

유전자 재조합 기술에 의하여 제조된 인간 β -carotene 15,15'-dioxygenase의 반응특성

신원필 · 장판식*

서울산업대학교 식품공학과

Characterization of Human β -Carotene 15,15'-Dioxygenase Isolated from Recombinant *Escherichia coli*

Won-Phil Shin and Pahn-Shick Chang*

Department of Food Science and Technology, Seoul National University of Technology

Characteristics of human β -carotene 15,15'-dioxygenase isolated by recombinant DNA technology was elucidated. Optimal pH and temperature were 9.0 and 40°C, respectively. Enzyme activity was temperature-sensitive. Enzyme was stable at pH 6.0-9.0 for 24 hr and under 5°C. Half-life of enzyme at 35°C was 40 min. Crude preparations of enzyme were inhibited by ferrous ion-chelating agent and sulfhydryl-binding agent. GSH offsets inhibitory effect of PCMB. With increasing substrate concentrations, enzyme activity gave typical Michaelis-Menten curve. Based on Hanes-Woolf plot of data, K_m and V_{max} were 3.39×10^{-6} M and 1.2 pmol/mg protein/min, respectively.

Key words: β -carotene 15,15'-dioxygenase, recombinant DNA technology, optimal pH and temperature, K_m , V_{max}

서 론

자연상태에서는 560종 이상의 β -carotene이 발견되었으며(1), β -carotene은 intestinal mucosa와 말초세포에서 vitamin A의 전구물질로서 그 중요성이 알려져왔고 과일과 채소류에 풍부하게 존재한다(2). 이들 중에서도 가장 기능성이 강한 것은 all-trans- β -carotene으로서 면역시스템의 강화(3), 해독작용(4,5), gap junction communication 상승작용(6,7), 발암매개 효소의 감소 효과(8), photoprotection 효과(9) 등을 나타내며 사람과 동물을 대상으로 한 역학조사에서 anticancer로서의 가능성이 있는 상관관계를 나타내었으며(10-13), 특정 부위에서의 암의 발생을 감소시킨다는 보고가 계속되고 있다(14). 그러나 β -carotene 그 자체로는 흡수율이 낮고, 조직내에서 매우 낮은 수준으로 존재한다(15). 따라서, β -carotene의 다양한 기능은 그 자체의 활성화와 vitamin A인 retinol(ROL)과 그 대사산물인 retinoic acid(RA), retinal(ROL)등의 retinoid 계통의 물질을 통하여 그 활성을 나타낸다고 보고되고 있다(16,17). β -Carotene에서 retinoids로 전환되는 대사과정은 아직 명확히 밝혀지지 않았지만 적어도 두 가지 이상의 중요한 효소적 대사경로를 갖는 것으로 생각되어

지며 하나는 central cleavage pathway이고 또 하나의 주요한 대사경로는 excentric cleavage pathway이다(18-24). Central cleavage pathway에 관여하는 효소는 β -carotene 15,15'-dioxygenase (EC 1.13.11.21)로서 1965년 Olson, Hayaishi(22)와 Goodman, Huang(23)에 의하여 처음 보고되었다. Provitamin A인 β -carotene은 β -carotene 15,15'-dioxygenase에 의하여 두 분자의 retinal (vitamin A aldehyde)로 전환되어진다(22,23). Retinal은 산화되어 retinoic acid(vitamin A acid)를 형성하고 환원되어 retinol(vitamin A)을 만들어낸다. 또한 retinoic acid는 excentric cleavage pathway에서의 최종산물로서도 생성된다.

β -Carotene 15,15'-dioxygenase에 대한 연구는 효소발견 이후 경쟁적으로 수행되었는데, Fidge 등(25)과 Lakshmanan 등(26)에 의해 효소활성의 보조물질로서 철이 필수적인 요소라는 사실이 밝혀졌다. Goodman 등(27)과 Fidge 등(25)은 β -carotene 15,15'-dioxygenase가 수용성이며 세포내 효소임을 밝혀냈다. 또한 Sklan(28)은 β -carotene 15,15'-dioxygenase의 활성이, 높은 분자량을 갖는 지단백질 분획과의 연관성이 있음을 밝혀내어 정량화하기도 하였다.

이상의 여러 연구에도 불구하고 β -carotene 15,15'-dioxygenase 분석을 위한 간편하고 정확한 활성측정법을 완벽하게 확립하지 못한 문제점과 자연계에서 얻을 수 있는 효소의 낮은 활성으로 인하여 그 활용과 연구에 어려움이 제기되어왔다. 이에 많은 연구자들은 활성측정방법의 개선을 위하여 다양한 분석 방법들을 제안했지만 복잡하거나 많은 시간이 소요되는 단점들이 제기되어 왔다. 예를 들면, radioactive β -carotene을 기질로

*Corresponding author: Pahn-Shick Chang, Department of Food Science and Technology, Seoul National University of Technology, 172 Kongneung-dong, Nowon-gu, Seoul 130-743, Korea
Tel: 82-2-970-6437
Fax: 82-2-976-6460
E-mail: pschang@snut.ac.kr

사용하는 방법(25,29-38)이 고안되었으며 thin-layer chromatography(TLC) 또는 alumina column chromatography를 이용해서 retinal과 β -carotene을 분리하고자 하였다(25,26,29-33,39). 이후에 high performance liquid chromatography(HPLC)를 이용한 방법(22,34-38,40-42)이 제안되었지만 많은 양의 추출액이 필요하고 추출과정에서 최종산물과 β -carotene의 산화와 이성질화를 가져올 수 있는 문제점들이 지적되어왔다(35). 따라서 본 연구에서는 먼저 β -carotene 15,15'-dioxygenase의 활성 측정을 위한 빠르면서도 간편하고 재현성있는 분석방법을 확립하였으며, 대장균내에서 발현된 사람 유래의 유전자 재조합 β -carotene 15,15'-dioxygenase 효소에 대한 반응특성을 규명하고 효소반응을 저해하는 현상에 대한 pattern을 규명하였다.

재료 및 방법

실험장치 및 시약

β -Carotene 15,15'-dioxygenase의 활성을 측정하기 위하여 shaking water bath(SWB-03, (주)제이오텍, Korea), micro-scale high speed centrifuge(Micro 17R+, (주)한일에스엠, Korea) 등을 이용하였다.

β -Carotene 15,15'-dioxygenase의 기질로 사용한 all-trans- β -carotene, retinoids 표준품과 activator로 사용한 sodium cholate, dithiothreitol(DTT)은 Sigma Chem. Co.(St. Louis, USA)에서 구입하였으며 유화제로 사용된 tween 40은 Aldrich Chem. Co.(Milwaukee, USA) 제품을 사용하였고, 단백질 정량에 사용되어진 BCA Protein Assay Reagent는 Pierce Co.(Rockford, IL, USA)에서 구입하여 사용하였다. 그리고 HPLC 분석을 위한 용매는 모두 HPLC용 특급시약을 사용하였다.

그 외의 시약은 EP등급 이상의 시약을 사용하였다.

β -Carotene-15,15'-dioxygenase 발현 및 조효소 제조

본 연구에 사용된 β -carotene 15,15'-dioxygenase는 사람의 β -carotene-15,15'-dioxygenase cDNA를 포함하는 pET-15b 벡터를 대장균에 형질전환 시킨 효소이며, 대장균 균주는 BL21(DE3)로서 pET 벡터시스템이 삽입되면 lacI repressor 조절에 의해서 단백질 발현이 유도되게 하였다. 먼저, 100 mg/mL의 ampicillin을 함유하는 500 mL의 LB 배지에 하룻밤 배양한 배양물 5 mL를 접종시켰으며, 37°C에서 배양된 균주는 600 nm에서의 흡광도 값이 0.5-0.6이 될 때, 1 mM IPTG(isopropyl β -thiogalactoside)로 효소 발현을 유도하고 30°C에서 3-4시간 배양하였다. 배양된 균은 원심 분리하여 회수하였으며, 회수한 균체는 10 mL 완충용액(50 mM Tris-Cl/NaOH(pH 7.6), 100 mM NaCl, 0.05% Triton X-100)에서 교반시킨 후, 0.5 mL protease 저해제 콕테일(cocktail)을 처리하였다. 균주 세포는 초음파를 처리하여 용균시키고, 용균물을 12,000×g에서 원심분리하여 상등액을 취하였다. 준비된 상등액에 ammonium sulfate를 80% 농도로 포화시켜 단백질을 침전시키고 8,000×g에서 10분간 원심분리하여 침전물을 취하였으며, 이를 동결건조하여 -70°C 이하에서 보관하면서 조효소 분말로 사용하였다.

효소반응 산물 정량분석을 위한 HPLC 최적 조건의 확립

유전자 재조합 기법에 의하여 대량생산된 β -carotene 15,15'-dioxygenase에 의하여 생성되는 retinoids 분석을 위한 During 등(43)의 분석 조건을 참고·변형하였다. 즉, 사용한 HPLC pump는 Shimadze LC-10AD(Japan)이었으며, 검출기는 380 nm로 고

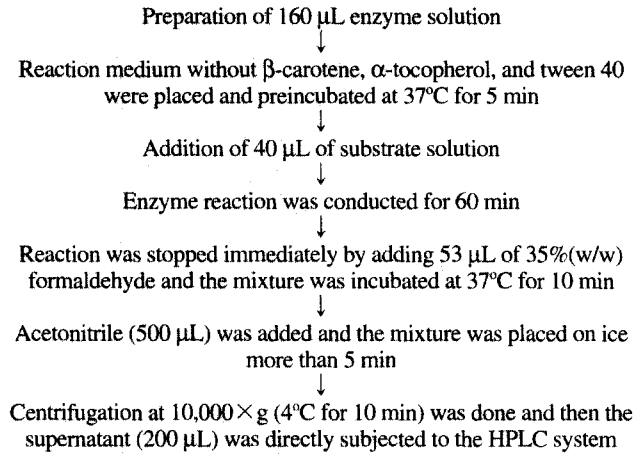


Fig. 1. Standard method for the assay of β -carotene 15,15'-dioxygenase (EC 1.13.11.21).

정하여 사용하였다. 이동상은 acetic acid를 사용하여 pH 4.65로 보정한 acetonitrile : 100 mM ammonium acetate = 90 : 10(v/v)을 이용하였고, 유속은 1 mL/min으로 고정하였다. Column은 Nova-Pak C₁₈, Shim-pack CLC-NH₂, Shim-Pack CLC-ODS와 Shodex silica C₁₈-5A에 retinoids 표준품을 분석하여 가장 좋은 peak pattern을 보인 Shodex silica C₁₈-5A를 선정하였다. β -Carotene 15,15'-dioxygenase의 활성을 측정하기 위하여 1시료 당 3개의 sample을 제조하여 HPLC로 분석하였다.

β -Carotene 15,15'-dioxygenase 활성측정 및 단백질 정량

During 등(2,43,45) 및 Yeum 등(46)의 방법을 참고하여 Fig. 1과 같이 효소활성측정을 수행하였다. β -Carotene 15,15'-dioxygenase의 기질은 β -carotene으로서 지용성이다. 따라서 지용성-수용성 혼합반응계로 많이 사용되는 emulsion system에서 반응을 유도하였다. Activator 용액으로는 0.1 M N-tris(hydroxymethyl) methylglycine(tricine)-KOH buffer(pH 9.0), 1 mM DTT, 8 mM sodium cholate, 30 mM nicotinamide를 혼합하여 사용하였으며, 기질용액은 4.5% tween 40 용액을 용해시킨 acetone에 75 nmol all-trans- β -carotene과 0.5 μ mol α -tocopherol을 용해시켜 167 μ L를 취한 후 질소 가스로 증발시켜 그 잔류물에 1 mL의 증류수를 가하여 기질로 사용하였다. 이상에서 준비된 용액들을 사용하되, 먼저 재조합된 효소액 80 μ L와 activator 용액 80 μ L를 혼합하여 효소용액을 제조한 다음, 이 용액을 37°C에서 10분 동안 preincubation하고 기질용액을 첨가하여 효소반응을 시작하였다. 60분간 반응시킨 후, 37% (w/w) formaldehyde를 50 μ L를 첨가하여 반응을 종결시켰다. 10분간 incubation한 후, 500 μ L acetonitrile을 첨가하여 강하게 교반시켰으며, 4°C, 10,000×g에서 10분간 원심분리하여 상등액 200 μ L를 HPLC에 주입하여 정량분석하였다. 상기한 모든 작업은 yellow 빛 하에서 수행함으로써 모든 반응물의 빛에 의한 isomerization과 degradation을 최소화하였다.

β -Carotene 15,15'-dioxygenase 효소 1 unit는 효소반응을 위한 최적 조건 하에서 1분 동안 1 pmole의 retinol을 생산하는 능력으로 정의하여 본 연구에서의 효소활성도로 계산하였으며, Smith 등(44)의 방법에 따라 bovine serum albumin을 표준단백질로 사용하여 단백질 함량을 측정하였다.

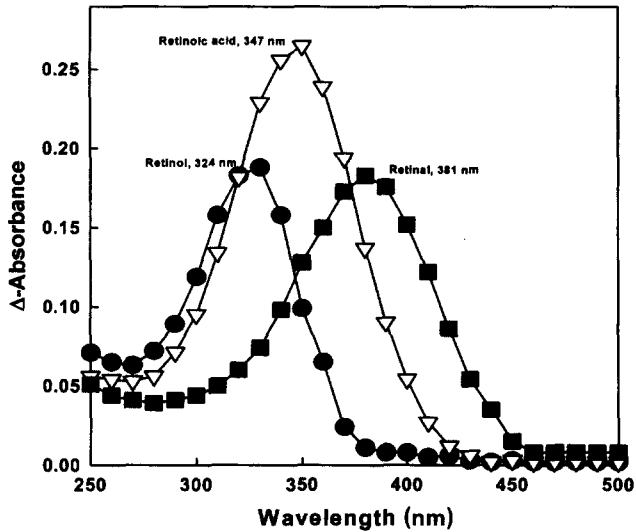


Fig. 2. Spectrophotometric scanning patterns for the determination of optimal λ_{max} .
 ●: retinol 4.36×10^{-6} mol, ▽: retinoic acid 4.15×10^{-6} mol, ■: retinal 3.52×10^{-6} mol.

β -Carotene 15,15'-dioxygenase 효소동력학 연구

동력학적 반응 특성을 살펴보기 위하여 K_m 및 V_{max} 값을 Hanes-Woolf plot 방법을 이용하여 결정하였다.

결과 및 고찰

Retinoids 검출을 위한 λ_{max} 의 결정

분석 물질인 retinoids의 λ_{max} 를 구하기 위하여 retinol, retinal, retinoic acid를 각각 scanning하여 Fig. 2에 나타내었다. Retinoids 흡광을 위한 최적의 파장 범위는 380 nm로 근처로 나타났다. 즉, retinol, retinal, retinoic acid 모두 300-400 nm 범위내에서 λ_{max} 가 나타났는데, β -carotene 15,15'-dioxygenase의 주요 생산물인 retinal에 초점을 맞추어 380 nm를 최적의 λ_{max} 로 결정하였다. 따라서 이후의 분석은 380 nm에서 실시하였다.

효소반응 생산물 정량분석을 위한 HPLC 최적 조건의 확립

β -Carotene 15,15'-dioxygenase 효소 반응에 의하여 생성되는 여러가지 물질들을 HPLC를 이용하여 분석하기 위한 조건을 최적화하였다. During 등(43)의 조건을 변형하여 효소반응 생성물 분석을 위한 주요 조건으로서 이동상(mobile phase)은 acetonitrile : 100 mM ammonium acetate = 90 : 10(v/v), 흐름속도(flow rate)는 1.0 mL/min로 결정하였으며, Fig. 3(a)는 최적 분석조건하에서 retinoids를 Shodex silica C_{18} -5A로 분석한 결과로서 retinol, retinal, retinoic acid 분석을 위한 머무름시간(retention time)이 각각 7.08, 8.74, 6.48분인 것을 나타내고 있다.

재조합된 효소의 활성 측정

β -Carotene 15,15'-dioxygenase의 정제를 위한 많은 시도가 행하여졌지만 완전하게 정제에 성공한 경우가 없었다(24-27,34,38). 따라서, 본 연구에서는 초기에는 재조합 기술을 통하여 효소를 정제하되, 정제율 90%이상의 효소를 분리하여 실험을 수행하였다. 그러나, 정제된 효소 단백질을 얻을 수는 있었지만 효소 활성은 나타나지 않았는데, 이는 다른 연구에서도 β -carotene 15,15'-dioxygenase가 효소반응에 있어서 cofactor나 기타 보조하

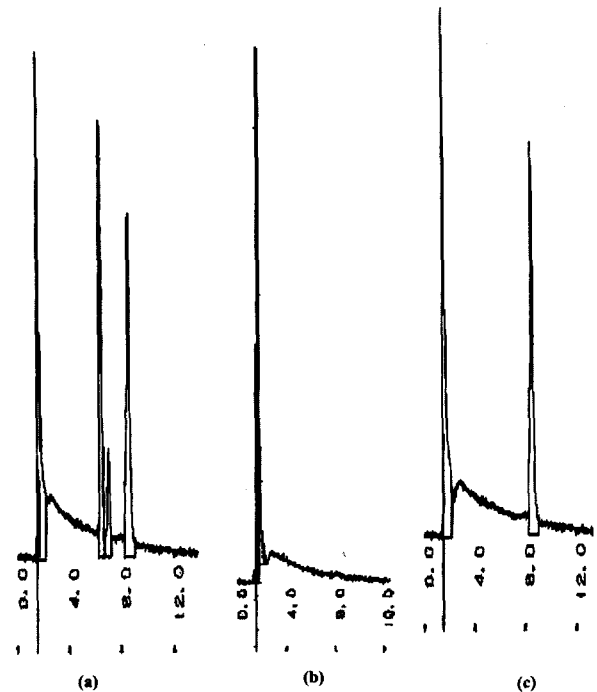


Fig. 3. HPLC elution profiles of standard retinoids and the product from β -carotene 15,15'-dioxygenase reaction.

a: mixture of retinoids, b: blank with distilled water as an enzyme solution, c: enzyme-catalyzed reaction.

는 다른 요소가 필요하다는 보고를 유의해야할 필요성을 주지 시켰다. 따라서, 효소 활성에 영향을 미치는 요인들에 대한 연구가 완전히 진행되지 않아서 완전 정제된 β -carotene 15,15'-dioxygenase의 활성측정은 불가능한 것으로 판단되었다. 이에 본 연구에서는 완전 정제된 효소가 아니라 ammonium sulfate 침전과정만을 수행하여 침전물로 얻어낸 부분정제된 crude한 상태의 효소를 사용함으로써 β -carotene 15,15'-dioxygenase 효소활성을 확인할 수 있었다. Fig. 3(c)는 재조합효소에 의하여 생성되는 성분을 확인한 결과로서, retinol과 retinoic acid 등의 생성물은 형성되지 않으며 retinal만 생성시키는 것으로 판명되었다. 이러한 사실은 본 연구에서 사용한 재조합효소는 β -carotene을 기질로 사용하여 retinal만을 생산하는 β -carotene 15,15'-dioxygenase임을 증명하는 것이며 다른 효소활성에 오염되지 않았음을 시사하였다. 또한, Fig. 4는 증류수를 사용한 대조군(HPLC chromatogram은 Fig. 3(b) 참조)과 효소의 활성을 반응시간에 따라 나타낸 것이다. 반응 후 2시간이 지나면서 평형에 도달함을 확인하였으며, 대조군에서 반응이 일어나지 않는 것으로 볼 때 주변환경에 의하여 기질인 β -carotene이 전혀 분해되지 않음을 확인하였다.

효소 활성에 대한 효소농도의 영향

효소-기질반응 속도는 시간이 지나면 저하된다. 즉, 본 연구에서 사용한 β -carotene 15,15'-dioxygenase도 반응생성물의 축적에 의한 저해, 역반응속도의 증가, 효소의 실활 등에 따라 반응 속도가 저하된다. 따라서, 효소 활성은 반응속도가 평형·포화에 이르기 전의 속도, 즉, 초기속도(initial velocity)구간에서 측정해야만 하는 바, 먼저 효소 농도에 대한 최적의 반응속도 구간을 찾아야한다. Fig. 5 및 6은 효소단백질의 농도를 50-350 μ g/80 μ L사이에서 농도 차이를 두고 실험한 결과이다. 직선적

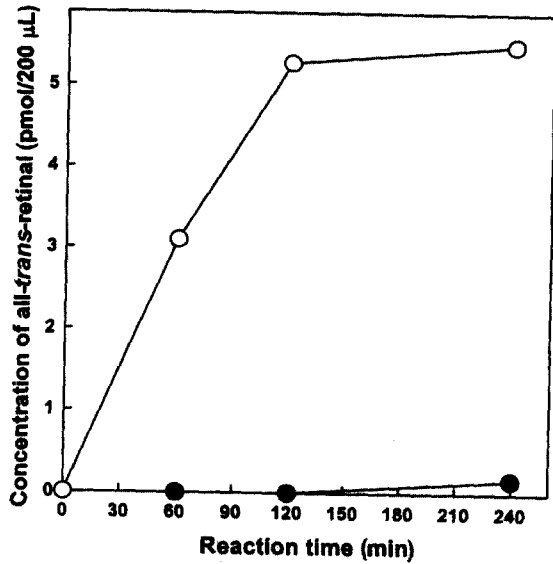


Fig. 4. Time course of β -carotene 15,15'-dioxygenase reaction. ○: reaction mixture, ●: reaction without enzyme.

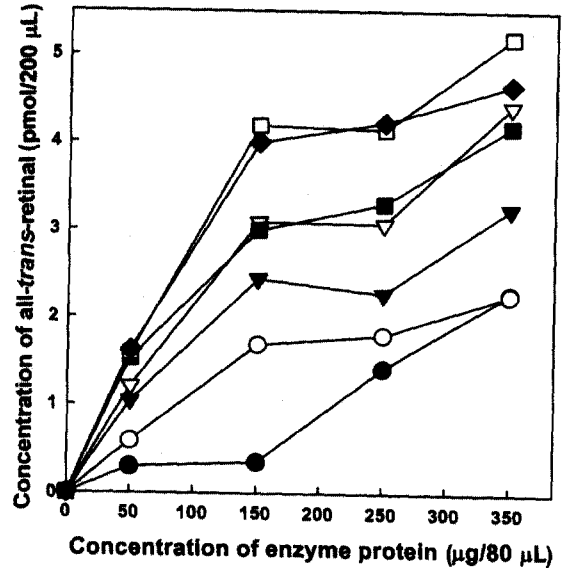


Fig. 6. Effect of reaction time and enzyme concentration on the enzyme activity. ●: 20 min, ○: 40 min, ▼: 60 min, ▽: 80 min, ■: 100 min, □: 120 min, ◆: 240 min.

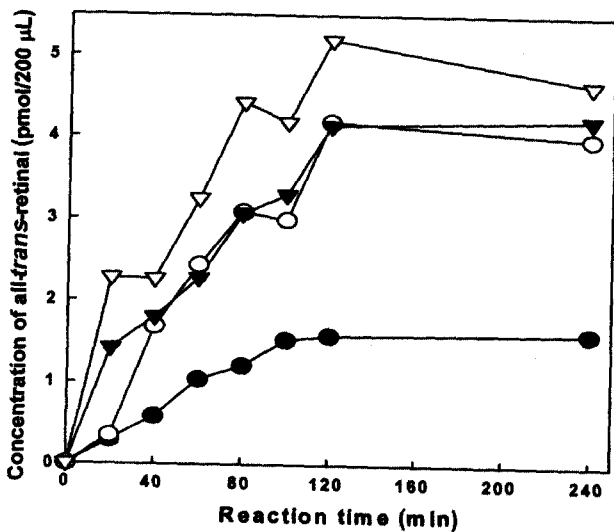


Fig. 5. Effect of enzyme concentration on the activity of β -carotene 15,15'-dioxygenase isolated from recombinant *E. coli*. ●: 50 $\mu\text{g}/80 \mu\text{L}$, ○: 150 $\mu\text{g}/80 \mu\text{L}$, ▼: 250 $\mu\text{g}/80 \mu\text{L}$, ▽: 350 $\mu\text{g}/80 \mu\text{L}$.

으로 증가하면서 높은 활성을 갖는 구간을 확인할 수 있었으며, 최적의 효소농도 및 효소반응 시간을 각각 150 $\mu\text{g}/80 \mu\text{L}$ 및 60분으로 결정하였다.

효소 반응을 위한 온도 최적화

유전자 재조합 기술에 의하여 생산된 β -carotene 15,15'-dioxygenase 활성에 미치는 반응온도의 영향을 알아보기 위하여 최적의 효소농도 조건하에서 온도를 20-70°C까지 10°C간격으로 변화시키면서 효소활성을 측정하였다. Fig. 7의 곡선을 얻을 수 있었다. 유전자 재조합 기술에 의하여 생산된 β -carotene 15,15'-dioxygenase 효소반응을 위한 최적 온도는 40°C로 나타났다. 특히, 50°C이상에서는 80%이상 실활되어 온도변화에 민감한 것으로 판단되었다.

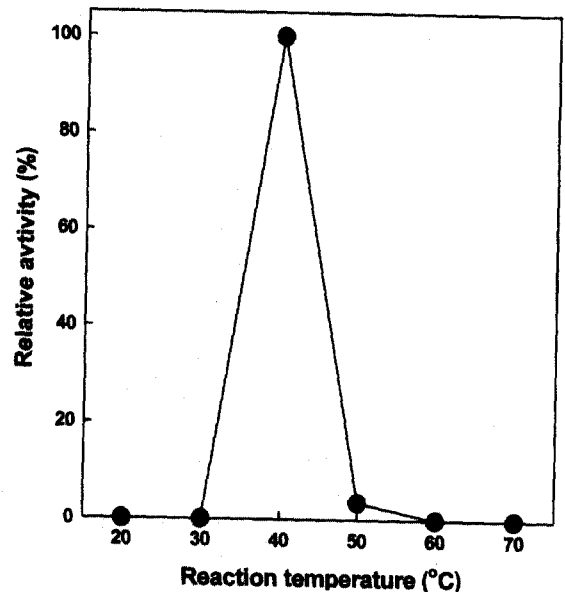


Fig. 7. Effect of temperature on the activity of β -carotene 15,15'-dioxygenase isolated from recombinant *E. coli*.

효소 반응을 위한 pH 최적화

유전자 재조합 기술에 의하여 생산된 β -carotene 15,15'-dioxygenase 활성에 미치는 효소-기질 반응액의 pH 영향을 검토하기 위하여 pH 3.0부터 pH 13.0(pH 3.0부터 7.0까지는 0.1 M citric acid-disodium phosphate buffer, pH 8.0부터 13.0까지는 0.1 M Clark and Lubs buffer를 사용하였음)까지의 범위에서 효소활성도를 측정하였다. Fig. 8의 곡선을 얻을 수 있었다. 최적 pH는 9.0이고, pH 11.0에서도 50% 이상의 활성을 보여 호알칼리성 효소로 판명되었다. 여러 가지 종류의 β -carotene 분해효소 반응을 위한 최적 pH에 대하여 Lakshmanan 등(26)이 pH 7.8, Dmitrovskii 등(47)은 pH 8.0, Goodman 등(30)은 pH

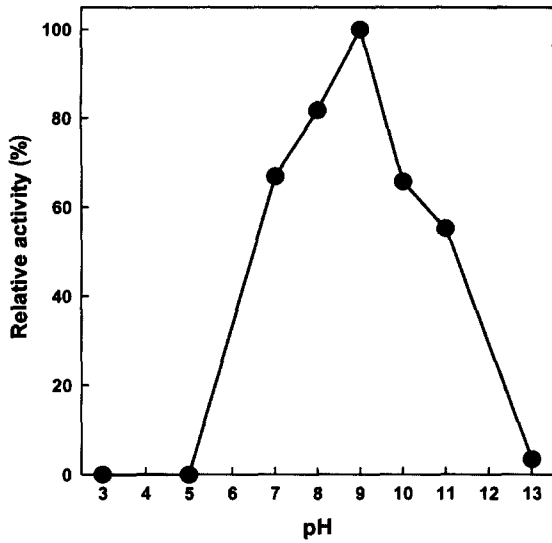


Fig. 8. Effect of pH on the activity of β -carotene 15,15'-dioxygenase isolated from recombinant *E. coli*.

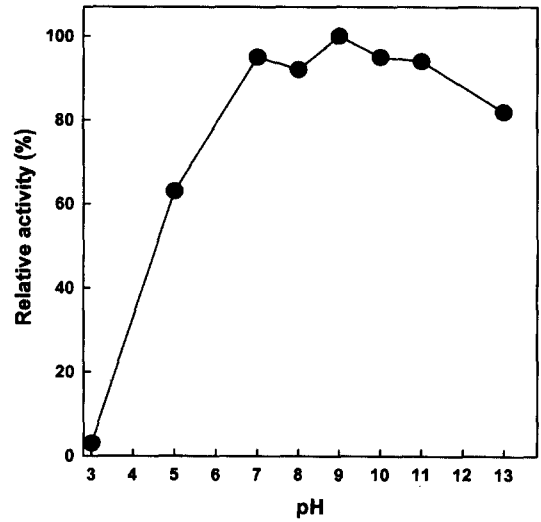


Fig. 10. Effect of pH on the storage stability of β -carotene 15,15'-dioxygenase isolated from recombinant *E. coli* after one day at 5°C.

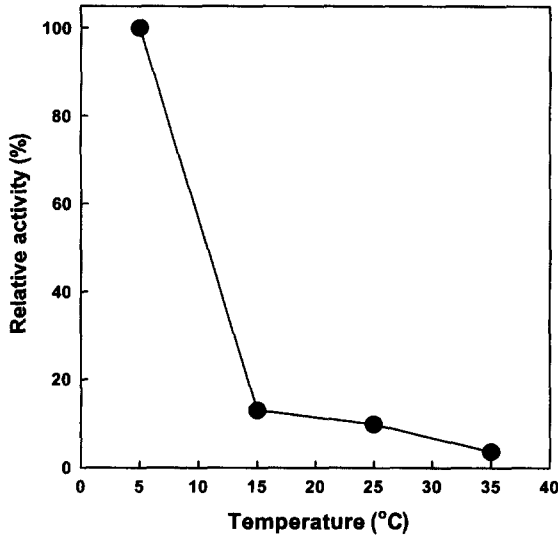


Fig. 9. Effect of temperature on the storage stability of β -carotene 15,15'-dioxygenase isolated from recombinant *E. coli* after one day incubation of the enzyme at different storage temperature and pH 9.0.

7.7이지만 sodium taurocholate와 DTT 존재하에서의 반응에서는 pH 8.0으로 보고하였다(42,43,46,48). 이상의 보고들이 본 연구의 결과와 차이를 보이는 것은 효소를 분리·추출한 source 및 효소생물반응기 종류 등의 차이에서 기인하는 것으로 판단된다.

효소의 저장안정성에 대한 온도의 영향

유전자 재조합 기술에 의하여 생산된 β -carotene 15,15'-dioxygenase를 5-35°C까지 10°C간격으로 각 온도에서 24시간 동안 항온수조에서 중탕·저장한 후 효소활성을 측정된 결과를 Fig. 9에 나타내었다. 5°C에서 저장하여 실험한 결과 효소의 활성이 매우 안정하게 유지되는 것으로 판명되었다. 15°C에서부터는 효소활성이 급격하게 감소하였으며 35°C에서는 5%이하의 잔존활성으로서 거의 활성이 나타나지 않았다. 따라서, 본 연구

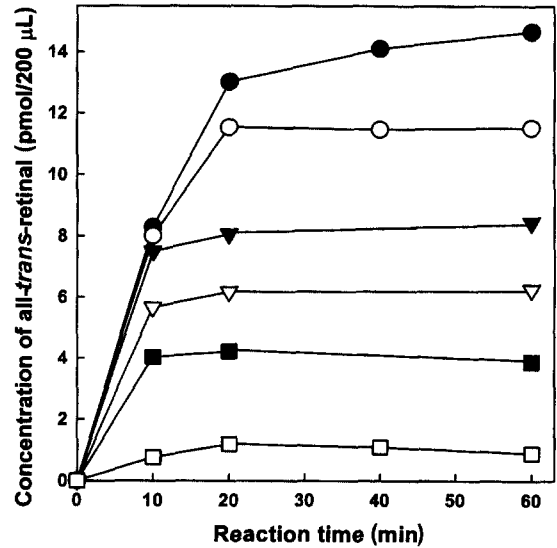


Fig. 11. Effect of substrate concentration on the activity of β -carotene 15,15'-dioxygenase isolated from recombinant *E. coli*. ●: 15 nmol, ○: 7.5 nmol, ▼: 6 nmol, ▽: 4.5 nmol, ■: 3 nmol, □: 0.75 nmol.

에서 사용한 β -carotene 15,15'-dioxygenase는 열에 매우 민감한 효소로 판단되었다.

효소의 저장안정성에 대한 pH의 영향

유전자 재조합 기술에 의하여 생산된 β -carotene 15,15'-dioxygenase를 pH 3.0부터 pH 13.0까지의 범위에서 pH에 대한 안정성을 측정하여 Fig. 10의 결과로 나타내었다. pH 7.0-11.0의 범위에서 저장하였을 때 안정하였고 pH 9.0에서 최대의 효소활성을 나타내었으며 pH 13에서도 80%이상의 활성을 보이는 호알칼리성 효소로 판명되었다. 그러나, 산성조건인 pH 3.0-5.0까지 효소를 저장하여 실험한 결과 알칼리 pH에 비해 활성이 많이 감소하는 경향을 나타내었다. 이러한 결과로부터 본 효소는 산성보다 알칼리 환경 하에서 더욱 안정한 것으로 판명되었다.

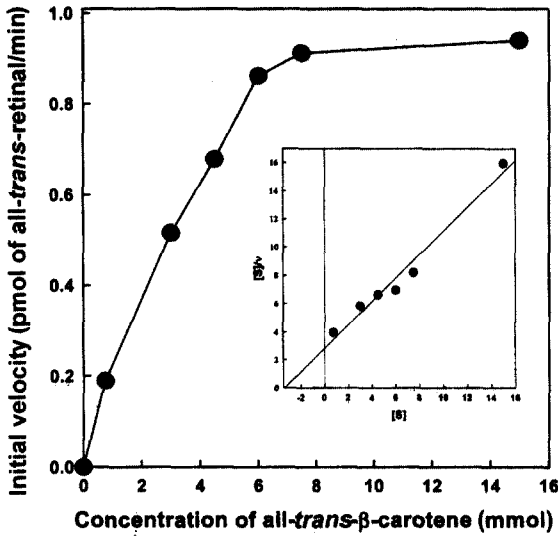


Fig. 12. Michaelis-Menten plot for β -carotene 15,15'-dioxygenase-catalyzed reaction and Hanes-Woolf plot for the determination of K_m and V_{max} .

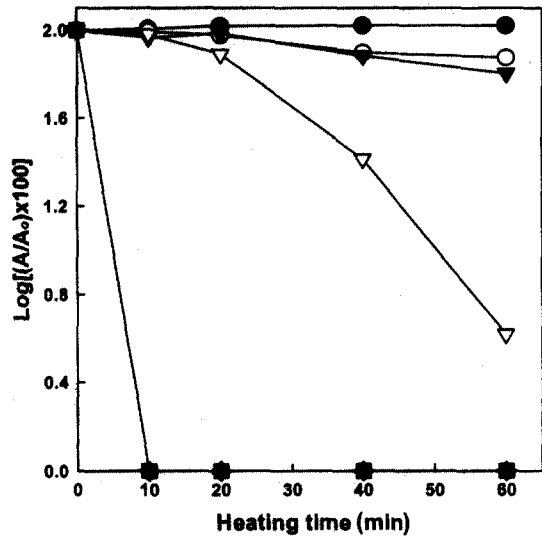


Fig. 14. Thermal inactivation plot described by logarithmic coefficient for β -carotene 15,15'-dioxygenase isolated from recombinant *E. coli*.

A and A₀ mean the enzyme activities expressed by the heat inactivated and the native β -carotene 15,15'-dioxygenase (at initial time), respectively. ●: 5°C, ○: 15°C, ▼: 25°C, ▽: 35°C, ■: 45°C, □: 55°C, ◆: 65°C.

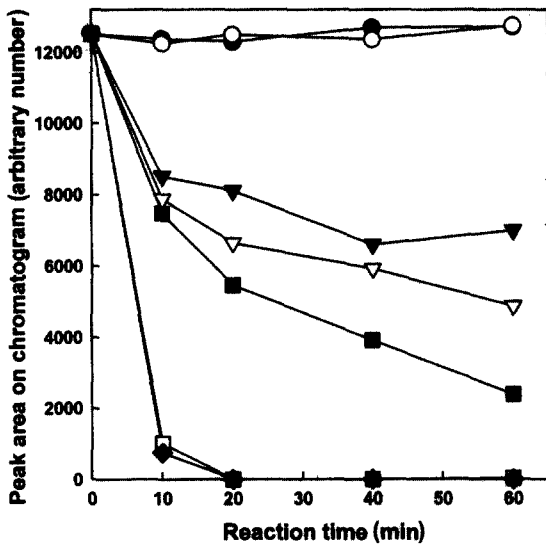


Fig. 13. Thermal inactivation of β -carotene 15,15'-dioxygenase isolated from recombinant *E. coli*.

●: 5°C, ○: 15°C, ▼: 25°C, ▽: 35°C, ■: 45°C, □: 55°C, ◆: 65°C.

효소동력학 상수의 산출

본 효소의 반응속도를 조사하기 위하여 all-trans- β -carotene의 농도를 0.75, 3, 4.5, 6, 7.5 및 15 nmol로 조정하여 효소와 반응시켜 Fig. 11에 나타내었다. β -Carotene 15,15'-dioxygenase의 활성을 Michaelis-Menten plot과 Hanes-Woolf plot 방법을 사용한 결과는 Fig. 12와 같았다. 본 효소의 K_m 값은 3.39×10^{-6} M로 산출되었으나 Goodman 등(29)은 3.3×10^{-6} M, van Vliet 등(49)은 1.8×10^{-6} M, Laksmanan 등(26)은 6.7×10^{-5} M, *Drosophila melanogaster*로부터 *Escherichia coli*로 유전자 재조합을 시도한 von Lintig 등(43)은 5×10^{-6} M, 사람의 장내에 있는 cell line caco-2의 TC7 clone을 사용한 During 등(45)은 1.6×10^{-6} M로 보고하였다. 본 연구에서의 V_{max} 값은 1.2 pmol/mg protein/min으로 산출되었으며 Laksmanan 등(26)은 37°C에서 9

nmols retinal/mg protein/hr로 During 등(45)은 23.8 pmol/mg protein/hr로 보고하였다.

효소의 열 안정성 검토 및 열불활성화 계수의 결정

유전자 재조합 기술에 의하여 생산된 β -carotene 15,15'-dioxygenase의 열에 대한 안정성을 확인하기 위하여 5-65°C까지 10°C 간격으로 10분, 20분, 40분, 60분간 항온수조에서 중탕처리 한 후 열에 대한 안정성을 측정하여 Fig. 13의 결과로 나타내었다. 5°C 및 15°C에서 60분간 열처리로는 효소활성이 거의 변화를 나타내지 않았으며 25-45°C까지는 열처리 시간에 비례하여 활성이 감소하였다. Fig. 14에서 볼 수 있듯이 55°C에서부터는 효소활성의 감소정도가 급격하게 증가하는 경향을 나타내었다. 55°C와 65°C에서는 10분 후 효소활성이 거의 나타나지 않고 있음을 알 수 있다. 유전자 재조합 기술에 의하여 생산된 β -carotene 15,15'-dioxygenase의 내열성 pattern은 45°C를 경계로 하여 이전 온도에서는 안정하였지만 55°C 이후로는 효소활성이 열에 의하여 급격하게 감소되는 것으로 나타났다. Fig. 14에서의 초기 기울기 값을 heat inactivation coefficient로 계산하여 Fig. 15를 완성하였다. 그 결과, 15°C까지는 열에 대하여 매우 안정하여 효소의 활성이 거의 감소하지 않음을 알 수 있었다. 그러나 25°C 이후로부터 온도가 상승함에 따라 45°C까지는 불활성화 정도가 일정하게 상승하고 있으며 55°C이후에서는 급격하게 불활성화되고 있음을 알 수 있었다. 결론적으로, 유전자 재조합 기술로 제조된 β -carotene 15,15'-dioxygenase 효소는 15°C까지는 전혀 실활되지 않으며, 35-45°C까지는 실활의 정도가 비례적으로 증가하였지만 비교적 완만하게 상승하였다. 그러나, 55°C에서는 이전의 온도에서와는 달리 실활의 정도가 급격하게 증가하여 잔존하는 활성이 거의 나타나지 않았다. 따라서, 본 효소는 내열성의 정도가 낮은 효소임을 확인할 수 있었다.

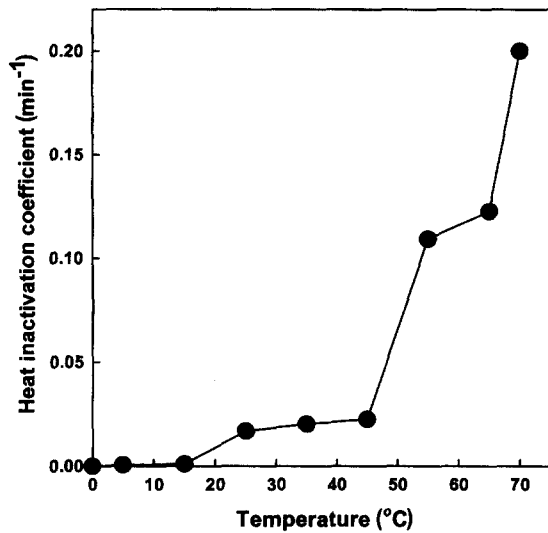


Fig. 15. Effect of temperature on the heat inactivation coefficient of β -carotene 15,15'-dioxygenase isolated from recombinant *E. coli*.

Table 1. Effect of chelating agents and sulfhydryl-binding agents on the enzymatic cleavage of β -carotene

Compound added	Final inhibitor concentration, M	Relative activity, %
None	0	100
α, α' -Dipyridyl	1×10^{-4}	35.1
1,10-Phenanthroline	1×10^{-4}	5.9
Iodoacetamide	1×10^{-3}	35.4
N-Ethylmaleimide	1×10^{-4}	79.0
p-Chloromercuribenzoate (PCMB)	1×10^{-3}	12.6
Reduced glutathione (GSH)	1×10^{-3}	93.7
GSH+PCMB	1×10^{-4}	100

The enzyme was preincubated for 10 min at 40°C with the final concentration of each inhibitor before the addition of activator solution.

효소 활성에 대한 저해제의 영향

β -Carotene 15,15'-dioxygenase는 ferrous ion-chelating agent와 sulfhydryl-binding agent에 의하여 저해된다고 보고되었다 (22,25,27). 따라서, ferrous ion-chelating agent인 α, α' -dipyridyl과 1,10-phenanthroline과 sulfhydryl-binding agent인 iodoacetamide, N-ethylmaleimide와 PCMB를 5 mM과 10 mM의 농도로 첨가하였을 때의 효소활성 저해효과를 측정하고 GSH과 PCMB를 동시에 반응 시켜 효소활성 저해의 회복 정도를 알아보았다. 그 결과는 Table 1에 나타내었으며 GSH가 PCMB의 저해효과를 회복시키는 것으로 나타났다.

요 약

본 연구에서는 유전자 재조합 기술에 의해 제조된 β -carotene 15,15'-dioxygenase의 반응특성 및 효소 kinetics를 규명하였다. β -Carotene 15,15'-dioxygenase 효소반응을 위한 최적 온도 및 pH를 측정할 결과, 최적 온도는 40°C로 판명되었으며 최적 pH는 9.0이었다. 저장 pH 6.0-9.0 범위에서 안정하였으며, pH 11에서도 80% 이상의 활성을 보이는 호알칼리성 효소임을 확인

하였다. 온도 저장성을 확인한 결과, 35°C에서의 효소활성 반감기가 40분으로서 열에 민감한 것으로 판단되었다. 한편, ferrous ion-chelating agent와 sulfhydryl-binding agent를 사용하여 β -carotene 15,15'-dioxygenase에 미치는 영향을 살펴 보았다. Ferrous ion-chelating agent인 α, α' -dipyridyl과 1,10-phenanthroline은 1×10^{-4} M에서 최소 저해농도를 형성하였으며, sulfhydryl-binding agent인 iodoacetamide와 PCMB는 1×10^{-3} M에서 N-ethylmaleimide은 1×10^{-4} M에서 최소저해농도를 형성함을 확인할 수 있었다. 또한, PCMB에 의한 저해가 1×10^{-3} M에서 형성되나 GSH에 의하여 완벽하게 저해가 제거되고 활성을 회복함을 확인할 수 있었다. 본 연구에서의 효소반응은 Michaelis-Menten 곡선을 따름을 확인하였으며, Hanes-Woolf 작도법에 따른 결과, β -carotene 15,15'-dioxygenase 효소의 K_m 및 V_{max} 값은 각각 3.39×10^{-6} M 및 1.2 pmol/mg protein/min인 것으로 산출되었다.

문 헌

1. Straub O. Key to carotenoids. pp. 1-196. In: Key to Carotenoids. Pfander H (ed). Basel Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland (1987)
2. During AD, Fields M, Lewis CG, Smith JC. Intestinal β -carotene 15,15'-dioxygenase activity is markedly enhanced in copper-deficient rats fed on high-iron diets and fructose. Br. J. Nutr. 84: 117-124 (2000)
3. Bendich A. Carotenoids and the immune responses. J. Nutr. 116: 2254-2262 (1986)
4. Burton GW, Ingold KU. β -Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. Science 244: 569-573 (1984)
5. Krinsky NI. Actions of carotenoids in biological systems. Ann. Rev. Nutr. 13: 561-587 (1993)
6. Zhang LX, Cooney RV, Bertman JS. Carotenoids enhance gap junctional communication and inhibit lipid peroxidation in C3H/10T1/2 cell: relationship to their cancer chemopreventive action. Carcinogenesis 12: 2109-2114 (1991)
7. Bertram JS, Pung A, Churley M, Kappock IVTJ, Wilkins LR, Cooney RV. Diverse carotenoid protect against chemically induced neoplastic transformation. Carcinogenesis 2: 671-678 (1991)
8. Edes TE, Thornton W. Jr., Shan J. β -Carotene and aryl hydrocarbon hydroxylase in the rat: an effect of β -carotene independent of vitamin A activity. J. Nutr. 119: 796-799 (1989)
9. Krinsky NI. Photobiology of carotenoid protection. pp. 397-403. In: The Science of Photomedicine. Regan JD, Parrish JA (eds). Plenum, New York, NY, USA (1982)
10. Ziegler RG. A review of epidemiologic evidence that carotenoids reduce the risk of cancer. J. Nutr. 119: 116-122 (1989)
11. Ziegler RG. Vegetables, fruits, carotenoids and the risk of cancer. Am. J. Clin. Nutr. 53: 238S-246S (1991)
12. Weisburger JH. Nutritional approach to cancer prevention with emphasis on vitamins, antioxidants, and carotenoids. Am. J. Clin. Nutr. 53: 226S-237S (1991)
13. Krinsky NI. Effects of carotenoids in cellular and animal systems. Am. J. Clin. Nutr. 53: 238S-246S (1991)
14. van Poppel G. Carotenoids and cancer-an update with emphasis on human intervention studies. Eur. J. Cancer 29A: 1335-1344 (1993)
15. Wang XD. Absorption and metabolism of β -carotene. J. Am. Coll. Nutr. 13: 314-325 (1994)
16. Moon RC, Mehta RG. Anticarcinogenic effects of retinoids in animals. Adv. Exp. Med. Biol. 206: 399-411 (1986)
17. Moon RC. Comparative aspects of carotenoids and retinoids as chemopreventive agents for cancer. J. Nutr. 119: 127-134 (1989)
18. Olson JA. Provitamin A function of carotenoids: conversion of β -carotene into vitamin A. J. Nutr. 119: 105-108 (1989)
19. Glover J. The conversion of β -carotene into vitamin A. Vitam. Horm. 18: 371-386 (1960)
20. Ganguly J, Sastry PS. Mechanism of conversion of β -carotene

- into vitamin A-central cleavage versus random cleavage. Rev. Nutr. Diet. 45: 198-220 (1993)
21. Krinsky NI, Wang XD, Tang G, Russell RM. Conversion of carotenoids to retinoids. pp. 1-16. In: Retinoids: Progress in Research and Clinical Applications. Liverea MA, Packer L (eds). Marcel Dekker, New York, NY, USA (1993)
 22. Olson JA, Hayaishi O. The enzymatic cleavage of β -carotene into vitamin A by soluble enzymes of rat liver and intestine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 54: 1364-1370 (1965)
 23. Goodman DS, Huang HS. Biosynthesis of vitamin A with rat intrstinal enzymes. Science 149: 879-880 (1965)
 24. Wang XD, Krinsky NI, Tang G, Russell RM. Retinoic acid can be produced from excentric cleavage of β -carotene in human intestinal mucosa. Arch. Biochm. Biophys. 293: 298-304 (1992)
 25. Fidge NH, Smith FR, Goodman WS. Vitamin A and carotenoids: the enzymic conversion of β -carotene into retinal in hog intestinal mucosa. Biochem. J. 114: 689-694 (1969)
 26. Lakshmanan MR, Chansang H, Olson JA. Purification and properties of β -carotene 15,15'-dioxygenase of rabbit intestine. J. Lipid Res. 13: 477-482 (1972)
 27. Goodman DS, Huang HS, Kanai M, Shiratori T. Mechanism of biosynthesis of vitamin A from β -carotene. J. Biol. Chem. 241: 1929-1932 (1966)
 28. Sklan D. Carotene-cleavage activity in chick intestinal mucosa cytosol: association with a high-molecular-weight lipid-protein aggregate fraction and partial characterization of the activity. Br. J. Nutr. 50: 417-425 (1983)
 29. Goodman DS, Huang HS, Kanai M, Shiratori TJ. The enzymatic conversion of all-*trans* β -carotene into retinal. Biol. Chem. 242: 3543-3554 (1967)
 30. Goodman DS, Olson JA. The conversion of all *trans*- β -carotene into retinal. Methods Enzymol. 15: 462-475 (1969)
 31. Gronowska-Senger A, Wolf G. Effect of dietary protein on the enzyme from rat and human intestine which converts beta-carotene to retinal. J. Nutr. 100: 300-308 (1970)
 32. Gawienowski AM, Stacewicz-Sapuncakis M, Longley R. Biosynthesis of retinal in bovine corpus luteum. J. Lipid Res. 15: 375-379 (1974)
 33. Villard L, Bates CJ. Carotene dioxygenase(EC 1.13.11.21) activity in rat intestine: effects of vitamin A deficiency and of pregnancy. Br. J. Nutr. 56: 115-122 (1986)
 34. Lakshman MR, Mychkovsky I, Attlesey M. Enzymatic conversion of all-*trans*- β -carotene by a cytosolic enzyme from rabbit and rat intestinal mucosa. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 9124-9128 (1989)
 35. Olson JA, Lakshman MR. Carotenoid conversion. Methods Enzymol. 189: 425-432 (1990)
 36. Yang A, Tume, RK. A comparison of beta-carotene-splitting activity isolated from intestinal mucosa of pasture-grazed sheep, goats and cattle. Biochem. Mol. Biol. Int. 30: 209-217 (1993)
 37. van Vliet T, van Schaik F, van den Berg H. Beta-carotene metabolism: the enzymatic cleavage to retinal. Neth. J. Nutr. 53: 186-190 (1992)
 38. Devery J, Milborrow BV. β -Carotene 15,15'-dioxygenase (EC 1.13.11.21) isolation reaction mechanism and improved assay procedure. Br. J. Nutr. 72: 397-414 (1994)
 39. Singh H, Cama HR. Enzymatic cleavage of carotenoids. Biochem. Biophys. Acta 370: 49-61 (1974)
 40. Hansen S, Maret W. Retinal is not formed *in vitro* by enzymatic central cleavage of β -carotene. Biochemistry 27: 200-206 (1988)
 41. Napoli JL, Race KR. Biogenesis of retinoic acid from β -carotene: differences between the metabolism β -carotene and retinal. J. Biol. Chem. 263: 17372-17377 (1988)
 42. Nagao A, Olson JA. Enzymatic formation of 9-*cis*, 13-*cis*, and all-*trans* retinals from isomers of β -carotene 15,15'-dioxygenase. FASEB J. 8: 968-973 (1994)
 43. During A, Nagao A, Hoshino C, Terao J. Assay of β -carotene 15,15'-dioxygenase activity by reverse phase high pressure liquid chromatography. Anal. Biochem. 241: 199-205 (1996)
 44. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal. Biochem. 150: 76-85 (1985)
 45. During A, Nagao A, Terao J. Beta-carotene 15,15'-dioxygenase activity and cellular retinol-binding protein type II level are enhanced by dietary unsaturated triacylglycerols in rat intestines. J. Nutr. 128: 1614-1619 (1998)
 46. Yeum KJ, dos Anjos Ferreira AL, Smith D, Krinsky NI, Russell RM. The effect of α -tocopherol on the oxidative cleavage of β -carotene. Free Radic. Biol. Med. 29: 105-114 (2000)
 47. Dmitrovskii AA, Gessler NN, Gomboeva SB, Ershov YU. Enzymatic oxidation of β -apo-8'-carotenal to β -apo-14'-carotenal by an enzyme different from β -carotene 15,15'-dioxygenase. Biochemistry 62: 787-792 (1997)
 48. Nagao A, During A, Hoshino C, Terao J, Olson JA. Stoichiometric conversion of all *trans*- β -carotene to retinal by pig intestinal extract. Arch. Biochem. Biophys. 328: 57-63 (1996)
 49. van Vliet T, van Schaik F, Schreurs WHP, van den Berg H. *In vitro* measurement of β -carotene cleavage activity: methodological considerations and the effect of other carotenoids on β -carotene cleavage. Int. J. Vit. Nutr. Res. 66: 77-85 (1995)

(2004년 5월 29일 접수; 2004년 6월 17일 채택)