

초산페닐을 리용한 리파제의 활성측정방법

김현석, 김철호, 여충일

위대한 수령 김일성동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《수학, 물리학, 화학, 생물학 같은 중요한 기초과학부문들을 적극 발전시킴으로써 나라의 과학기술수준을 더욱 높이고 인민경제 여러 분야에서 나서는 과학기술적문제들을 더 잘 풀어나가도록 하여야 하겠습니까.》(《김일성전집》 제72권 292페이지)

리파제(트리아실글리세롤아실히드롤라제, EC 3.1.1.3)는 기름과 물의 경계면에서 트리글리세리드의 물작용분해를 촉진하는 효소이다.[3] 다른 모든 효소연구와 마찬가지로 리파제연구에서도 가장 선차적으로 나서는 문제는 정확하면서도 신속하고 편리한 활성측정방법을 확립하는것이다.[2]

지금까지 세계적으로 리파제활성을 측정하기 위한 여러가지 방법들이 제기되였다.

전통적인 방법은 적정법인데 이 방법은 올리브기름을 기질로 하고 리파제에 의하여 생성된 기름산을 수산화칼륨으로 산염기적정하는 원리에 기초하고있다.[1] 다음으로 많이 리용되는 대표적인 방법은 분광광도법인데 여기서는 p -니트로페닐팔미틴산(p -NPP)이나 p -니트로페닐스테아린산과 같은 합성기질을 리용한다.[4] 분광광도법은 측정이 편리하고 신속한것으로 하여 널리 적용되고있지만 합성기질의 가격이 비싼것으로 하여 보다 값싼 기질을 리용하기 위한 연구[2]가 활발히 진행되고있다.

우리는 초산페닐(PA)을 리용하여 리파제활성을 측정하는 새로운 방법을 확립하기 위한 연구를 하였다.

재료와 방법

효소로는 *Bacillus subtilis*를 액체배양하여 얻은 리파제(BSLA)[6]를 리용하였다. 활성측정용기질로는 초산페닐(《Macklin》)과 p -니트로페닐팔미틴산(p -NPP, 《Sigma》)을, 기타 무기시약으로는 페놀(《Wako》), 트리클로로초산(TCA), Na_2CO_3 과 폴린시약(《Sigma》)을 리용하였다.

리파제활성측정의 기준적인 방법[7]으로 p -NPP분해활성을 측정하였다. 시험관에 기질(2-프로판올에 푼 p -NPP와 0.05mol/L Tris-HCl완충용액(pH 7.0)을 1 : 9의 비로 혼합한것) 2.9mL, 효소용액 0.1mL를 넣고 37°C에서 30min동안 반응시킨 후 410nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.[5] 효소활성 1U는 반응온도 37°C, pH 7.0, p -니트로페닐팔미틴산농도 0.5mmol/L에서 1min동안에 1 μ mol/L의 p -니트로페놀을 생성하는 효소의 량으로 정의하였다.

PA를 기질로 하는 리파제활성을 다음과 같이 측정하였다.

PA 217mg을 0.05mol/L Tris-HCl완충용액(pH 7.0) 100mL에 풀어 기질용액(16mmol/L)을 준비하였다. 기질 0.4mL를 시험관에 넣고 37°C에서 10min동안 예열한 다음 적당히 희석한 효소용액 0.1mL를 섞은 후 37°C에서 10min동안 반응시키고 5% TCA용액 0.5mL를 넣

어 반응을 정지시켰다. 우의 반응액 0.2mL에 3.3% Na_2CO_3 용액 2.7mL와 폴린시약 0.1mL를 넣고 30min동안 발색시킨 다음 750nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

완충용액의 종류와 농도, 기질 농도와 효소농도가 활성측정에 미치는 영향을 검토하였으며 단위시간동안의 A_{750} 증가량에 기초하여 효소활성을 평가하였다.

결과 및 논의

1) 폴린시약에 의한 페놀 및 초산페닐의 발색

초산페닐은 초산과 페놀의 에스테르화합물로서 리파제에 의하여 분해될 때 페놀이 형성되며 형성된 페놀은 폴린법으로 감도높게 정량할수 있다. 그러나 PA 역시 방향족고리가 있어 폴린시약에 의하여 발색되므로 활성측정에서 오차를 가져올수 있다. 이로부터 먼저 폴린법에 의한 페놀 및 PA검량선을 작성하였다.(그림 1, 2)

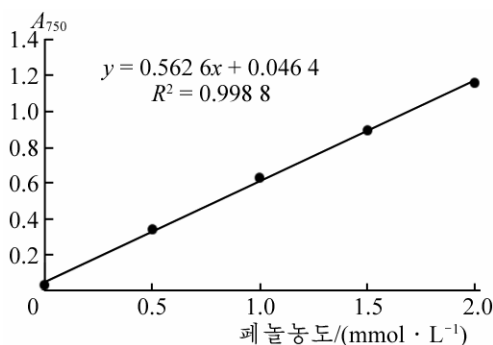


그림 1. 페놀농도에 따르는 A_{750} 의 변화

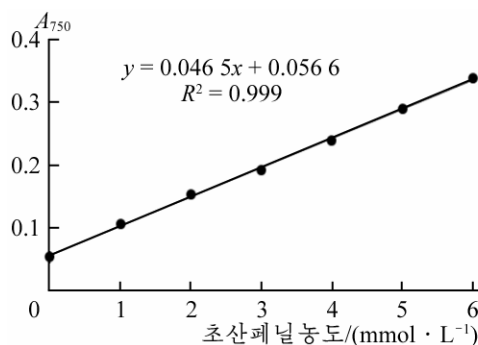


그림 2. PA농도에 따르는 A_{750} 의 변화

그림 1과 2에서 보는바와 같이 기질과 생성물이 다같이 폴린시약에 의하여 발색되었다. 그러나 PA에 비하여 페놀의 발색정도는 같은 농도에서 약 12배정도 높았다. 효소반응 속도론의 견지에서 기질의 5%이하가 생성물로 넘어갈 때의 조건에서 효소활성을 측정해야 한다는것을 고려해보면 전체적인 흡광도에서 기질변화(감소)에 의한 몫은 생성물에 비하여 0.4%이하밖에 되지 않는다. 이 정도의 오차는 계기오차(1%이하)범위에 들어가므로 그대로 리용할수 있다고 보았다.

2) 완충용액의 영향

많은 경우 완충용액의 종류와 농도가 효소활성측정에 큰 영향을 미친다. pH 7.0의 0.05mol/L 린산완충용액과 0.05mol/L Tris-HCl완충용액에 각각 PA를 16mmol/L 되게 풀고 활성을 측정하였다.(그림 3)

그림 3에서 보는바와 같이 린산완충용액보다 Tris-HCl완충용액을 리용할 때 A_{750} 값이 더 높았다.

다음으로 완충용액의 농도가 효소활성에 미치는 영향을 보았다.(그림 4)

그림 4에서 보는바와 같이 각이한 농도의 Tris-HCl완충용액에 기질을 풀고 리파제의 활성을 측정한 결과 0.05mol/L Tris-HCl완충용액에서 활성이 제일 높았으며 완충용액의 농도가 높을수록 활성이 낮아졌다. p-NPP를 기질로 하는 활성측정에서도 많은 경우 Tris-HCl완충용액을 리용하며 그 농도를 0.05mol/L로 정하고있다.[2, 6]

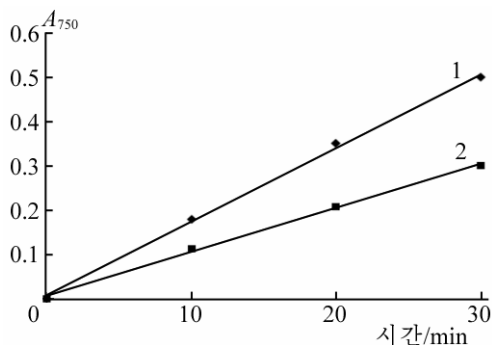


그림 3. PA 분해 활성 측정

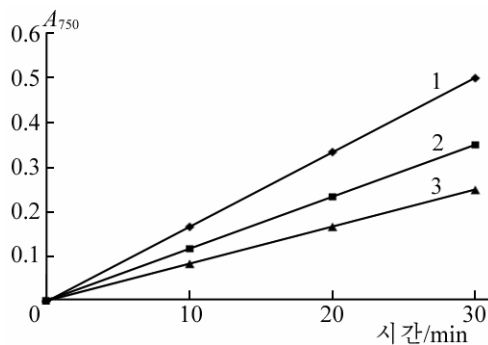


그림 4. PA 분해 활성 측정

3) 기질농도의 영향

활성 측정에서 기질 농도를 합리적으로 정하는 것이 매우 중요한 문제로 나선다. 그것은 기질량이 충분해야 효소가 자기의 활성을 충분히 나타낼 수 있으며 활성 측정에서 정확성을 보장할 수 있기 때문이다.

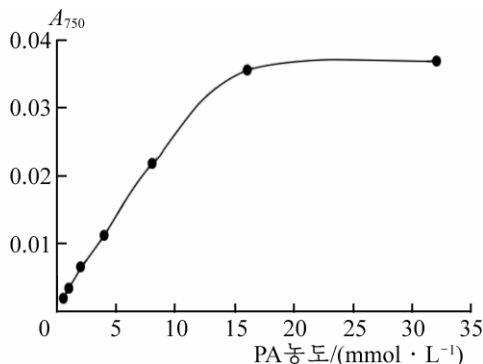


그림 5. PA 분해 활성 측정

PA 분해 활성 측정에서 기질 농도의 영향은 그림 5와 같다.

그림 5에서 보는 바와 같이 기질 농도가 16 mmol/L 이상일 때에는 효소 활성이 거의 변화되지 않았다. 기질 자체도 폴린시약에 의하여 일정하게 발색되며 기질 농도가 높아질수록 대조구의 A_{750} 값이 커진다는 것을 고려하여 기질 농도를 16 mmol/L로 정하였다.

4) 효소농도의 영향

p-NPP 분해 활성으로 2~16 U/mL의 각이한 효소 용액을 리용하여 반응 시간에 따르는 생성물의 농도(A_{750}) 증가를 관찰하였다. 효소 농도와 반응 시간에 따르는 반응 생성물의 변화는 그림 6과 같다.

그림 6에서 보는 바와 같이 효소 농도가 높아질수록 초기 반응 속도 구간은 짧아진다. 그러나 *p*-NPP 분해 활성으로 2~16 U/mL의 효소 농도에서는 반응 시간 10 min까지 반응 생성물의 양이 선형적으로 증가하였다. 이로부터 효소 농도를 *p*-NPP 분해 활성으로 16 U/mL 이하 되게 적당히 희석하여 10 min 동안 반응시키기로 하였다.

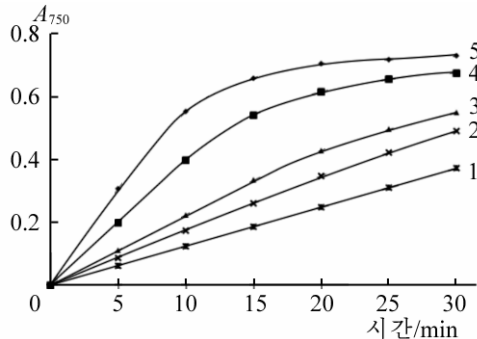


그림 6. 효소 농도와 반응 시간에 따르는 반응 생성물의 변화

1-5는 효소 농도가 각각 2, 4, 6, 10, 16 U/mL인 경우

5) 정밀도

활성 측정 방법의 실효성은 그 방법의 정밀도가 얼마나 높은가에 관계된다.

기질(PA 16mmol/L)에 *p*-NPP분해활성으로 4U/mL인 효소를 10, 20, 30min동안 반응시키고 A_{750} 을 측정하였다. 반복구를 5개로 하여 상대오차를 계산하는 방식으로 이 활성 측정방법의 정밀도를 평가하였다.(그림 7)

분석결과 상대오차는 2%이하였다. 이것은 PA를 리용한 활성 측정방법이 매우 정확한 방법이라는 것을 보여준다.

6) 활성단위

이상의 결과를 종합하면 PA분해활성에 기초한 리파제 활성 측정방법을 다음과 같이 확립할 수 있다.

16mmol/L의 PA용액(0.05mol/L Tris-HCl완충용액, pH 7.0) 0.4mL를 시험관에 넣고 37°C에서 10min간 예열한 다음 적당히 희석한(*p*-NPP분해활성으로 16U/mL이하) 효소용액 0.1mL를 넣고 10min동안 반응시킨다. 여기에 5% TCA용액 0.5mL를 넣어 반응을 정지시킨다. 반응액 0.2mL에 3.3% Na_2CO_3 용액 2.7mL와 폴린시약 0.1mL를 넣고 30min동안 발색시킨 다음 750nm에서 흡광도를 측정한다. 대조구에서는 기질용액에 5% TCA용액을 먼저 넣고 효소용액을 넣으며 나머지 조작은 실험구에서와 똑같이 한다. 효소활성 1U는 단위시간당에 1 μmol 의 페놀을 생성하는 효소량으로 정의하며 다음의 공식에 따라 효소용액의 활성(U/mL)을 구할 수 있다.

$$A_c = \frac{A - A_0}{k} \times \frac{1}{t} \times \frac{V_r}{V_e} \times n$$

여기서 A_c 는 효소활성(U/mL), A 는 시험구의 A_{750} , A_0 은 대조구의 A_{750} , n 은 효소용액의 희석배수, t 는 효소반응시간(10min), V_e 는 효소용액의 체적(0.1mL), V_r 는 반응계의 체적(1.0mL), k 는 페놀검량선의 회귀계수(그림 1에서 0.562 6)이다.

이 방법으로 측정한 *Bacillus subtilis*리파제의 PA분해활성 1U는 *p*-NPP분해활성 5.5U에 해당된다. 효소에 따라 기질친화성이 각이하며 각이한 기원의 리파제에서 PA분해활성에 대한 *p*-NPP분해활성의 비는 서로 다르게 나타날 것이다.

이로부터 PA분해활성을 리파제의 기질친화성연구의 한가지 수단으로 리용할 수 있을 것이라고 보고있다.

맺는 말

초산페닐(PA)을 기질로 하는 리파제 활성 측정방법을 다음과 같이 확립하였다.

217mg의 PA를 0.05mol/L Tris-HCl완충용액(pH 7.0) 100mL에 풀어 기질을 준비한다.

기질 0.4mL에 적당히 희석한 효소용액 0.1mL를 넣고 10min동안 반응시킨 다음 5% TCA용액 0.5mL로 반응을 정지시킨다. 이 반응액 0.2mL에 3.3% Na_2CO_3 용액 2.7mL와 폴린시약 0.1mL를 넣어 30min동안 발색시키고 A_{750} 을 측정한다. PA분해활성 1U는 1min동안에 1 μmol 의 페놀을 생성하는 효소량으로 정의한다.

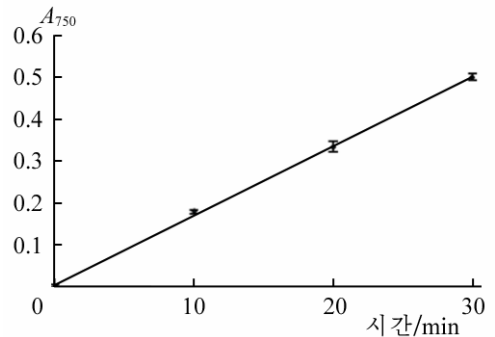


그림 7. PA분해활성 측정의 정밀도

참 고 문 헌

- [1] 최원준 등; 효소리용편람, 외국문도서출판사, 168~170, 1984.
- [2] M. A. Abd-Elhakeem et al.; American Journal of Analytical Chemistry, 4, 442, 2013.
- [3] Ömür Baysal et al.; EC Microbiology, 5, 4, 148, 2017.
- [4] Xiaojie Duan et al.; Biotechnol. Lett., 38, 2127, 2016.
- [5] Qing Peng et al.; Microbial Cell Factories, 13, 1, 2014.
- [6] Haniya Mazhar et al.; Afr. J. Biotechnol., 16, 19, 1106, 2017.
- [7] Namita Gupta et al.; Analytical Biochemistry, 311, 1, 98, 2002.

주체108(2019)년 7월 5일 원고접수

Lipase Activity Assay Method Using Phenyl Acetate

Kim Hyon Sok, Kim Chol Ho and Yo Chung Il

We established lipase activity assay method using phenyl acetate as substrate.

217mg of phenyl acetate is added into 100mL of 0.05mol/L Tris-HCl buffer (pH 7.0). 0.1mL of purified enzyme is added into 0.4mL of the reaction mixture and then is incubated at 37°C for 10 minutes. 0.5mL of 0.5% TCA was added to stop the reaction after incubation. Then 0.2mL of reaction mixture is mixed with 2.7mL of 3.3% Na₂CO₃ and is added 0.1mL of folin reagent. After 30 minutes the absorbance at 410nm is measured by spectrophotometer. One Unit of lipase activity is defined as enzyme amount releasing 1μmol of phenol per minute.

Key words: phenyl acetate, lipase, activity assay