

Bacillus sp. JK-43의 Cyclodextrin Glucanotransferase에 의한 2-O- α -D-Glucopyranosyl L-Ascorbic Acid 생산에 관한 연구

배경미 · 김영희 · 김성구* · 전홍기[†]

부산대학교 생명과학부

*부경대학교 생물공학과

Production of 2-O- α -D-Glucopyranosyl L-Ascorbic Acid by Cyclodextrin Glucanotransferase from *Bacillus* sp. JK-43

Kyung-Mi Bae, Young-Hee Kim, Sung-Koo Kim* and Hong-Ki Jun[†]

Division of Biological Sciences, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

*Dept. of Biotechnology and Bioengineering, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

Abstract

The 2-O- α -D-glucopyranosyl L-ascorbic acid (AA-2G) which was enzymatically glucosylated with the cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) [EC 2.4.1.19] from *Bacillus* sp. JK-43 has been reported previously. The present experiments examined the optimal conditions for the production of AA-2G from AA and soluble starch, and characterized the properties of the CGTase from *Bacillus* sp. JK-43. The reaction mixture for the maximal production of AA-2G was followings; 12% total substrate concentration, 1,400 units/mL of CGTase and a mixing ratio of 2:3 (g of AA:g of soluble starch). Under this condition, 1.76 mM of AA-2G, which corresponded to 2.53% yield based on AA, was produced after incubation for 24 hrs at 45°C (pH 5.5). The optimum pH and temperature for the CGTase activity were 6.0 and 45°C, respectively. The enzyme was stable at pH 5.5 to 9.5, and at temperature up to 50°C. The thermostability of the enzyme could be enhanced up to 60°C by the addition of 30 mM CaCl₂.

Key words: 2-O- α -D-glucopyranosyl L-ascorbic acid (AA-2G), cyclodextrin glucanotransferase (CGTase), *Bacillus* sp. JK-43, transglucosylation

서 론

식물이든지 미생물이든 vitamin B₁, B₆, pantothenate 등의 배당체를 만드는 것은 오래전부터 알려져 왔지만 그 생리적인 역할은 아직 불분명하다. 하지만 이들 배당체가 용해성 및 내열, 내광성 등의 안정성이 증가된 형태라는 것으로 미루어 볼 때, 아마도 생육에 필수적으로 요구되는 native vitamin을 안정한 형태로 저장하기 위한 수단으로 이용되어 온 것이라 생각된다(1,2) L-Ascorbic acid (AA)에 관해서도, AA와 maltose로부터 *Aspergillus niger*의 α -glucosidase에 의해서 AA 배당체가 얻어진다는 것이 1971년에 Miyake와 Suzuki에 의해서 보고(3)되었으며 1989년에 그 구조식이 6-O- α -D-glucopyranosyl L-ascorbic acid (AA-6G)라는 것이 밝혀졌다(4). 하지만 AA-6G는 다른 vitamin의 배당체와는 달리 안정성이 개선되지 않아 AA를 대신할 유도체로 부적합하여 그 응용과 개발이 이루어지지 않았다. 그 이후 지속적인 연구를 통하여 1990년에 AA의 6위치가 아닌 2위치의 수산기가

glucose 1분자로 α -치환되어 분자로서의 안정성이 충분히 보존유지되는 2-O- α -D-glucopyranosyl L-ascorbic acid (AA-2G)가 개발되었다(5-8). AA-2G는 AA의 2번 위치가 glucose 1분자에 의해 가리워져 있는 형태를 가짐으로서 열 및 산화반응이라든지 radical 반응을 받기 어렵고, 따라서 공기산화 및 수용액상태에서도 안정하다(5,6,9). 특히, Fe²⁺라든지 Cu²⁺의 존재하에서 AA는 자동산화하지만, AA-2G는 자동산화되지 않으며 또한 ascorbate oxidase에 대한 저항성과 내열성 및 내광성이 대폭적으로 향상되어 있다(10). AA의 안정형 유도체는 AA-2G이 외에도 L-ascorbic acid 2-phosphate (AA-2P)(11,12), L-ascorbic acid 2-sulfate (AA-2S)(13) 및 L-ascorbic acid 2-methyl ether (AA-2M)(14) 등이 있으나 이들은 안정성은 확보된 반면 세포내에서 AA의 생리활성을 충분히 나타내지 못하는 단점이 있다. 이와는 달리 AA-2G는 생체 투여시 그곳에 존재하는 α -glucosidase에 의해 AA 및 glucose로 분해(15)되어 항괴혈병작용, 콜라겐합성 촉진작용, 백내장 예방작용 및 면역촉진작용 등의 생

[†]To whom all correspondence should be addressed

리활성을 발휘한다(16-18) 특히 AA-2G는 중성용액 중에서 안정하기 때문에 세포배양시 AA의 불안정성과 고농도에서의 세포장해 때문에 명확하게 확인되지 않았던 AA의 생리작용규명에도 유용하게 사용될 수 있다(16).

또한 AA-2G는 미생물기원 효소인 cyclodextrin glucanotransferase (CGTase)[EC 2.4.1.19]의 당전이반응에 의해 부위특이적으로 합성(7)될 수 있어 반응이 간편하고, 정제 또한 간단하다. 따라서 AA-2G의 안전성만 확보된다면 산업적 대량생산을 통해 화장품, 의약품 및 식품 등에 광범위하게 사용될 수 있을 것이다. AA-2G를 합성할 수 있는 CGTase는 α -1,4-glucan이나 cyclodextrin(CD)에 존재하는 glycosyl잔기를 glucose 및 sucrose와 같은 적당한 수용체에 전이라는 분자간 당전이반응(intermolecular transglycosylation)을 촉매하는 효소이다(19). CGTase는 CD 합성에 관련하여 지금까지 많은 연구가 이루어져 왔으나 최근 들어 분자간 당전이반응을 이용하여 새로운 기능성물질을 생산하려는 연구가 활발해지고 있다(20,21).

본 연구실에서는 우리 나라 고유의 전통발효 식품인 김치와 AA에 관한 수년간의 연구를 통해 김장김치에 AA-2G가 존재함을 증명함으로써 AA-2G의 안전성을 확보하였다(22). 특히, 김치 발효조건의 변화에 따른 AA-2G 생산성을 검토한 결과 김치내에서의 AA-2G 생산은 모든 조건에서 이루어지는 것이 아니라 선택적 조건 즉, 18°C와 풀물이 첨가된 조건에서 이루어진다는 것을 밝힌 바 있다(23). 그리고 전보에서 본 연구자들은 김치로부터 AA-2G 합성능이 있는 CGTase 생산균주인 *Bacillus* sp. S-6(24) 및 *Bacillus* sp. JK-43(25)을 분리하고 CGTase 최적생산조건을 검토하였다. 또한 *Bacillus* sp. JK-43이 생산하는 CGTase의 경우, α -, β - 그리고 γ -CD 뿐만 아니라 soluble starch, corn starch를 비롯한 각종 starch류와 식체제조폐액인 엽기름 당화액 및 밥당화액을 AA-2G생산의 당공여체로 이용할 수 있음을 확인하였으며, 특히 AA와 soluble starch의 반응기질로부터 AA-2G 뿐만 아니라 AA-6G로 추정되는 물질을 동시에 생산함을 확인하였다. 이러한 실험결과를 통해 본 연구자들은 전보(25)에서 김치환경내에서의 AA-2G 생산은 전분을 당공여체로 이용한 CGTase의 작용이 주원인인 것으로 추정하였다. 따라서 본고에서는 전보에서 추정된 김치내에서의 AA-2G 생산과 CGTase의 작용과의 상관성을 검토하고자 *Bacillus* sp. JK-43이 생산하는 CGTase를 이용한 AA-2G의 최적생산조건과 그 효소학적 특징을 조사하였다.

재료 및 방법

균주의 배양 및 조효소액의 생산

전보에서 분리, 동정한 *Bacillus* sp. JK-43을 1.0% soluble starch, 1.0% yeast extract, 1.0% Na_2CO_3 , 0.1%

K_2HPO_4 , 0.02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (pH 7.0)에서 26시간 동안 진탕배양한 후 얻어진 배양액을 4°C에서 원심분리(15,000×g, 20 min)한 후 상등액을 50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 로 염석하고 투석하여 AA-2G 생산을 위한 조효소액으로 사용하였다.

CGTase의 활성측정

CGTase 활성은 전보(24)에서와 동일한 방법으로 측정하였으며, CGTase 1 unit는 55°C에서 1분 동안 1 μmol 의 glucose를 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

AA-2G 최적생산조건 검토

AA-2G 최적생산조건을 검토하기 위해 당수용체인 AA, 당공여체인 soluble starch 그리고 *Bacillus* sp. JK-43이 생산하는 CGTase의 조효소액으로 구성된 혼합물을 기본반응물로 하여 반응온도 및 pH, 반응시간, 기질농도비 및 기질농도 그리고 효소농도에 따른 영향을 검토하였다.

반응 pH 및 온도의 영향

3% AA, 7% soluble starch 그리고 244 units/ml CGTase로 구성된 반응혼합물의 pH를 1 N HCl 및 1 N NaOH로 pH 3.0~10.0까지 조정한 후 각각의 pH에서 55°C, 24시간 동안 반응하였다. 동일 반응온도에서 L-ascorbic acid 2-O- α -D-oligoglucosides (AA-2Gn)를 분해하기 위해 glucoamylase(30 units, *Rhizopus* mold, Sigma Chemical Co., USA)를 24시간 동안 처리하여 생산된 AA-2G의 농도를 HPLC로 분석하였다. 한편, 상기와 동일한 반응혼합물을 pH 5.5 (100 mM sodium acetate buffer)에서 15~75°C 범위로 온도를 변화시켜 24시간 동안 반응한 후 55°C, 24시간 동안 30 units glucoamylase를 처리한 후 HPLC 분석을 통해 AA-2G 생산에 미치는 반응온도의 영향을 조사하였다.

반응시간에 대한 영향

3% AA, 7% soluble starch, 244 units/mL CGTase 그리고 100 mM sodium acetate buffer (pH 5.5)로 구성된 반응혼합물을 45°C에서 72시간 동안 반응하였다. 반응 후 시간별로 얻어진 반응혼합물을 24시간 55°C에서 30 units glucoamylase를 처리하여 AA-2Gn을 분해한 후 HPLC 분석을 통해 반응시간에 따른 영향을 검토하였다.

기질농도비 및 기질농도에 따른 영향

244 units/mL CGTase와 100 mM sodium acetate buffer (pH 5.5)가 포함된 반응혼합물에 반응기질인 AA와 soluble starch의 혼합비율 각각 1/4, 3/7, 2/3, 1/1, 3/2, 7/3, 4/1로 변화시켜 45°C에서 24시간 동안 반응하였다. 이때 전체기

질농도는 10%로 고정하였으며, 반응 후 55°C에서 동일시간 30 units glucoamylase를 처리하여 AA-2Gn을 분해한 후 생산된 AA-2G를 HPLC로 분석하여 기질농도비에 따른 영향을 검토하였다.

기질농도에 따른 영향을 조사하기 위해 AA 및 soluble starch의 혼합비를 2/3으로 고정시킨 상태에서 전체 반응 기질농도를 1~25%까지 변화시켜 상기와 동일한 조건에서 반응한 후 생산된 AA-2G를 HPLC로 분석하여 기질농도에 따른 영향을 검토하였다.

효소농도에 따른 영향

4.8% AA, 7.2% soluble starch, 100 mM sodium acetate buffer (pH 5.5)로 구성된 반응 혼합물에 CGTase의 농도를 100~1,600 units/mL로 변화시켜 45°C에서 24시간 동안 반응하였다. 반응 후 30 units glucoamylase를 55°C, 24시간 동안 처리한 후 생산된 AA-2G를 HPLC로 분석하여 효소농도에 따른 영향을 검토하였다.

분석방법

AA-2G 표준품은 일본 Kinki 대학, 식품과학과의 Sakai 교수로부터 공급받아 사용하였으며, CGTase를 이용한 당전이 반응산물에 의해 합성된 AA-2G의 농도는 HPLC (Model-515, Waters)을 사용하여 결정하였다. Column은 μ Bondapak C₁₈ column (Waters), 용출용매는 0.1 M potassium phosphate-phosphoric acid (pH 2.0), 용출속도는 0.5 mL/min이었으며, UV detector (Model-2487, Waters)로 결정하였다.

결과 및 고찰

CGTase의 효소학적 특성

CGTase 활성최적 pH 및 pH 안정성

Bacillus sp. JK-43이 생산하는 CGTase의 활성에 대한 pH의 영향을 알아보기 위해 pH 3.0에서 12.0까지의 완충액에 기질인 5 mM α -CD과 25 mM sucrose를 녹인 다음, 55°C에서 활성을 측정한 결과를 Fig 1(A)에 나타내었다. 세균이 생산하는 대부분의 CGTase는 pH 4.5~7.0에서 최대활성을 나타내는데(19), JK-43의 경우도 Fig. 1(A)에서 보는 바와 같이 pH 7.0 phosphate buffer에서 최고의 활성을 나타내었으며, *Bacillus haloptulus* INMIA 3849(26)와 *Bacillus* sp. S-6(24)의 경우도 JK-43과 마찬가지로 pH 7.0에서 최대활성을 나타내었다.

또한 생산효소의 pH 안정성을 조사하기 위하여 0.1 mL의 조효소액을 0.9 mL의 pH 3.0~12.0에 이르는 100 mM의 여러 완충액과 섞은 다음 30°C에서 30분간 방치 후 100 mM phosphate buffer (pH 7.0)로 5배 희석한 후 잔존활성을 측정하였다. 그 결과 Fig. 1(B)에서 보는 바와 같이

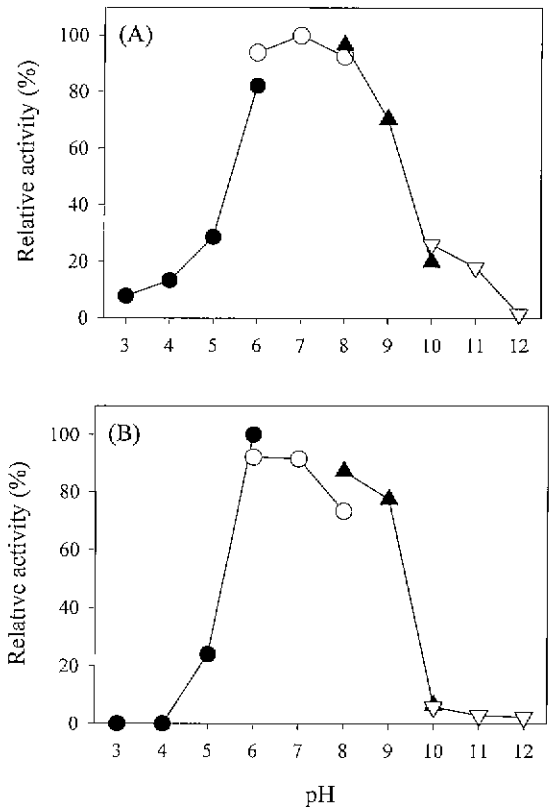


Fig. 1 Effect of pH on the activity and stability of the CGTase from *Bacillus* sp. JK-43. (A) Effect of pH on stability: The enzyme in 100 mM buffer having various pH values was kept for 30 min at 30°C. The experimental details are described in the text. The values are shown as relative activity. The buffer system used for the different pH ranges were as follows: ●: 100 mM citrate buffer, ○: 100 mM borate buffer, ▲: 100 mM phosphate buffer, ▽: 100 mM K₂HPO₄-NaOH buffer.

pH 5.5~9.5까지는 안정하였으나 pH 10.0 이상과 pH 5.0 이하에서는 감소되어 pH 11.0과 pH 4.0에서는 실패되었다. 특히 100 mM citrate buffer의 pH 6.0에서 가장 안정한 것으로 나타났다.

CaCl₂가 열안정성에 미치는 영향

Amylase계열효소의 열안정성 향상 및 활성화에 기여하는 것으로 알려진 2가 양이온인 Ca²⁺가 본 효소의 열안정성에도 영향을 미치는지의 여부를 조사하기 위해 CGTase를 65°C의 5, 15, 30, 40 mM의 CaCl₂ 용액에서 열불활성시킨 후 남아있는 효소의 역가를 10분, 20분, 30분 그리고 60분 간격으로 측정하였다. 그 결과 Fig. 2에 나타난 바와 같이 30분 후에 잔존하는 효소의 역가는 CaCl₂가 첨가되지 않은 대조구에서는 0%, 5 mM, 15 mM, 30 mM 그리고 40 mM CaCl₂ 존재시에는 각각 9.0%, 10.2%, 15.2%, 13.2%였다. 즉, CGTase의 열에 대한 안정성은 30 mM

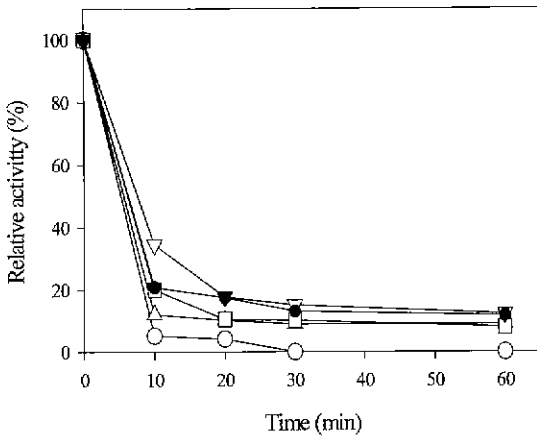


Fig. 2. Effect of CaCl_2 on the thermal stability of the CGTase from *Bacillus* sp. JK-43.

The reaction mixture containing the CGTase in 100 mM citrate buffer (pH 6.0) and various amounts of the CaCl_2 was kept at 65°C , and the flow time of the mixture was measured at appropriate times. The amount of the CaCl_2 : \triangle , 5 mM CaCl_2 ; \square , 15 mM CaCl_2 ; ∇ , 30 mM CaCl_2 ; \bullet , 40 mM CaCl_2 ; \circ , No addition

CaCl_2 존재하에서 약간 증가하는 것으로 나타났으며, 이는 Ca^{2+} 이 CGTase의 열안정성 유지에 매우 중요한 역할을 하는 것을 의미한다. 본 효소와 같이 *Bacillus firmus* (27), *Bacillus* sp. YC-335(28) 그리고 *Bacillus halophilus* INMIA-3849(26)가 생산하는 CGTase의 경우에도 Ca^{2+} 이 열안정성을 향상시키는 것으로 보고되어 있다.

CGTase 활성최적온도 및 열안정성

Bacillus sp. JK-43이 생산하는 CGTase의 활성에 대한 온도의 영향을 알아보기 위해 100 mM citrate buffer (pH 6.0)에 효소를 녹인 후 $25\sim 75^\circ\text{C}$ 에 이르는 온도에서 활성을 측정된 결과를 Fig. 3(A)에 나타내었으며, 그 결과 45°C 에서 최대활성을 나타내었다. 대부분의 CGTase 경우 $40\sim 85^\circ\text{C}$ 에서 최대활성을 나타내는 것으로 보고되어 있으며(19), *Bacillus circulans* var *alkalophilus* ATCC 21783(29)의 경우, 45°C , *B. halophilus* INMIA 3849(26)의 경우, $60\sim 62^\circ\text{C}$, *Bacillus macerans* IFO 3490(30)의 경우, 55°C , 그리고 *Bacillus* sp. S-6(24)의 경우 40°C 에서 최대활성을 나타내었다.

생산효소의 열안정성을 조사하기 위해 100 mM citrate buffer (pH 6.0)에 효소를 녹인 후 $30\sim 85^\circ\text{C}$ 에 이르는 각 온도에서 30 mM CaCl_2 의 존재유무에 따라 두 그룹으로 나누어 30분 방치 후 잔존활성을 100 mM phosphate buffer (pH 7.0)에서 측정하였다. 그 결과 Fig. 3(B)에서 보는 바와 같이 대조구의 경우는 50°C 까지는 효소가 안정하였으나 55°C 에서부터 효소활성이 급격히 감소하는 반면 30 mM의 CaCl_2 존재시에는 60°C 까지 효소 활성이 유지되었으며, 전체적으로 대조구보다 열안정성이 증가하는 것으로 나타났다.

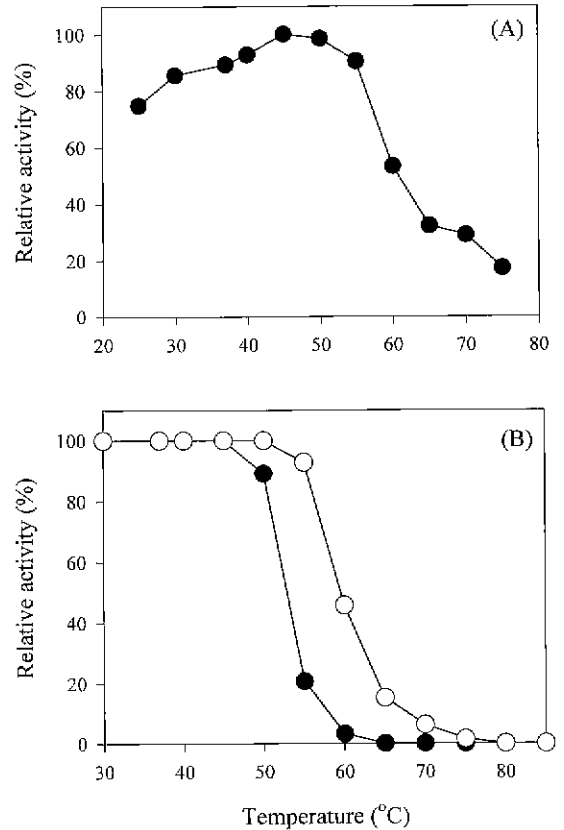


Fig. 3. Effect of temperature on the activity and stability of the CGTase from *Bacillus* sp. JK-43.

(A) Effect of temperature on activity, (B) Effect of temperature on stability in the presence or absence of Ca^{2+} : The enzyme in 100 mM citrate buffer (pH 6.0) containing 30 mM CaCl_2 (\circ) or Control (no addition, \bullet) was incubated at various temperature for 30 min. The values are shown as relative activity.

CGTase를 이용한 AA-2G의 생산조건 검토

반응 pH 및 온도의 영향

AA-2G 생산에 미치는 반응 혼합액의 pH 영향을 검토하기 위해 반응 혼합액의 pH를 3.0부터 10.0까지 변화시키면서 AA-2G 생산량을 비교 검토하였다. Fig. 4(A)의 결과와 같이 pH 5.0~7.0에서 높은 AA-2G 생산량을 나타내었으며, 특히, pH 5.5에서 0.52 mM로 최대의 생산량을 보였으며 이는 반응에 사용한 AA의 1.23%의 수율에 해당하였다. 반면에 pH 5.0~7.0을 벗어나면 급격히 감소하는 경향을 보였다. AA는 건조상태에서는 안정하지만 광을 조사하면 서서히 갈색으로 변화하며, 흡습하면 결정상태에서 그대로 착색되어 산화분해한다. 특히 수용액 상태에 있어서 분해율은 AA의 농도 20~25%에 있어서 40°C , 1시간 방치했을 때, 용기중 공기량 1%, 50%에서 각각 15~47% 및 73~100%이며, AA의 초발농도가 높을수록 분해율은 낮다(31). 수용액은 pH 5~6(32), 이온강도 0.55 부근에서 안정하며(33), 온도가 높을수록 불안정

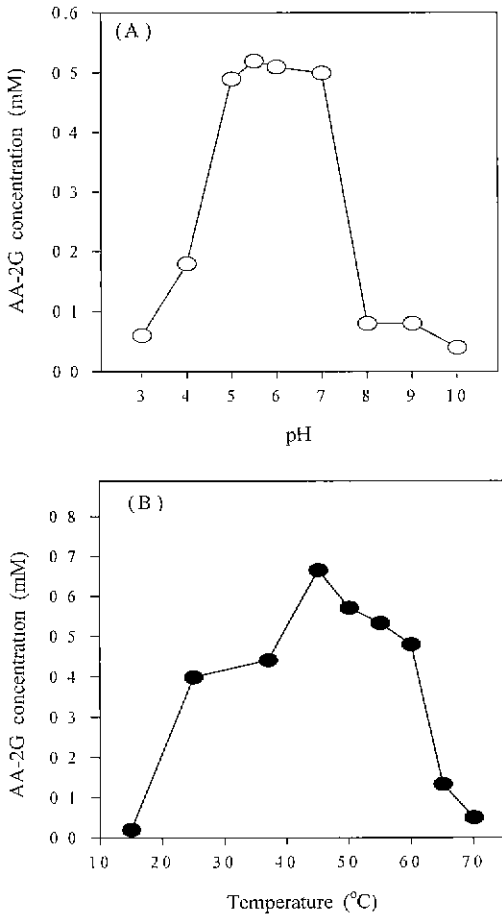


Fig. 4. Effect of pH (A) and temperature (B) in AA-2G production with the CGTase from *Bacillus* sp. JK-43.

The reaction mixture was consisted of 3% AA and 7% soluble starch. AA and soluble starch were incubated with 244 unts/mL of CGTase at various pH and temperature for 24 hrs. AA-2Gn were hydrolyzed by glucoamylase

하게 된다(32). JK-43의 CGTase 활성 최적 pH는 6.0~9.0의 중성 및 약알칼리성부근에서 비교적 높은 활성을 나타낸 반면(Fig. 1(A)) AA-2G 생산은 약산성부근에서 최대를 나타낸 것은 상기에 언급된 바와 같이 AA가 수용액상태에서 다른 조건이 동일한 경우 약산성 부근에서 안정하기 때문인 것으로 판단된다. *Bacillus stearothermophilus* (8)의 경우에도 pH 5.0에서 AA-2G 최대생산량을 나타내었다.

한편, AA-2G 생산에 미치는 반응 온도의 영향을 조사하기 위해, 15~70°C 범위의 반응 온도하에서 AA-2G 생산량을 비교 검토하였다. Fig. 4(B)의 결과와 같이, AA-2G 생산량은 45°C까지는 반응 온도의 증가와 함께 증가하나, 50°C 이후에서는 감소하는 경향을 나타내었다. AA-2G 생산량은 45°C에서 AA에 대해 1.60%의 수율인 0.67 mM

로 최대를 나타내었으며, 이는 상기의 Fig. 3(A)에서 나타난 CGTase 활성 최적온도와 동일한 온도이다. 50°C 이후에 AA-2G 생산량이 점점 감소한 것은 온도가 높을수록 불안정한 AA와 CGTase의 열안정성이 50°C 이후에서 급격히 감소(Fig. 3(B))하는 것이 원인인 것으로 판단된다

반응시간에 따른 영향

Fig 5는 반응시간에 따른 AA-2G 생산의 경시적 변화를 나타낸 것이다. Fig. 5에서 볼 수 있듯이, AA-2G 생산은 반응 24시간까지는 계속적으로 증가하나 그 이후로는 일정하게 유지되는 경향을 나타내었다. 반응 24시간째 AA-2G 생산량은 0.86 mM로 최대를 나타내었으며 이는 반응기질인 AA에 대해 2.05%에 해당하는 결과였다. HPLC 분석결과 반응최종 산물에는 AA-2G 이외에 5~8%의 AA와 glucoamylase의 작용에 의한 분해산물인 glucose, maltose 및 maltooligosaccharide가 대부분이었으며, HPLC chromatogram에 검출되지 않은 대부분의 AA는 반응시간동안 산화된 것으로 판단된다. 한편, 반응 24시간 이후에 AA-2G의 양이 거의 일정하게 유지되는 것은 생산된 AA-2G 자체가 CGTase의 hydrolyzing activity에 거의 영향을 받지 않는다는 것을 의미한다 반면, rat 혹은 rice seed 기원의 α -glucosidase에 의한 AA-2G의 생산에 있어서는 CGTase의 경우보다 최대반응시간이 상대적으로 짧은데, 이는 당공여체로 사용되는 기질과 반응산물인 AA-2G가 α -glucosidase의 작용으로 분해되기 때문이다 따라서 AA-2G 생산에 있어서는 CGTase가 상기 두가지의 α -glucosidase보다 훨씬 효과적임을 알 수 있다.

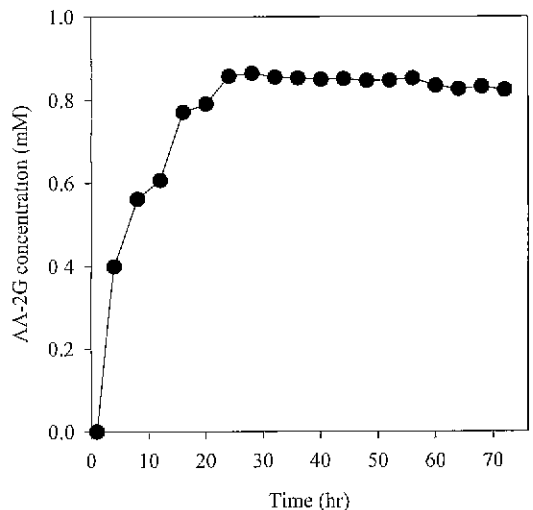


Fig. 5. Time course of AA-2G production by the CGTase from *Bacillus* sp. JK-43.

Reaction was carried out for 72 hrs at 45°C in the reaction mixture containing 3% AA, 7% soluble starch and 244 unts/mL of CGTase (pH 5.5). AA-2Gn were hydrolyzed by glucoamylase

기질농도비에 따른 영향

Fig. 6은 당수용체(AA)와 당공여체(soluble starch)의 적정 혼합비를 조사한 결과이다. 그 결과 당수용체와 당공여체의 혼합비가 2:3(g of AA/g of soluble starch)일 때 AA-2G 생산량이 AA에 대한 2.16%의 수율인 1.21 mM로 최대를 나타내었다. 2:3 이외의 혼합비에서는 AA의 농도가 soluble starch의 농도보다 높은 경우가 반대의 경우보다 대체적으로 AA-2G 생산수율이 낮은 결과를 나타내었다. 이는 AA가 상기의 "반응 pH 및 온도의 영향"에서 언급한 바와 같이 수용액상태에서 초발농도가 높을수록 분해율이 낮아지므로(31) 충분한 수용체가 공급되어진 때문으로 판단된다 *Bacillus* sp. JK-43과는 달리 *B. stearothermophilus*의 경우에는 당수용체(AA) 및 당공여체(α -CD)의 혼합비가 1:1일 때 AA-2G 생산량이 최대를 나타내었다(7).

기질농도에 따른 영향

Fig. 7은 *Bacillus* sp. JK-43의 CGTase에 의한 AA-2G 생산에 미치는 기질농도에 관한 영향을 조사하기 위해 AA와 soluble starch와의 혼합비를 2:3으로 고정하고 전체 기질농도를 1~25%까지로 변화시켜 AA-2G 생산량을 조사한 결과이다. AA-2G 생산량은 전체기질농도가 증가함에 따라 비례적으로 증가하여 12%에서 1.41 mM로 최대를 나타내었으나, 그 이후에는 오히려 당전이 수율이 감소하는 경향을 나타내었는데 이는 높은 전분농도로 인해 substrate inhibition이 일어났기 때문인 것으로 판단된다

효소농도에 따른 영향

Fig. 8은 효소농도에 따른 AA-2G 생산성을 검토한 결

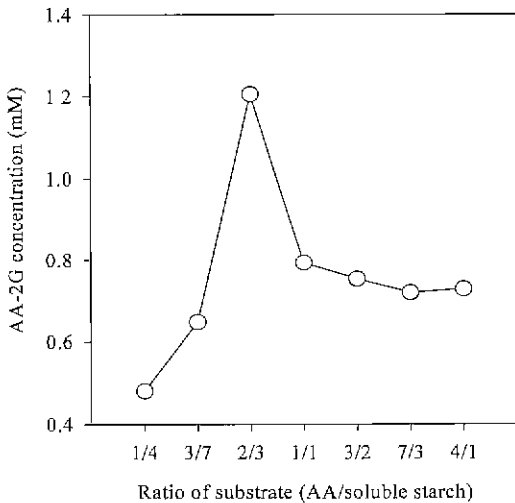


Fig. 6. Effect of substrate ratio on transglucosylation to AA. The reaction was performed under the same conditions as Fig. 5 except for the mixing ratio of AA and soluble starch.

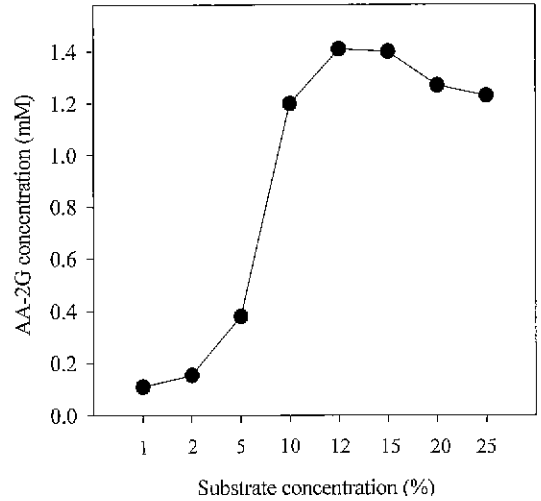


Fig. 7. Effect of substrate concentration for the production of AA-2G. The reaction was performed under the same conditions as Fig. 5, except for the total substrate concentration, and the mixing ratio of AA to soluble starch was fixed as 2:3

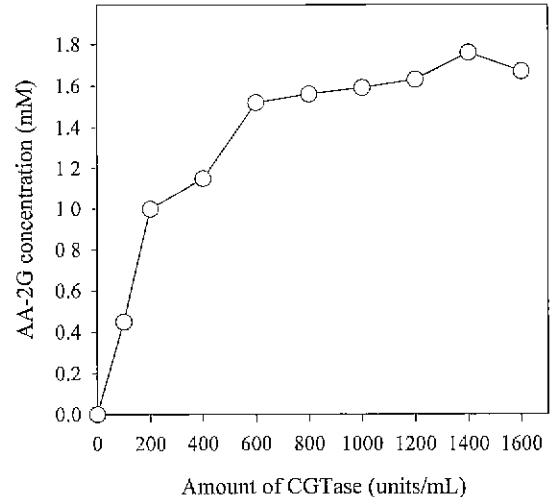


Fig. 8 Effect of the amount of CGTase on the production of AA-2G by the CGTase from *Bacillus* sp. JK-43. Reaction was carried out for 24 hrs at 45°C in the reaction mixture containing 4.8% AA and 7.2% soluble starch (pH 5.5) AA-2Gn were hydrolyzed by glucoamylase

과이다. Fig. 8에 나타난 바와 같이 AA-2G 생산량은 1,400 units/mL까지 효소농도의 증가에 비례하여 증가하여 1,400 units/mL에서 최대를 나타내었으며 이때의 AA-2G 생산량은 1.76 mM이었다 이는 AA에 대해 2.53%의 수율에 해당하는 결과였다 그 이후에는 효소농도가 증가함에 따라 AA-2G 생산량이 오히려 조금 감소되었는데 이는 CGTase가 cyclization, coupling reaction, disproportionation reaction 및 hydrolyzing activity를 동시에 갖는 multi-

functional enzyme이므로 AA-2G 생산에 관여하는 coupling reaction 이외의 다른 불필요한 반응들이 유도되었기 때문인 것으로 판단된다. 본 효소와 같이 *B. stearothermophilus*의 경우에도 10~5,000 units/g- α -CD의 다양한 농도에서 AA-2G 생산성을 검토한 결과 500 units/g- α -CD 까지는 효소농도에 비례하여 증가하다가 그 이후에는 AA-2G 생산량이 감소되는 것으로 보고되어 있다(7)

요 약

김치분리균인 *Bacillus* sp. JK-43이 생산하는 CGTase의 특성 및 AA-2G 생산 최적조건을 검토하였다. 황산암모늄 침전방법을 이용하여 얻은 조효소액의 효소적 특성에 있어서 본 효소의 최적활성 pH는 6.0이었으며, pH는 5.5~9.5까지 안정하였다. 최적활성온도는 45°C였으며, 50°C까지 안정함을 보였다. 이 효소에 calcium ion을 첨가하였더니 열안정성이 증가하였으며, 30 mM CaCl₂ 농도에서 가장 안정성이 증대되어 60°C까지 초기활성의 49%가 유지되었다. 한편, AA를 당수용체 soluble starch를 당공여체로 하여 AA-2G의 최적생산을 조사하였다. AA-2G의 최적생산을 위한 반응 혼합액은 1,400 units/ml의 CGTase, 기질농도 12%, 기질농도비(AA-g/soluble starch-g) 2:3으로 조성되었으며, 이 반응혼합액을 사용하여 45°C, pH 5.5에서 24시간 반응시켰을 때 AA-2G 최대 생산량은 1.76 mM이었다.

감사의 글

본 연구는 (1998)년 한국학술진흥재단의 학술 연구비와 한국과학재단 특정기초연구비(1999-2-211-001-3)에 의한 연구결과의 일부로서 지원하여 주심에 감사드립니다.

문 헌

1. Ogata, K., Tani, Y., Uchida, Y. and Ochikura, T. : Studies on transglycosylation to vitamin B₆ by microorganisms. 1. Formation of a new vitamin B₆ derivative, pyridoxine glucoside, by *Sarcina lutea*. *J. Vitaminol.*, **15**, 142-150 (1969)
2. Ogata, K., Uchida, Y., Kurihara, N., Tani, Y. and Tochikura, T. : Studies on transglycosylation to vitamin B₆ by microorganisms. II Chemical structure of pyridoxine glucoside. *J. Vitaminol.*, **15**, 160-166 (1969)
3. Miyake, T. and Suzuki, Y. : Enzymatic formation of new L-ascorbic acid glucosides (in Japanese). *Vitamins*, **43**, 205-209 (1971)
4. Suzuki, Y. and Uchida, K. : Enzymatic formation of L-glucosylascorbic acid (in Japanese) *Vitamins*, **63**, 5-197 (1989)
5. Muto, N., Nakamura, T. and Yamamoto, I. : Enzymatic formation of a non-reducing L-ascorbic acid α -glucoside. purification and properties of α -glucosidase catalyzing site-specific transglucosylation from rat small

- intestine. *J. Biochem.*, **107**, 222-227 (1990)
6. Muto, N., Suga, S., Mitoh, Y., Tanaka, M. and Yamamoto, I. : Formation of a stable ascorbic acid 2-glucoside by specific transglucosylation with rice seed α -glucosidase. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 1697-1703 (1990)
7. Hajime, A., Masaru, Y., Shuzo, S. and Itaru, Y. : Synthesis of 2-O- α -D-glucopyranosyl L-ascorbic acid by cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus*. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 1751-1756 (1991)
8. Mari, T., Norio, M. and Itaru, Y. : Characterization of *Bacillus stearothermophilus* cyclodextrin glucanotransferase in ascorbic acid 2-O- α -glucoside formation. *Biochim. Biophys. Acta*, **1078**, 127-132 (1991)
9. Yamamoto, I., Muto, N., Murakami, K., Suga, S. and Yamaguchi, H. : L-Ascorbic acid α -glucoside formed by resiospecific transglucosylation with rat intestinal and rice seed α -glucosidase : its improved stability and structure determination. *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 3020-3023 (1990)
10. Yamamoto, I., Muto, N., Nagata, E., Nakamura, T. and Suzuki, Y. : Formation of a stable L-ascorbic acid α -glucoside by mammalian α -glucosidase-catalyzed transglucosylation. *Biochim. Biophys. Acta*, **1035**, 44-50 (1990)
11. Cinatl, J., Weber, B., Rabenau, H., Gumbel, H.O., Chenot, J.F., Scholz, M., Encke, A. and Doerr, H.W. : *In vitro* inhibition of human cytomegalovirus replication in human foreskin fibroblasts and endothelial cells by ascorbic acid 2-phosphate. *Antiviral Res.*, **27**, 405-418 (1995)
12. Mirna, H., Nomura, H., Imai, Y. and Takashima, H. : Chemistry and application of ascorbic acid phosphate. *Vitamin*, **41**, 387-398 (1970)
13. Mead, C.G. and Finamore, F.J. : The occurrence of ascorbic acid sulfate in brine shrimp, *Artemia salina*. *Biochemistry*, **8**, 2652-2655 (1966)
14. Lu, P.W., Lillard, Jr. D.W., Seib, P.A., Kramer, K. and Liang, Y.T. : Synthesis of the 2-methylether of L-ascorbic acid : stability, vitamin activity, and carbon-13 nuclear magnetic resonance spectrum compared to those of the 1- and 3-methyl ethers. *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 21-28 (1984)
15. Yamamoto, I., Suga, S., Mitoh, Y., Tanaka, M. and Muto, N. : Antiscorbutic activity of L-ascorbic acid 2-glucoside and its availability as a vitamin C supplement in normal rats and guinea pigs. *J. Pharmacobiodyn.*, **13**, 688-695 (1990)
16. Murakami, K., Muto, N., Fukazawa, K. and Yamamoto, I. : Comparison of ascorbic acid and ascorbic acid 2-O- α -glucoside on the cytotoxicity and bioavailability to low density cultures of fibroblasts. *Biochem. Pharmacol.*, **44**, 2191-2197 (1992)
17. Wakamya, H., Suzuki, E., Yamamoto, I., Akiba, M., Otsuka, M. and Arakawa, N. : Vitamin C activity of 2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid in guinea pig. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **38**, 235-245 (1992)
18. Yamamoto, I., Muto, N., Murakami, K. and Akiyama, J. : 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 (1992)
19. Tonkova, A. : Bacterial cyclodextrin glucanotransferase. *Enzyme Microb. Technol.*, **22**, 678-686 (1998)
20. Kim, T.K., Park, D.C. and Lee, Y.H. : Synthesis of transglucosylated xylitol using cyclodextrin glucanotransferase and its stimulating effect on the growth of

- Bifidobacterium*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **26**, 442-449 (1998)
21. Okada, S., Kitahata, S., Shosaka, M., Bunya, H., Kubota, M., Sakai, S. and Tsujisaka, Y. Application of cyclodextrin glucanotransferase. *Denpun Kagaku*, **38**, 211-215 (1991)
 22. Jun, H.K., Bae, K.M. and Kim, Y.H. Identification of L-ascorbic acid 2-O- α -glucoside, a Stable Form of ascorbic acid, in *kimchi*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **8**, 710-713 (1998)
 23. Jun, H.K., Bae, K.M., Kim, Y.H. and Cheigh, H.S. Formation of a L-ascorbic acid 2-O- α -glucoside during *kimchi* fermentation. *J. Food Sci. Nutr.*, **3**, 225-229 (1998)
 24. Jun, H.K., Jo, Y.B., Kim, S.J. and Bae, K.M. Some properties and optimal culture conditions of cyclodextrin glucanotransferase of *Bacillus* sp. S-6 isolated from *kimchi*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **27**, 609-617 (1998)
 25. Jun, H.K., Bae, K.M., Kim, Y.H. and Baik, H.S. Production and characterization of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus* sp. JK-43 isolated from *kimchi*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **29**, 41-48 (2000)
 26. Abelian, V.A., Adamian, M.O., Abelian, L.A., Balayan, A.M. and Alrikian, E.K. A new cyclomalto-dextrin glucanotransferase from halophilic *Bacillus* (in Russian). *Biokhimiya*, **60**, 891-897 (1995)
 27. Shin, H.D., Kim, C. and Lee, Y.H. Purification and characterization of β -cyclodextrin glucanotransferase extracted by *Bacillus firmus* var. *alkalophilus*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **26**, 323-330 (1998)
 28. Chung, Y.J., Kong, I.S., Kang, Y.S. and Yu, J.H. Purification and characterization of cyclodextrin glycosyltransferase from alkalophilic *Bacillus* sp. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.*, **18**, 41-48 (1990)
 29. Paloheimo, M., Haglund, D., Aho, S. and Korhola, M. Production of cyclodextrin glucanotransferase of *Bacillus circulans* var. *alkalophilus* ATCC21783 in *B. subtilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **36**, 584-591 (1992)
 30. Kitakata, S., Tsuyama, N. and Okada, S. Purification and some properties of cyclodextrin glycosyltransferase from a strain of *Bacillus* species. *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 387-393 (1974)
 31. Krowczynska, L., Krasowska, H. and Makosz, A. Decomposition rate of ascorbic acid in the presence and in the absence of oxygen. *Acta Pol. Pharm.*, **23**, 493-498 (1966)
 32. Struhar, H., Fecak, B. and Mandak, M. L-Ascorbic acid-brief review of stability and stabilization of aqueous solutions. *Cesk. Farm.*, **17**, 306-311 (1968)
 33. Tolbert, B.M., Downing, M., Carlson, R.W., Knight, M.K. and Baker, E.M. Chemistry and metabolism of ascorbic acid and ascorbate sulfate. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **258**, 48-69 (1975)

(1999년 12월 3일 접수)