

2-O- α -D-Glucopyranosyl L-Ascorbic acid 생산을 위한 Cyclodextrin glucanotransferase의 고정화

성경혜 · 김성구¹ · 장경립 · 전홍기*

부산대학교 생명과학부, ¹부경대학교 식품생명공학부

Immobilization of Cyclodextrin Glucanotransferase for Production of 2-O- α -D-glucopyranosyl L-Ascorbic Acid. Sung, Kyung-Hye, Sung-Koo Kim¹, Kyung-Lib Jang, and Hong-Ki Jun*. *Division of Biological Science, Pusan National University, Busan 609-735, Korea. ¹Faculty of Food Science and Biotechnology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea* – Cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) from *Paenibacillus* sp. JB-13 was immobilized on various carriers by several immobilization methods such as ionic binding, covalent linkage and ultrafiltration to improve the process performance. The ultrafiltration and covalent linkage with CNBr-activated sepharose 4B were found as the best method for immobilization of CGTase. The ability of CGTase immobilization onto CNBr-activated sepharose 4B was as high as 18,000 units/g resin when the conditions was as follows: contact time 9 hrs at 37°C, pH 6.0, 100 rpm and enzyme loading 24,000 units/g resin. The optimum conditions for production of 2-O- α -D-Glucopyranosyl L-Ascorbic acid by immobilized CGTase turned out to be: pH 5.0, temperature 37°C, 20% substrate solution containing 8% (w/v) of soluble starch and 12% (w/v) of L-ascorbic acid sodium salt, 100 rpm, for 25 hrs and with 800 units of immobilized CGTase/ml substrate solution. Moreover the CGTase activity could be stably maintained for 8 times of repetitive reactions after removing products by ultrafiltration through YM 10 membrane.

Key words: Cyclodextrin glucanotransferase (CGTase), 2-O- α -D-glucopyranosyl L-ascorbic acid (AA-2G), immobilized enzyme, ultrafiltration

비타민 C는 생체 조직 내에서 산화·환원되면서 영양소의 대사를 돕고 콜라겐(collagen)의 형성과 유지에 필요하다. 따라서 비타민 C가 결핍되면 신체의 아무 부분에서나 출혈이 생기며, 치아와 잇몸의 구조가 변하고, 관절의 확대 및 출혈로 인한 빈혈 등 괴혈병 증세가 나타난다[18, 27]. 또한, 산업적으로 면역 부활 작용, 항바이러스 작용, 항종양 작용 등의 약리 효과[11, 23]와 노화, 염증, 자가 면역 질환, 허혈 장기 장애, 동맥 경화 등의 발증·악화의 주원인인 활성 산소를 제거하는 항산화 작용으로 의약품, 화장품 및 식품 첨가물로 이용되는 등 여러 분야에서 광범위하게 응용되어지고 있다[9, 25, 28]. 그러나 이러한 유용성에도 불구하고 열이나 자동 산화에 아주 민감하여 쉽게 분해되는 단점이 있으며 이를 해결하기 위해 여러 가지의 비타민 C 유도체를 연구해 왔다. 현재까지 비교적 안정형 ascorbic acid(AA) 유도체로 알려져서 연구가 진행된 것에는 L-ascorbic acid 2-O-phosphate(AA-2P)[6, 20], L-ascorbic acid 2-O-sulfate(AA-2S)[4, 10, 14, 19], 2-O-octadecyl-ascorbic acid(CV-3611)[26] 및 L-ascorbic acid 2-methylester(AA-2M)가 있으나 열이라

든지 수용액 중에서의 안정성을 포함한 물리 화학적 성질, 생체 적용시의 안전성, 공업적 생산 단계 및 생리 활성 등에 있어서, 이 모든 문제점을 해결한 유도체라고는 말할 수 없다. 그러나 1990년 일본의 Yamamoto 등이 2-O- α -D-glucopyranosyl L-ascorbic acid(AA-2G)라고 하는 신규 AA 유도체를 발견하였는데, 이는 열과 산화에 안정하며 인체 투여 시 비타민 C와 같은 기능을 가질 뿐만 아니라 Fe²⁺라든지 Cu²⁺의 존재 하에서도 안정하며 ascorbate oxidase에 대해서도 저항성을 가지고 있다[30, 31]. 특히 AA-2G는 주로 *Bacillus* 속이 생산하는 당전이 효소인 cyclodextrin glucanotransferase(CGTase, EC 2.4.1.19)에 의해 합성이 가능한데[8] 이는 AA-2G의 효소적 대량 생산의 가능성을 의미한다. CGTase는 전분에 작용해서 분자내 당전이 반응에 의해 cyclodextrin(CD)을 합성하는 효소로 발견되었는데, glucose 라든지 fructose 같은 수용체가 존재하면, starch, CD 등의 glucose를 이들의 acceptor에 전이하는 성질을 가진 특이적인 효소이다. 일반적으로 효소 반응은 효소를 물에 용해시킨 상태에서 기질에 작용시키는 회분법으로 수행되고 있는데 이 방법은 반응 후에 효소의 회수가 어려워 비경제적이다. 따라서 이러한 결점을 보완하기 위해 고정화라는 방법이 도입되기 시작하였고[5], 지금까지 여러 다른 출처의 CGTase가 성공적으로 고정화되어 왔다[29]. 예를 들어 Nakamura 등이 호일칼리성 *Bacillus*에서 생

*Corresponding author
Tel: 82-51-510-2270, Fax: 82-51-513-4532
E-mail: hkjun@pusan.ac.kr

산된 CGTase를 vinylpyridine copolymer에 흡착하여 최초로 CGTase 고정화가 이루어졌으며[21], Takahashi 등은 styrene-divinyl benzene copolymer에[14], 헝가리에서는 carbodiimide를 사용하여 cellulose와 dextrin의 aminoacryl 유도체에 CGTase를 공유결합 시켰으며[13], 나아가 Okada 등은 *Bacillus macerance* 유래의 CGTase를 polysulfone capillary membrane에 고정화하여 CD 생산 kinetic에 관한 연구를 수행하였으며[22], Park 등은 calcium-alginate와 xanthan gum을 이용한 CGTase whole cell의 capsulation 고정화를 시행한 바 있다[24]. 하지만 지금까지의 CGTase 고정화는 CD 생산을 목적으로 연구되어졌을 뿐 한단계 나아가 CGTase를 이용하여 AA를 AA-2G로 전환하는 당전이 반응을 목적으로 한 CGTase의 고정화에 대한 연구는 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 AA-2G 생산 분리 균주인 *Paenibacillus* sp. JB-13의 CGTase 최적 고정화 방법 및 그 조건을 확립하고, 고정화된 CGTase의 특성을 조사하여 고정화 CGTase를 이용한 AA-2G의 연속 반응 생산의 가능성을 밝힘으로서, AA-2G의 대량 생산과 당전이 반응을 위한 *Paenibacillus* 유래의 CGTase를 고정화하는 방법 등을 확립하였다.

재료 및 방법

조효소액의 제조

Paenibacillus sp. JB-13을 배양한 후[3] 균 배양액을 원심 분리(15,000×g, 10 min, 4°C)한 후 상등액을 회수하여, 50%의 ammonium sulfate로 침전시키고[3], 침전물을 원심 분리(15,000×g, 40 min, 4°C)하여 회수하고 50 mM phosphate buffer(pH 6.5)로 투석한 후 조효소액으로 사용하였다. 그리고 CNBr-activated sepharose 4B의 효소량에 따른 고정화 최적 조건 검토에서는 필요한 고농도의 효소를 위해 ultrafiltration을 이용하여 더욱 농축시켰다.

CGTase의 활성 측정

CGTase의 활성 측정은 soluble starch를 기질로 하는 전분 분해능을 측정하여 Kitahata와 Okada의 방법을 응용하였다[16]. 1%의 soluble starch 기질 용액(50 mM sodium citrate buffer, pH 6.0) 1 ml에 조효소액 100 µl를 가하여 37°C에서 30 분간 반응한 후 0.01 M I₂-0.25 M KI 용액을 200 µl 첨가하여 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 37°C에서 한 시간 당 1 mg의 starch를 분해하는 효소의 활성을 1 unit으로 정의하였다. 그리고 단백질의 상대적인 양은 280 nm에서의 흡광도로 측정하였다.

담체의 종류

CGTase의 고정화에 사용된 이온 교환 담체인 Dowex 1×8, Amberlite IRA 900, Amberlite IRA 96, Amberlite 200, Amberlite IRC 50, chitosan, CNBr-activated sepharose 4B는 Sigma Chemical Co.(U.S.A.)으로부터 구입하였고, DEAE-Sephadex A

50, CM-Sephadex C 50은 Pharmacia Fine Chemical Co. (Sweden)으로부터, Diaion DA 418은 Sigma Chemical Co. (U.S.A.)으로부터 구입하여 사용하였다. 또한 공유 결합 담체인 chitosan은 Sigma Chemical Co.(U.S.A.)의 게 껍질로부터 추출된 것을 사용하였고, glutaraldehyde는 Sigma Chemical Co.(U.S.A.)의 grade I: 70% aqueous solution을 희석하여 사용하였다.

고정화 담체의 제조

이온 교환 수지는 불순물 제거를 위해 증류수로 세척한 후 각 수지들의 ionic form에 따라 0.5 N NaOH와 0.5 N HCl로 반복 세척하여 다른 이물질들을 탈착시켰다. 그리고 각 담체를 다양한 pH의 50 mM sodium citrate 완충 용액(pH 5.0~6.0)과 phosphate 완충 용액(pH 6.0~7.0)에서 30 분간 평형화시킨 후 각 실험에 사용하였다.

Chitosan의 활성화는 5% glutaraldehyde가 포함된 50 mM sodium citrate 완충 용액(pH 6.0)과 chitosan을 37°C의 진탕 항온 수조(100 rpm)에서 1시간 동안 반응시킨 후 증류수로 세척하여 반응을 정지시켰다[1]. 활성화가 끝난 chitosan은 위와 동일한 완충용액에서 30분간 평형화시킨 후 각 실험에 사용하였다.

CNBr-activated sepharose 4B는 불순물 제거를 위해 1 mM HCl로 세척한 후[1] 50 mM sodium citrate 완충 용액(pH 6.0)에서 30분간 평형화시킨 후 각 실험에 사용하였다.

CGTase 고정화

이온 교환 수지에 의한 고정화는 이온 교환 수지를 활성화시킨 후 흡입 플라스크를 이용하여 수분을 제거한 다음 각 담체 1 g을 다양한 pH의 완충 용액, 50 mM sodium citrate 완충 용액(pH 5.0~6.0)과 phosphate 완충 용액(pH 6.0~7.0) 1.4 ml에 혼합하여 37°C에서 30 분간 평형화시키고 0.6 ml의 조효소액을 첨가하여 37°C의 진탕 항온 수조(100 rpm)에서 3시간 동안 고정화하였다.

Chitosan에 의한 고정화는 활성화된 chitosan 0.5 g에 동일 완충 용액 2 ml를 혼합하여 30분간 평형화시킨 후 1 ml의 조효소액을 첨가하여 37°C의 진탕 항온 수조(100 rpm)에서 24시간 동안 고정화하였다.

CNBr-activated sepharose 4B에 의한 고정화는 1 mM HCl로 세척한 CNBr-activated sepharose 4B 0.2 g에 50 mM citrate 완충 용액(pH 6.0) 1.5 ml를 혼합하여 30분간 평형화시킨 후 1 ml의 조효소액을 첨가하여 37°C의 진탕 항온 수조(100 rpm)에서 12시간 동안 고정화하였다.

고정화율의 계산

CGTase의 고정화 시 효소의 고정화율은 아래와 같은 식이며 고정화 전후의 유리 효소의 활성은 전술한 soluble starch 분해능으로 측정하였다.

고정화율(Immobilized ability) =

$$\frac{(\text{고정화 전} - \text{고정화 후}) \text{의 CGTase 활성}}{\text{고정화 담체의 양}} = \text{units/g}$$

고정화 효소에 의한 AA-2G 생산

3%의 soluble starch와 2%의 ascorbic acid-Na이 포함된 기질 용액(50 mM sodium citrate 완충용액, pH 6.0) 3 ml에, 효소가 고정화된 담체 1 g씩을 첨가하여 37°C의 진탕 항온 수조(100 rpm)에서 24시간 반응한 후, 반응액 2 ml을 cap tube에 넣은 다음, 20 units의 glucoamylase를 첨가해서 55°C의 진탕 항온 수조(100 rpm)에서 12시간 반응시켜 HPLC로 AA-2G를 정량하였다. 이때 chitosan에 고정화된 CGTase 0.5 g과 CNBr-activated sepharose 4B에 고정화된 CGTase 0.2 g을 기질용액 3 ml과 각각 반응시켰다. 고정화 효소에 의해서 생성된 AA의 maltooligo 배당체(AA-2Gs, AA-2Gn)를 AA-2G로 전환시키기 위해 사용된 glucoamylase는 Sigma Chemical Co.(U.S.A.)의 *Rhizopus* 유래의 시판 효소를 사용하였다.

Ultrafiltration에 의한 CGTase 고정화

효소의 연속적 사용을 목적으로 한 CGTase 고정화 여부를 검토하기 위해 한외 여과를 실시하였다. Bac 등[3]이 본 연구의 효소인 CGTase의 분자량을 66,000 dalton으로 밝힌 바, pore size가 10,000 dalton과 30,000 dalton인 ultrafiltration membrane(YM 10, Millipore)을 한외 여과에 이용하였다. 기질 용액과 CGTase를 반응시켜 AA-2G를 생산하고 한외 여과로 다시 CGTase를 회수한 후, 다음 기질 용액과 반응시키는 조작을 10회까지 반복하여 얻어지는 AA-2G량의 변화를 관찰하였다. 즉, 250 ml 용량의 삼각 플라스크에 9% soluble starch, 6% ascorbic acid-Na와 0.015 M CaCl₂가 포함된 기질 용액(50 mM sodium citrate 완충액, pH 6.0) 20 ml에 1,600 units의 CGTase를 첨가하여, 37°C의 진탕 항온 수조(100 rpm)에서 24시간 반응시킨 후, 원심 분리(15,000×g, 10 min, 4°C)하여 침전물을 제거하고 한외 여과하였다. 여액은 200 units의 glucoamylase를 첨가하여, 55°C에서 12시간 반응시킨 다음 HPLC로 생성된 AA-2G 양을 분석하고, membrane의 CGTase는 동일한 기질 용액 20 ml로 회수하여 다시 24시간 반응시키는 반복 실험을 행하였다. 이때 사용된 ultrafiltration kit은 amicon사의 Pmax(75 psi, 5.3 kg/cm²)이다.

AA-2G의 분석 방법

AA-2G 표준품은 일본 Kinki 대학 식품과학과의 Sakai 교수로부터 공급받아 사용하였으며 반응 산물액 20 μl에 1 unit ascorbate oxidase(Sigma Co.)를 첨가하여 실온에서 20분 동안 반응한 후 HPLC로 분석하였다. HPLC 분석 기기는

Model-515(Waters Co.) Pump, Capcell pak C₁₈ column(Shiseido Co.), Model-2487(Waters Co.) UV detector를 사용하였으며 room temperature에서 0.1 M potassium phosphate-phosphoric acid(pH 2.0)를 0.5 ml/min으로 유지하고, 20 μl를 injection 하여 230 nm에서 peak를 검출한 후 standard(AA-2G 표준품)의 면적과 비교하여 AA-2G 양을 계산하였다.

결과 및 고찰

최적 고정화 담체 선정

효소는 구성 성분인 아미노산의 종류에 따라 전기적 성질이 다르며 pH에 따라 이온 결합에 의한 효소 고정화율의 차이를 예상할 수가 있다. 따라서 다양한 pH에서 여러 종류의 이온 교환 담체들을 이용하여 CGTase 고정화율을 관찰하였는데, 그 결과 weak anionic exchanger인 Amberlite IRA 96이 pH 6.5에서 440 units/g resin으로 가장 높은 고정화율을 보였으며, 다음으로 strong anionic exchanger인 DEAE-sephadex A 50이 436 units/g resin, Dowex 1×8이 386 units/g resin으로 나타났다. 또한 weak cationic exchanger인 CM-Sephadex C 50이 pH 5.0에서 410 units/g resin의 고정화율을 보였고, Amberlite IRC 50이 pH 6.0에서 292 units/g resin으로 그 외 다른 이온 교환 담체보다 높은 고정화율을 보였다. 그러나 본 효소는 In 등[12]이 *Bacillus macerans* 유래의 CGTase를 Diaion HPA 75에 고정화한 결과와 Kim 등[17]이 *Thermoanaerobacter* sp. 유래의 CGTase를 Amberlite IRA 900에 고정화한 결과와는 달리 이온 결합으로서 높은 CGTase 고정화율은 기대할 수 없었다. 따라서 공유 결합에 의한 본 효소의 고정화율을 관찰하였고, 그 결과 glutaraldehyde로 활성화시킨 chitosan에 의한 CGTase 고정화율은 pH 6.0에서 500 units/g resin으로 높았으나 월등한 차이를 보이지 않았으며, CNBr-activated sepharose 4B의 경우 pH 6.0에서 2,034 units/g resin으로 Amberlite IRA 96의 440 units/g resin보다 4.6배, chitosan의 500 units/g resin보다 4배의 높은 고정화율을 보였다. 사용한 고정화 담체 중, 본 효소의 고정화율은 CNBr-activated sepharose 4B에서 월등히 높아 그 가능성을 확보하였다.

이온 결합 및 공유 결합에 의한 본 효소의 활성 변화를 관찰하기 위하여 고정화 CGTase를 이용한 AA-2G 생산량을 비교해 보았다. 고정화 CGTase와 같은 효소 활성을 가지는 양의 유리 CGTase로 AA-2G를 생산하고 이에 대한 고정화 CGTase의 AA-2G 생산량을 백분율로 나타내어 여러 담체들에 결합된 고정화 CGTase의 활성을 비교하였다. 그 결과, Fig. 1에서 보는 바와 같이 이온 결합에서는 DEAE-Sephadex A 50이 39%으로 높은 편이었고 나머지는 10% 미만의 아주 낮은 산물 생산율을 보였다. 또한 이온 결합에 고정화된 CGTase와 산물과의 반응에서 기질과 산물 역시 ascorbic acid로 전하를 띠는 물질이므로 24 시간의 반응 후

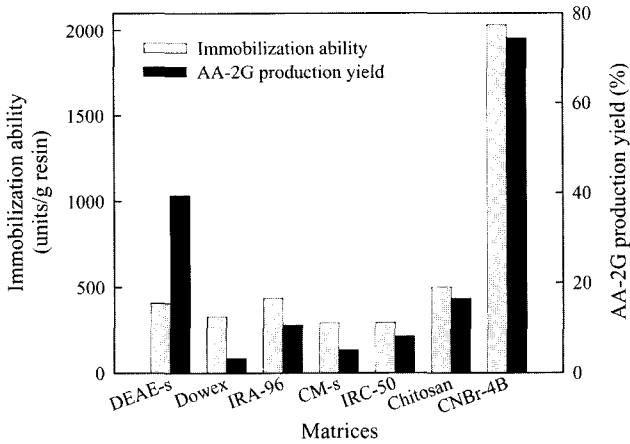


Fig. 1. Comparison of immobilization ability of CGTase on various matrices and 2-O- α -D-Glucopyranosyl L-Ascorbic acid (AA-2G) production yield of immobilized CGTase. CGTase were immobilized and incubated at 37°C for 24 hrs in the reaction mixture containing 2% (w/v) of soluble starch and 3% (w/v) L-ascorbic acid sodium salt. AA-2G production yield is percent of AA-2G produced by immobilized CGTase compared to that by free CGTase with same enzyme units. DEAE-s, DEAE-Sephadex A 50; Dowex, Dowex 1×8; IRA-96, Amberlite IRA 96; CM-s, CM-Sephadex C 50; IRC-50, Amberlite IRC 50; CNBr-4B, CNBr-sepharose 4B.

pH가 3~5까지 떨어지는 불안정한 변화를 관찰할 수 있었다. 반면에 CNBr-activated sepharose 4B에 고정화된 CGTase는 74%로 월등히 높은 산물 생산율을 보였으며 반응 후 pH 변화도 관찰할 수 없어 본 효소의 가장 적당한 고정화 담체임을 판명할 수 있었다. 따라서 CNBr-activated sepharose 4B를 본 효소의 고정화 담체로 선정하고 고정화의 최적 조건 및 CNBr-activated sepharose 4B에 고정화된 CGTase의 성질을 비교하여 산물 생성에 있어서의 최적 조건을 검토하였다.

CNBr-activated sepharose 4B에 의한 최적 고정화 조건의 검토

고정화 시간에 따른 영향은 공유 결합에 의한 효소의 고정화율에 영향을 미치는 요인들로 저분자량의 물질, pH, 고정화 시간, 고정화 담체와 효소의 비 등 여러 가지가 있다. 여기서는 가장 큰 영향을 줄 수 있는 고정화 시간 및 고정화 담체와 효소의 비의 2가지 요인을 관찰하였다. 먼저 고정화 시간에 따른 변화를 보기 위하여 CNBr-activated sepharose 4B 0.2 g에 1 ml의 평형화 완충 용액과 1 ml의 효소를 넣어 37°C의 진탕 항온 수조(100 rpm)에서 시간에 따른 고정화율을 관찰한 결과, Fig. 2에서 보는 바와 같이 9시간에서 최고의 고정화율을 보였으며 12시간에서는 오히려 감소함을 알 수 있었다. Transglucosidase를 CNBr-activated sepharose 4B에 고정화 시 약 12시간임이 보고된 바 있는데 [1, 2], 흡착법을 이용한 고정화 효소의 생성에 있어서 고정화 시간은 고정화 담체의 종류 뿐 아니라 고정화 효소

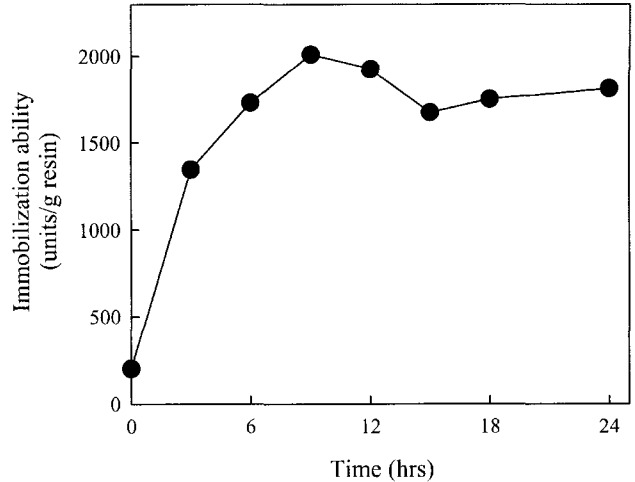


Fig. 2. Effect of reaction time on immobilization ability of CGTase on CNBr-activated sepharose 4B. 1 ml of CGTase were incubated at 37°C for each time with 0.2 g of CNBr-activated sepharose 4B that were equilibrated at 37°C for 30 min with 1 ml of 50 mM sodium citrate buffer (pH 6.0), and immobilization ability of CGTase were measured.

의 종류에도 영향을 받는 것으로 사료된다. 따라서 본 효소의 최적 고정화 시간은 9시간 부근이며 이후의 모든 실험에서 담체와 효소의 반응시간을 9시간으로 고정하였다.

고정화 담체와 효소의 최적 비를 선정하기 위해서, 담체 0.2 g에 CGTase 첨가량을 400 units/g resin에서 5,600 units/g resin까지 증가시켰으며, 동일한 조건을 위해서 50 mM sodium citrate buffer(pH 6.0)에 ultrafiltration으로 고농도로 농축시킨 조효소액을 총 부피가 2 ml가 되도록 첨가하였다. 이에 각 농도에서의 고정화율을 측정하였고, 단위의 일치를 위해 units/g resin으로 환산하였으며, 첨가량에 대한 고정화율을 비교하기 위해 흡착율은 백분율로 나타내었다. 그 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이, 12,000 units/g resin까지 97%의 흡착율로 거의 첨가한 모든 효소가 고정화됨을 알 수 있었고, 24,000 units/g resin까지는 흡착율이 77%로 감소하였으나 고정화율은 18,000 units/g resin으로 최고에 달했으며, 효소량 28,000 units/g resin을 첨가하였을 때는 64%의 흡착율과 약간의 감소된 고정화율을 보였다. 따라서 본 효소와 담체의 최적비는 담체 1 g당 24,000 units의 효소량임을 알 수 있었다.

고정화 CGTase의 AA-2G 최적 생산 조건 검토 및 유리 CGTase와의 성질 비교

고정화 CGTase에 의한 AA-2G 생산에 대한 최적 pH를 검토하고, 고정화 전의 CGTase 최적 pH와는 어떠한 차이를 가지는지 알아보기 위하여, pH 3~8의 50 mM 완충 용액을 사용해서 고정화 CGTase와 유리 CGTase의 AA-2G 생산율을 비교하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 최적 pH는 pH 5.0으로 고정화 CGTase와 유리 CGTase에 있어 모두 변화

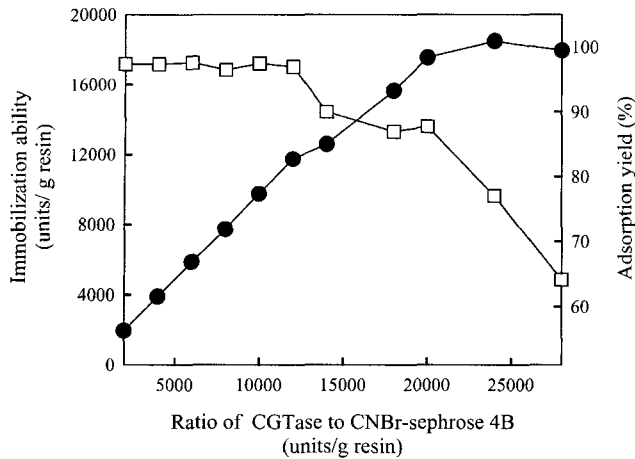


Fig. 3. Effect of the mixing ratio of CGTase and CNBr-activated sepharose 4B on immobilization ability. Various amounts of CGTase ranging from 400 to 5,600 units of CGTase were incubated at 37°C for 24 hrs with 0.2 g of CNBr-activated sepharose 4B that were equilibrated at 37°C for 30 min with 1 ml of 50 mM sodium citrate buffer (pH 6.0), and immobilization ability of CGTase were measured. -●-, Immobilization ability; -□-, Adsorption yield.

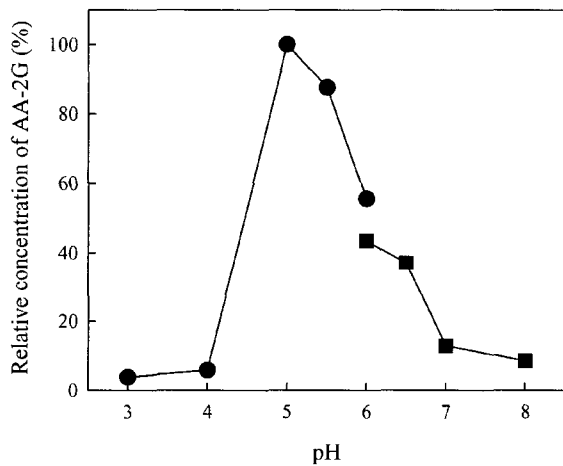


Fig. 4. Effect of pH on production of AA-2G by immobilized CGTase. Reaction was carried out for 24 hrs at 37°C and various pHs in the reaction mixture containing 2% (w/v) of soluble starch and 3% (w/v) L-ascorbic acid sodium salt. -●-, Immobilized CGTase in sodium citrate buffer; -■-, Immobilized CGTase in phosphate buffer.

가 없었다. 하지만 유리 CGTase의 AA-2G 생산율은 pH 5.5에서 61%로 급격히 감소하여 pH 6.5에서 37%의 AA-2G 생산율을 보이는 반면, 고정화 CGTase는 pH 5.5에서 87%로 비교적 안정한 감소율을 보이며 pH 6.5에서 36%로 유리 CGTase와 비슷한 AA-2G 생산율을 보였다. Nakamura 등 [21]의 보고에 의하면, alkalophilic *Bacillus* sp.의 CGTase를 vinylpyridine copolymer에 고정화 한 후 효소의 최적 활성 pH가 pH 7.5에서 pH 5.0으로 변화함을 보였으나, Lee[17]와 Park[15]의 *Bacillus* 유래의 CGTase를 흡착법에 의해 고

정화한 경우에는 최적활성 pH가 거의 변화가 없음을 나타낸다. 또한 transglucosidase를 CNBr-activated sepharose 4B에 고정화한 An[2]의 연구에서도, 최적 pH에는 변화가 없었으나 염기성 영역에서 고정화 효소가 유리 효소보다 더 높은 효소 활성을 보인 바 있으며, 이러한 변화는 반응 용액 (macroenvironment)의 pH와 고정화 효소가 있는 미세 환경의 pH가 서로 다르기 때문이라는 보고가 있다[7]. 따라서 본 고정화 효소의 최적 pH는 5.0으로 이후의 실험에서 산물 생산 반응은 50 mM sodium citrate buffer(pH 5.0)에서 실시하였다.

고정화 CGTase에 의한 AA-2G 생산의 최적 온도를 검토하기 위해, 각각의 온도에서 24시간 반응한 후 AA-2G 생산율을 비교한 결과, Fig. 5에서와 같이 37°C에서 가장 높았으며 40°C에서 99%로 비슷하였으나 30°C에서 64%, 50°C에서 52%로 온도에 민감한 반응을 보였다. 이 결과는 Bae 등 [3]의 연구에서 유리 CGTase의 AA-2G 생산의 최적 온도가 37°C인 것과 동일하였으며, 본 고정화 효소의 산물 최적 생성 온도도 37°C로 선정하였다.

Bae 등[3]의 연구에서 본 유리 효소의 glucosyl donor에 관한 검토 결과, dextrin과 soluble starch가 우수하였으며, AA-2G의 생산 단가 절감의 측면에서 기질을 soluble starch와 AA로 선정하였다. 고정화 CGTase의 AA-2G 생산에 있어 최적의 기질비를 결정하기 위해서, 최종 기질 농도를 20%로 고정하고 여러 혼합비를 가진 기질에 대해서 반응시켜 유리 CGTase와 비교 검토하였다. 그 결과 고정화 CGTase의 AA에 대한 AA-2G 전환율은 AA-Na/soluble starch 비가 2:3일 때가 높았으나 가장 많은 AA-2G를 생산한 것은 3:2의 비였다(Fig. 6). 유리 CGTase의 경우, 또한 근소한 차이지만 3:2의 비에서 가장 많은 AA-2G 생산성을 보였다(data

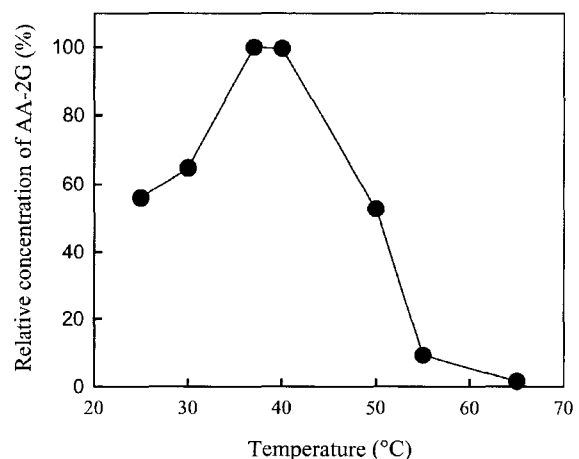


Fig. 5. Effect of temperature on production of AA-2G by immobilized CGTase. Reaction was carried out for 24 hrs at various temperatures in the reaction mixture containing 2% (w/v) of soluble starch and 3% (w/v) L-ascorbic acid sodium salt (pH 5.0). AA-2Gs were hydrolyzed by 20 units of glucoamylase at 55°C, for 24 hrs.

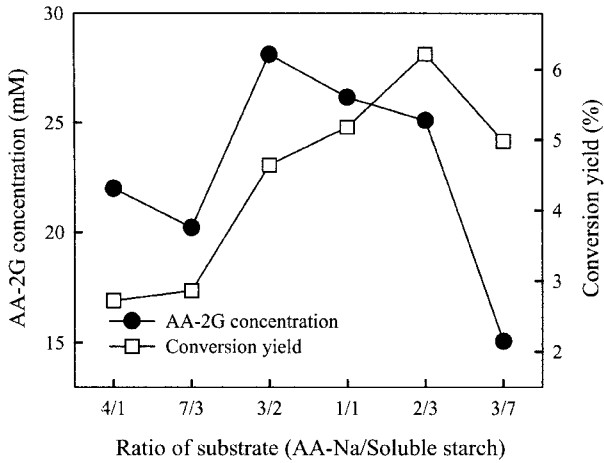


Fig. 6. Effect of substrate ratio on production of AA-2G by immobilized CGTase. Reaction was carried out for 24 hrs at 37°C in the reaction mixture containing 20% (w/v) of substrate (pH 5.0) with 1,000 units of immobilized CGTase. AA-2Gs were hydrolyzed by 20 units of glucoamylase at 55°C for 24 hrs.

not shown). 따라서 본 고정화 CGTase의 AA-Na/soluble starch의 최적 비율 3:2로 선정하고 이후의 실험에 적용하였다.

기질 농도가 고정화 CGTase의 AA-2G 생산에 미치는 영향을 조사하기 위해, AA-Na/soluble starch의 혼합비를 3:2로 고정시킨 후, 기질의 첨가 농도를 5, 10, 15, 20, 25%로 하여 각각의 AA-2G 농도와 AA에 대한 AA-2G 전환율을 측정하였다. 유리 CGTase가 기질의 농도 15%에서 가장 높은 AA-2G 전환율을 보인 반면(data not shown), 고정화 CGTase의 경우는 20%의 기질 농도에서 AA-2G양과 전환율이 최고에 달했으며 기질 농도 25%에서는 AA-2G 생산량 또한 감소하였다(Fig. 7). 따라서 본 고정화 CGTase의 최적 기질 농도는 20%로 선정하였다.

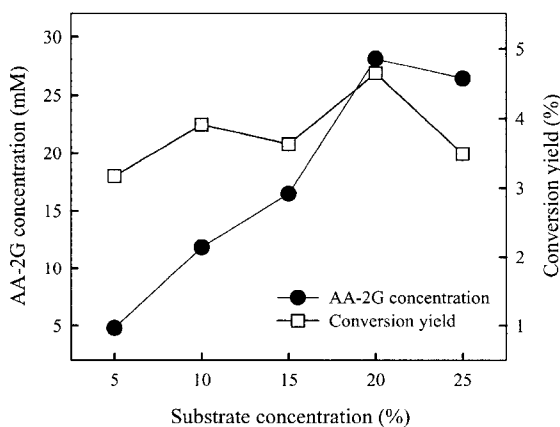


Fig. 7. Effect of substrate concentration on production of AA-2G by immobilized CGTase. Reaction was carried out for 24 hrs at 37°C and various substrate concentration with 1,000 units of immobilized CGTase and the mixing ratio of AA-Na to soluble starch was fixed as 3:2 (w/w). AA-2Gs were hydrolyzed by 20 units of glucoamylase at 55°C for 24 hrs.

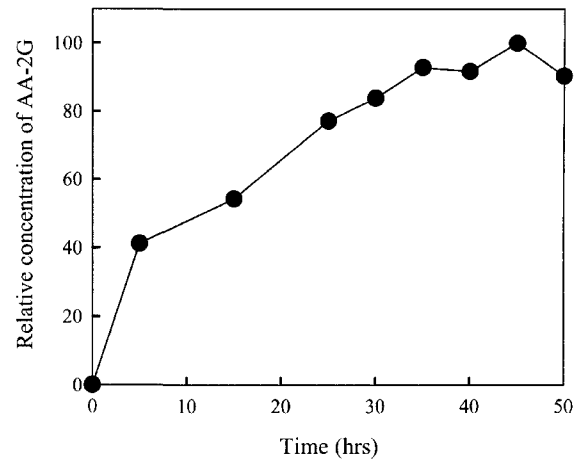


Fig. 8. Effect of reaction time on production of AA-2G by immobilized CGTase. Reaction was carried out for each time at 37°C in the reaction mixture containing 8% (w/v) of soluble starch and 12% (w/v) L-ascorbic acid sodium salt. AA-2Gs were hydrolyzed by 20 units of glucoamylase at 55°C for 24 hrs.

기질과 고정화 CGTase의 반응 시간에 따른 AA-2G 생산의 경시적인 변화를 관찰하여 최적 반응 시간을 선정하였다. Fig. 8에서 보는 바와 같이 AA-2G 생산율은 25시간까지 급격히 증가하여 77%에 달했으며 그 후 20시간 동안 완만한 증가로 100%에 달했다. 그러나 반응 시간에 따른 AA-2G 생산율은 일정 기질량에 대한 효소의 양과 밀접한 관련이 있으며 효소량의 증가에 따라 반응 시간도 단축될 수 있을 것이다. 따라서 본 고정화 CGTase의 최적 반응 시간을 최고의 AA-2G 생산율을 보인 45시간이 아닌 급격한 증가를 보이는 25시간으로 선정하여 다음의 효소 농도를 결정하였다.

고정화 CGTase 농도에 의한 AA-2G 생산성을 검토하기 위해, 50 mM sodium citrate buffer(pH 5.0)에 12%의 AA-Na와 8%의 soluble starch(3:2)을 혼합하여, 고정화 CGTase의 양을 달리 첨가한 후 37°C의 진탕 항온 수조(100 rpm)에서 25시간 동안 반응하였다. 그 결과 Fig. 9에서 보는 바와 같이, 기질 용액 1 ml당 800 units의 고정화 CGTase를 첨가하였을 때 생성되는 AA-2G의 양이 가장 높았으며, 그 이상의 고정화 CGTase 농도에서는 같거나 감소함을 알 수 있었다. 따라서 기질에 대한 본 고정화 CGTase의 최적 농도는 800 units/ml임을 알 수 있었다.

고정화 CGTase의 재사용성의 검토

상기의 CGTase의 최적 고정화 조건과 고정화 CGTase에 의한 AA-2G 최적 생산 조건을 바탕으로 고정화 CGTase의 재사용성을 검토하였다. 또한 Bae 등[3]의 연구에서 0.015 M의 CaCl₂ 첨가에 따른 AA-2G 생산의 향상이 확인되었는데, 이에 CaCl₂ 첨가 여부에 따른 AA-2G 생산율이 어떻게 변하는지를 비교 검토하였다. 2,400 units의 고정화 CGTase와 0.015 M의 CaCl₂가 첨가된 기질과 첨가되지 않은 20%

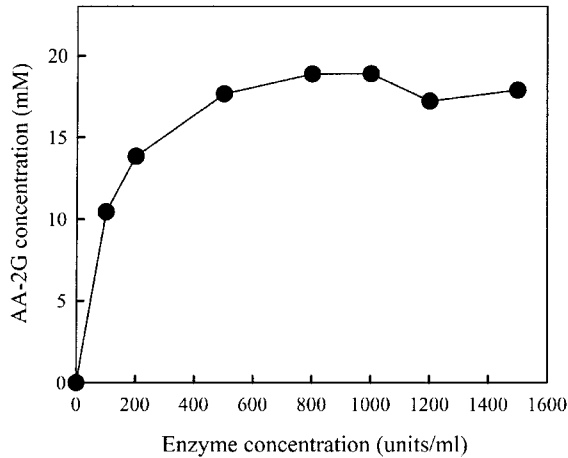


Fig. 9. Effect of enzyme concentration on production of AA-2G by immobilized CGTase. Reaction was carried out for 25 hrs at 37°C in the reaction mixture containing 8% (w/v) of soluble starch and 12% (w/v) L-ascorbic acid sodium salt with various concentration of immobilized CGTase. AA-2Gs were hydrolyzed by 20 units of glucoamylase at 55°C for 24 hrs.

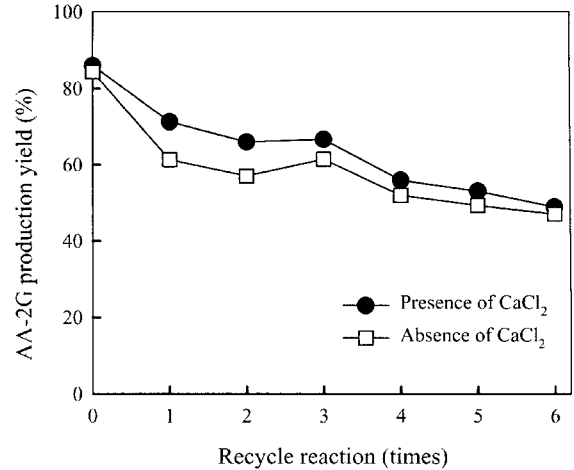


Fig. 10. Effect of recycling of immobilized CGTase on AA-2G production yield. Reaction mixtures containing 8% (w/v) of soluble starch, 12% (w/v) L-ascorbic acid sodium salt, 800 units/ml immobilized CGTase were incubated at 37°C for 25 hrs in the presence (●) or absence (□) of 0.015 mM CaCl₂. AA-2Gs were hydrolyzed by 20 units of glucoamylase at 55°C for 24 hrs.

의 기질 용액(50 mM sodium citrate buffer, pH 5.0) 3 ml 을 각각 혼합하여 25시간 반응시켰다. 반응 종료 후 고정화 담체를 수거하여 완충 용액으로 씻은 후, 여기에 초발 효소 량의 25%에 해당하는 600 units의 새로운 고정화 효소를 첨 가하고 같은 방법으로 AA-2G를 생산하였다. 이러한 조작을 6회 반복 실시하였으며 각 회마다 AA-2G 생산율을 검토하 였다. 이때 AA-2G 생산율은 같은 양의 유리 CGTase의 AA-2G 생산량에 대한 고정화 CGTase의 AA-2G 생산량이며, Fig. 10에서 보는 바와 같이, CaCl₂가 첨가되었을 경우 5회까지 약 53%의 AA-2G 생산율을 유지하였으나, CaCl₂가

첨가되지 않은 경우의 고정화 CGTase 재사용성은 4회까지 약 51%의 AA-2G 생산율로 약간 저조하였다. 따라서 본 고 정화 효소에 의한 AA-2G 생산에 있어서 0.015 M의 CaCl₂ 를 첨가하는 것이 훨씬 더 효율적이며 또한 반복 사용성의 가능성도 확인할 수 있었다.

Ultrafiltration막에 의한 CGTase 고정화

효소의 재사용성이라는 측면에서, 불용성 담체에 효소를 결합시키지 않고 가능한 일종의 효소 고정화를 검토하였다 [5]. 본 연구에서는 한외 여과를 이용하여 CGTase의 고정화

Table 1. Comparison of AA-2G production yield according to recovery times and membranes

The number of times	NMWL ¹⁾ : 10,000		NMWL ¹⁾ : 30,000	
	AA-2G concentration (mg%)	Yield ²⁾ (%)	AA-2G concentration (mg%)	Yield ²⁾ (%)
0	49.41	100	49.10	100
1	63.67	128.86	61.63	125.52
2	62.85	127.20	37.38	76.13
3	53.31	107.89	31.81	64.79
4	49.19	99.55	29.95	61.00
5	38.19	77.29	24.67	50.24
6	29.55	59.81	11.28	22.97
7	27.58	55.82	7.93	16.15
8	25.07	50.74	3.19	6.50
9	17.29	33.99	-	-
10	12.09	24.47	-	-

¹⁾ Nominal Molecular Weight Limit

²⁾ Yield=(Each time concentration of AA-2G/Initial concentration of AA-2G)×100(%)

여부를 알아보기 위해 AA-2G 생산에 있어서의 한외 여과를 이용한 CGTase의 재사용성을 검토하였다. 앞서 기술한 조건으로 10회 즉, 10일 간 연속적인 효소 반응을 실시하였고, 또한 여과 속도의 효율성을 검토하기 위해서 두 가지의 pore size를 가진 membrane(YM 10, NMWL: 10,000; YM 30, NMWL: 30,000)을 이용하였다. Table 1에서 보는 바와 같이, AA-2G 생산량이 100%를 우회한 것은 YM 10을 사용하였을 경우 3 회까지였고 YM 30의 경우는 1회에 지나지 않았다. 이는 CGTase의 효소 활성을 방해하던 경쟁적 효소들과 그 외 물질이 제거되어 나타난 일시적 현상이라 예측할 수 있다. 그 이후 YM 10은 8 회까지 대체적으로 일정한 감소율을 보여 50%에 이르렀으며 YM 30은 5회에서 50%의 AA-2G 생산율을 보였다. 또한 두 종류의 membrane 모두 50% 이하부터는 AA-2G 생산량이 급격히 감소하였으며, YM 30은 8회에서 6.5%로 아주 낮은 생산량을 보였을 뿐 아니라 여과 속도에 있어서도 YM 10과 별다른 차이를 보이지 않았다. 따라서 YM 10을 이용한 한외 여과는 8회까지도 50%이상의 AA-2G 생산율을 보이므로, 본 효소의 효율적인 고정화의 한 방법으로 생각할 수 있었으며, 반응 중간에 적당량의 CGTase를 첨가함으로써 더 좋은 결과를 얻을 수 있을 것으로 예상되어진다.

요 약

AA를 AA-2G로 전환하는 CGTase를 고정화하여 AA-2G 대량 생산의 가능성을 고찰한 결과, CNBr-sepharose 4B가 가장 효과적인 담체로 판명되었고, CGTase의 고정화 최적 조건과 고정화 CGTase에 의한 AA-2G 생산의 최적조건 및 재사용성을 검토하였다. 최적 고정화 조건은 효소량 24,000 units/g resin으로 9시간 반응하여 약 18,000 units/g resin의 최고 고정화율을 얻을 수 있으며, pH 5.0(50 mM sodium citrate buffer)용액에 12% AA-Na와 8% soluble starch를 기질로 하여 800 units/ml의 고정화 CGTase를 첨가한 후 37°C에서 100 rpm으로 교반하면서 25 시간 반응하여 약 18 mM의 AA-2G 최고량을 얻을 수 있었다. 또한 0.015 mM의 CaCl₂를 첨가하여 고정화 CGTase의 재사용성을 관찰한 결과, 5회까지 50% 이상의 AA-2G 생산율로서 그 가능성을 입증할 수 있었다. 그리고 효소의 재사용성이란 측면에서, 본 고정화의 다른 한 방법인 ultrafiltration(한외 여과)에 의해서는 Millipore사의 YM 10 membrane을 이용하여 먼저 단백질량과 효소 활성 변화를 측정하여 그 가능성을 확보할 수 있었으며, 기질 20 ml를 사용하여 AA-2G를 생성시킨 후, 한외여과에 의해 효소만을 회수하여 연속 반응해 본 결과 8 회까지 50%의 생성률을 유지하였다. 따라서 한외 여과는 CNBr-sepharose 4B와 함께 효율적인 고정화의 한 방법으로 판명되었으며, 앞으로 이들 고정화 효소를 이용한 연속 반응 시스템의 구축이 뒤따라야 할 것이다.

감사의 글

본 연구는 Brain Busan 21 project(2002)에 의한 연구 결과의 일부로서 지원하여 주심에 감사드립니다.

REFERENCES

- Ahn, J. W., K. W. Park, and J. H. Seo. 1997. Immobilization of transglucosidase from *Aspergillus niger*. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **29**: 320-325.
- Ahn, J. W., K. W. Park, and J. H. Seo. 1998. Comparison of kinetic parameters, pH and thermal properties of soluble and immobilized transglucosidase from *Aspergillus niger*. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **30**: 630-637.
- Bae, K. M., S. K. Kim, I. S. Kong, and H. K. Jun. 2001. Purification and properties of cyclodextrin glucanotransferase synthesizing 2-O- α -D-glucopyranosyl L-ascorbic acid from *Paenibacillus* sp. JB-13. *J. Microbiol. Biotechnol.* **11**: 242-250.
- Baker, E. M., D. C. Hammer, S. C. March, B. M. Tolbert, and J. E. Canham. 1971. Ascorbate sulfate: a urinary metabolite of ascorbic acid in man. *Science* **173**: 826-827.
- Chibata, I. 1991. Immobilized biocatalyst. 9-16.
- Cinatl, J., C. Jaroslav, W. Bernard, R. Holger, O. G. Hermann, C. Jean-Francois, S. Martin, E., Albrecht, and W. D. Hans. 1995. *In vitro* inhibition of human cytomegalovirus replication in human foreskin fibroblasts and endothelial cells by ascorbic acid 2-phosphate. *Antiviral. Res.* **27**: 405-418.
- Goldstein, L. 1976. Kinetic behaviour of immobilized enzyme systems. In *Methods in Enzymology*, Mosbach, K.(ed.) Academic Press, New York **44**: 397-443.
- Hajime, A., Y. Masaru, S. Shuzo, and Y. Itaru. 1991. Synthesis of 2-O- α -D-glucopyranosyl L-ascorbic acid by cyclomalto-dextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus*. *Agric. Biol. Chem.* **55**: 1751-1756.
- Hornig, B., A. K. Naoshi, Christoph, and D. Helmut. 1998. Vitamin C improves endothelial function of conduct arteries in patients with chronic heart failure. *Circulation* **97**: 363-368.
- Hornig, D., H. E. Gallo-Torres, and H. Weiser. 1973. Abiliary metabolite of ascorbic acid in normal and hypophysectomized rats. *Biochim Biophys Acta.* **320**: 549-556.
- Ikeda, K., S. K. Ha-Kawa, A. Nakamura, T. Yamashita, and Y. Tanaka. 1998. The usefulness of Tc-99 m pertechnetate imaging with vitamin C stimulation in Warthin's tumor. *Clin. Nucl. Med.* **23**: 101-102.
- In, M. J., D. C. Kim, H. J. Chae, K. S. Choi, and M. H. Kim. 1997. Immobilization of cyclodextrin glucotransferase and its reaction characteristics regarding transglucosylated stevioside production. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 305-310.
- Ivony, K., B. Szajni, and G. Seres. 1983. Immobilization of starch degrading enzymes I. A comparative study on soluble and immobilized cyclodextrin glycosyltransferase. *J. Appl. Biochem.* **5**: 158-164.

14. Kato, T. and K. Horikoshi. 1984. Immobilized cyclodextrin glucanotransferase of alkalophilic *Bacillus* sp. No. 38-2. *Biotechnol. Bioeng.* **26**: 595-598.
15. Kim, P. S., H. D. Shin, J. K. Park, and Y. H. Lee. 2000. Immobilization of cyclodextrin glucanotransferase on Amberlite IRA-900 for biosynthesis of Transglycosylated xylitol. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **5**: 174-180.
16. Kitahata, S., N. Tsuyama, and S. Okada. 1974. Purification and some properties of cyclodextrin glycosyltransferase from a strain of *Bacillus* species. *Agric. Biol. Chem.* **38**: 387-393.
17. Lee, Y. H., S. H. Lee, and H. D. Shin. 1991. Evaluation of immobilization methods for cyclodextrin glucanotransferase and characterization of its enzymatic properties. *J. Microbiol. Biotechnol.* **1**: 54-62.
18. Manchester, K. 1998. More evidence that vitamin C may help prevent cataracts. *Mayo. Clin. Health Lett.* **16**: 4.
19. Mead, C. G. and F. J. Finamore. 1996. The occurrence of ascorbic acid sulfate in brine shrimp, *Artemia salina*, *Biochemistry* **8**: 2652-2655.
20. Mima, H., H. Nomura, Y. Imai, and H. Takashima. 1970. Chemistry and application of ascorbic acid phosphate. *Vitamin* **41**: 387-398.
21. Nakamura, N. and K. Horikoshi. 1977. Production of schardinger β -dextrin by soluble and immobilized cyclodextrin glycosyltransferase of an alkalophilic *Bacillus* sp. *Biotechnol. Bioeng.* **19**: 87-99.
22. Okada, T., M. Ito, and K. Hibino. 1994. Immobilization of cyclodextrin glucanotransferase on capillary membrane. *J. Ferment. Bioeng.* **77**: 259-263.
23. Seib, P. A. and B. M. Tolbert. 1982. Ascorbic acid, chemistry, metabolism and uses in *Advances in Chemistry Series 200, The American Chemical Society*.
24. Park, J. K., H. W. Park, and Y. H. Lee. 2000. Production of glucosyl-xylitol using encapsulated whole cell CGTase. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **15**: 35-41.
25. Rose, R. C., S. P. Richer, and A. M. Bode. 1998. Ocular oxidants and antioxidant protection. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **217**: 397-407.
26. Shimpo, K., H. Takahashi, H. Tsuda, T. Hibino, K. Kawai, C. Kimura, T. Nagatsu, and K. Fujita. 1996. Inhibition of hepatocellular carcinoma development and erythrocyte polyamine levels in ODS rats fed on 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene by hemicalcium ascorbate, 2-O-octadecylascorbic acid, and ascorbyl palmitate. *Cancer Detect Prev.* **20**: 137-145.
27. Simon, J. A., D. Grady, M. C. Snabes, J. Fong, and D. B. Hunninghake. 1998. Ascorbic acid supplement use and the prevalence of gallbladder disease. *J. Clin. Epidemiol.* **51**: 257-265.
28. Takahashi, K., A. Yukio, and T. Keiji. 1997. Effect of dietary ascorbic acid on the hepatic microsomal mixed function oxidase system in liver of chicks treated with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* **118**: 301-304.
29. Tonkova, A. 1998. Bacterial cyclodextrin glucanotransferase. *Enzyme Microb. Technol.* **22**: 678-686.
30. Yamamoto, I., N. Muto, K. Murakami, and J. Akiyama. 1992. Collagen synthesis in human skin fibroblasts is stimulated by a stable form of ascorbate, 2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid. *J. Nutr.* **122**: 871-877.
31. Yamamoto I., M. Tanaka, and N. Muto. 1993. Enhancement of *in vitro* antibody production of murine splenocytes by ascorbic acid 2-O- α -glucoside. *Int. J. Immunopharmacol.* **15**: 319-325.

(Received Feb. 27, 2003/Accepted Sep. 25, 2003)