다.

6. plate reader를 이용하여 550nm의 흡광도를 측정한다.

**\*실험 시 유의 사항**

1. e-tube는 labeling(조 이름, pH 또는 온도)하여 혼동하지 않도록 한다.

2. 사용한 DNS solution은 폐수 처리한다.

3. 마이크로파이펫 사용법 유의한다.

**3. 실험 결과**

**1) 실험 1 – 온도에 대한 실험**

본 실험에서는 반응 온도가 어떻게 설정되는지에 대해 아밀레이스가 얼마나 활성을 나타내는지 알아보고자 하였다. 아래 [표 1]은 그 결과로, 35도에서의 흡광도가 조금 더 높으나 거의 차이가 없음을 확인할 수 없다. 본 실험을 바라봤을 때 아예 반응이 일어나지 않은 것으로 예상할 수 있다. 이는 실험 단계에서의 오류가 있었음을 시사한다.

[표 1] 반응온도에 따른 흡광도의 변화를 기록한 표

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 온도(℃) | 0 | 35 | 60 |
| 흡광도 | 0.056 | 0.058 | 0.056 |

**2) 실험 2 – pH에 대한 실험**

본 실험에서는 pH가 어떻게 설정되는지에 대해 아밀레이스가 얼마나 활성을 나타나내는지 알아보고자 하였다. 아래 [표 2]는 그 결과로, pH가 5와 7인 경우에서 활성이 매우 크게 나타났으며, pH가 7인 경우에 가장 높은 활성이 나타난 것을 알 수 있었다. 실험 1과 비교했을 때 활성이 매우 크게 나타난 것으로 보아 실험 1에서 오류가 있었음을 다시 한번 확인할 수 있다.

[표 2] 반응 pH에 따른 흡광도의 변화를 기록한 표

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 온도(℃) | 3 | 5 | 7 | 9 |
| 흡광도 | 0.096 | 0.287 | 0.334 | 0.159 |

**4. 토의 및 결론**

우선 실험 1에서의 결과는 부정확하다. 거의 반응이 진행되지 않았고, DNS 용액이 자체적으로 가지고 있던 색을 고려했을 때, 환원당이 존재하지 않았음을 확인할 수 있다. 이러한 결과를 나타낼 수 있는 경우의 수는 여러 가지 있겠지만, 아예 반응이 진행되지 않은 것으로 봐서 효소가 제대로 투입되지 않은 것으로 예측할 수 있다. 효소 투입 과정에서 마이크로 피펫을 이용했는데, 이 피펫으로부터 나온 용액이 제대로 e-tube 내의 타 용액들과 섞였는지 확인하지 못했을 수 있다. 이를 방지하기 위해서는 아밀레이스 용액의 농도를 줄이고 부피를 늘려 제대로 타 용액들과 섞였는지 확인하도록 할 수 있는 방법이 있을 것이다.

본 실험은 아밀레이스의 온도와 pH에 따른 활성 정도를 파악하기 위해 수행되었다. 본 실험에서 아밀레이스의 활성 정도를 측정한 방법은 녹말을 아밀레이스가 분해할 수 있는 정도를 얻는 것으로, 녹말의 분해 산물인 엿당의 농도를 DNS assay를 통해 얻어내는 것이다. 또, 매우 강력한 염기성을 가지고 있어 아밀레이스가 DNS 첨가 이후에 반응을 멈추게 하도록 하는 효과도 가지고 있다.

아밀레이스는 일반적인 효소와 같이 반응을 위한 최적의 온도와 pH를 가지고 있다. 최적의 온도는 실험 1이 잘못 수행되어 60°C라는 정보를 제공받았고, 본 온도에서 실험을 진행하니 최적의 pH가 7임을 알 수 있었다. 즉, 본 아밀레이스가 생체 내에서 있는 환경은 높은 온도의 중성 조건일 것으로 예상할 수 있다.

실험 과정 중 흡광도를 측정하는 부분에서 Blank 용액을 사용하지 않았다. 이로 인해 온도와 pH가 바뀜에 따라 어느 환경에서 가장 반응이 잘 일어나는지는 찾을 수 있었지만 정확히 어느 정도의 반응이 진행되었는지 알기 어려웠고, 반응이 진행되지 않은 것으로 간주할 수 있는 용액이 없어 얼마나 더 많이 반응이 진행되었는지도 계산할 수 없다. 따라서 이들을 얻기 위해서는 Blank Solution이 필요하다. 이 실험에서 Blank를 얻는 방법은 효소를 제외한 모든 물질을 그대로 첨가하여 반응은 진행되지 않지만 흡광도에 영향을 줄 수 있는 환경은 모두 제공하는 것이다. 이때 pH나 온도 또한 영향을 줄 수 있어 본 실험에서 사용된 7개의 용액에 대해 모두 Blank를 따로 만드는 것이 바람직할 것이다. 이렇게 만든 Blank Solution의 흡광도를 기존 용액의 흡광도에서 빼 주는 것으로 정확히 반응으로 인해 생긴 흡광도의 차이를 얻어낼 수 있을 것이다.

**5. 생각해 보기**

(1) 효소는 pH, 온도 등에 영향을 받는가? 이유와 함께 구체적으로 서술하시오.

효소는 pH와 온도 등에 영향을 받는다. 효소는 단백질의 일종으로 아미노산들의 펩타이드 결합으로 구성된 선형적인 구조가 모여 입체 구조를 형성하여 기능을 가진 것이다. 여기서 아미노산은 전하를 띄거나, 친수성 혹은 소수성을 가지는 작용기를 가지고 있어 입체 구조를 형성하는 데에 영향을 준다.

pH가 변화하게 되면 수소 이온의 농도와 수산화 이온의 농도가 변화하게 되어 작용기들의 이온화 경향성에 큰 영향을 주고 외부로 배열되는 것을 선호하는 정도가 달라져 단백질의 입체 구조가 변화하게 되고, 활성을 크게 저하할 수 있다.

온도가 변화하게 된 환경에서는 단백질의 R기들 사이의 각종 결합들이 온도에 영향을 받아 끊어질 수 있고, 이로 인해 구조가 큰 변화를 받을 수 있다. 기본적으로 효소는 촉매이므로 온도가 올라갈수록 활성이 증가하나, 상술한 원인으로 인해 특정 온도로 도달하면 오히려 빠르게 활성이 감소한다. 이러한 현상을 변성이라고 부른다.

(2) DNS assay외에 α-amylase의 활성을 측정할 수 있는 방법을 찾고 그 원리를 서술하시오.

아이오딘-녹말 반응을 이용해 녹말의 농도를 검출하는 방법으로 활성을 측정할 수 있다. 아밀레이스는 촉매이므로 계속해서 녹말을 분해하고, 녹말을 분해하는데 걸리는 시간이 바로 아밀레이스의 활성을 나타낼 것이다. 따라서 농도가 꽤 낮은 녹말 용액을 여러 개 준비하고, 아밀레이스를 동시에 모든 용액에 첨가해 준 뒤, 특정 시간 간격으로 하나씩 아이오딘을 첨가하게 된다면 녹말이 전부 사라질 때까지의 시간을 구할 수 있다.

또다른 이용 방법은 농도가 낮은 녹말 용액에서 특정 환경에 노출된 아밀레이스를 첨가한 뒤, 일정 시간이 지난 시점에 아이오딘을 첨가하고 흡광도를 측정하는 것으로 반응한 녹말의 양을 유추할 수 있다.

**6. 참고문헌**

[1] <https://en.wikipedia.org/wiki/Enzyme>

[2] Gusakov, A. V., Kondratyeva, E. G., & Sinitsyn, A. P. (2011). Comparison of two methods for assaying reducing sugars in the determination of carbohydrase activities. International journal of analytical chemistry, 2011, 283658. <https://doi.org/10.1155/2011/283658>